

Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier
Septembre 2017

**DÉVELOPPEMENT ET MISE À NIVEAU DES MÉTHODES DE
DéTECTION DES CHAMPIGNONS PATHOGÈNES
DES TISSUS LIGNEUX DE LA VIGNE**

Par
Koyomi Ozaki

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Philippe Constant INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Julien Vivancos Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ
Directeur de recherche	Éric Déziel INRS – Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Claude Guertin INRS – Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et leur encouragement durant mes deux années de travaux de recherche. Particulièrement, je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le professeur Éric Déziel, ainsi que mon codirecteur, le professeur Claude Guertin, pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leurs laboratoires et aussi pour m'avoir guidée énormément dans mon projet.

Je remercie aussi Dr Caroline Provost, directrice et chercheure au CRAM, pour sa disponibilité et ses conseils. De plus, je remercie l'équipe du monsieur Antoine Dionne du Laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ, mesdames Nancy Shallow, Marion Berrouard et Dr Julien Vivancos, pour m'avoir fourni les informations et le matériel nécessaires.

Je tiens à remercier le Dr José Ramón Úrbez-Torres, du Summerland Research and Development Centre en Colombie-Britannique, et le Dr Florent Trouillas, à l'Université de Californie à Davis, pour m'avoir fourni les souches fongiques qui étaient nécessaires dans la réalisation de mon travail. Particulièrement, les conseils du Dr Úrbez-Torres étaient indispensables dans ce projet.

Également, je remercie Marie-Christine Groleau pour sa bonne humeur, son encouragement et ses nombreux conseils qui m'ont aidée à trouver des solutions pour avancer. Finalement, je tiens à remercier mes collègues des deux laboratoires, ainsi que toutes les personnes dans les deux bureaux étudiants, pour leur support tout au long de mon parcours à l'INRS.

RÉSUMÉ

Une multitude de champignons induisent des symptômes liés à des maladies du bois sur différentes parties de la plante. Au Québec, de nombreux facteurs, tels que l'implantation de vignes étrangères, contribuent à la propagation des champignons et des maladies dans les vignobles. Actuellement, différentes méthodes de laboratoire sont disponibles pour la détection de ces maladies, mais une actualisation des techniques pour les espèces retrouvées au Canada est nécessaire. Le présent projet a donc comme objectif principal de développer et de mettre au point des méthodes de détection simultanée et rapide des dix champignons associés aux maladies suivantes : l'esca, le pied noir, le *black dead arm*, l'eutypiose et l'excoriose. Pour ce faire, on a choisi l'approche par qPCR multiplex qui cible, à l'aide des sondes d'hybridation TaqMan®, des marqueurs génomiques de ces agents pathogènes. Dans le cadre de ce projet, deux systèmes duplex et deux systèmes triplex ont été développés pour détecter la présence de dix champignons. Les retombées de ce projet permettront aux différents intervenants de la vigne (agronomes, vignerons) d'avoir accès à une méthodologie de diagnostic fiable et rapide, ce qui se répercutera en une meilleure santé globale des vignobles du Québec.

ABSTRACT

A wide variety of pathogenic fungi that are responsible for grapevine wood diseases can cause several symptoms in different parts of the plant. In Quebec, several factors, such as plantation of new grapevines, may contribute to the propagation of pathogenic fungi and diseases in many vineyards. Currently different laboratory methods are available for the detection of such diseases, but the development of techniques to specifically detect the fungal species present in Canada is now required. The main objective of this project is therefore to develop and to validate laboratory methods to detect rapidly and simultaneously ten pathogenic fungi associated with the following grapevine diseases: esca, black foot, black dead arm, Eutypa dieback, and dead-arm disease. In order to achieve this goal, we chose the approach by multiplex qPCR, in which TaqMan® hybridization probes target and bind to different genomic markers of the pathogenic agents. Two duplex reactions and two triplex reactions, to detect these ten fungal species, were developed. This project would allow the vineyard owners and the agronomists to have access to a fast and reliable diagnostic tool, and ultimately it should improve the health of all vineyards in Quebec.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
1. Viticulture et son importance dans le monde	1
1.1. Taxonomie des vignes	1
1.2. Influence du climat sur la qualité des raisins	1
1.3. Chiffres sur la production et la consommation des vins mondiale	2
1.4. Développement du marché de vins international	3
2. Viticulture et son importance au Canada	4
2.1. Viticulture au Canada	4
2.2. Viticulture au Québec - Caractéristiques du climat québécois	5
2.3. Viticulture au Québec	5
2.4. Développement du marché viticole canadien	6
3. Maladies dévastatrices du bois de la vigne	7
3.1. Excoriose	8
3.1.1. Historique de l'excoriose	8
3.1.2. Symptômes de l'excoriose	9
3.1.3. Protection contre l'excoriose	10
3.1.4. Espèces associées à l'excoriose	10
3.2. Eutypiose	11
3.2.1. Historique de l'eutypiose	11
3.2.2. Symptômes de l'eutypiose	11
3.2.3. Protection contre l'eutypiose	13
3.2.4. Espèces associées à l'eutypiose	13
3.3. Esca	14
3.3.1. Historique de l'esca	14
3.3.2. Symptômes de l'esca	15
3.3.3. Protection contre l'esca	16
3.3.4. Espèces associées à l'esca	17
3.4. Pied noir	18
3.4.1. Historique du pied noir	18
3.4.2. Symptômes du pied noir	18
3.4.3. Protection contre le pied noir	19
3.4.4. Espèces associées au pied noir	20

3.5. <i>Black dead arm</i>	21
3.5.1. Historique du <i>BDA</i>	21
3.5.2. Symptômes du <i>BDA</i>	22
3.5.3. Protection contre le <i>BDA</i>	22
3.5.4. Espèces associées au <i>BDA</i>	23
4. Cycle d'infection des champignons pathogènes du bois de la vigne.....	24
5. Méthodes de détection des champignons pathogènes.....	26
5.1. Identification par méthode traditionnelle	27
5.2. Identification par PCR.....	28
5.3. PCR en temps réel	29
5.3.1 PCR en temps réel avec la technologie TaqMan®.....	30
5.3.2. qPCR multiplex en temps réel avec la technologie TaqMan®	32
6. Gènes ciblés dans ce projet.....	34
6.1. Région ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>).....	34
6.2. Gène de l'histone H3	36
7. La problématique.....	37
MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
MATÉRIEL	38
1. Souches.....	38
2. Amorces et sondes d'hybridation TaqMan®	40
MÉTHODES	44
1. Isolement des souches fongiques associées au pied noir	44
2. Extraction d'ADN fongique.....	45
3. Identification des souches fongiques par séquençage des gènes cibles	46
4. Purification de l'ADN	48
5. PCR conventionnelle en gradient de température	48
6. Test du fonctionnement des sondes en condition monoplex.....	49
7. Test de spécificité	50
8. Optimisation des conditions de qPCR multiplex	52
9. Détermination de la limite de détection.....	54
10. Validation de la réaction triplex du pied noir.....	54
RÉSULTAT	55
1. Développement de la qPCR duplex – esca	55
1.1. Détermination de la région cible et conception des sondes	55
1.2. PCR conventionnelle en gradient de température.....	57

1.3. Fonctionnement des sondes dans des qPCR monoplex - Sondes PC1 et PA1	58
1.4. Fonctionnement des sondes dans des qPCR monoplex - Sondes PC2 et PA2	60
1.5. Spécificité	60
1.6. Fonctionnement des sondes dans la qPCR duplex.....	62
1.7. Détermination de limite de détection des deux sondes	64
2. Développement de la réaction triplex – pied noir.....	65
2.1. Isolement et identification des souches	65
2.2. Détermination de la région cible et conception des sondes	67
2.3. PCR conventionnelle en gradient de température.....	70
2.4. Fonctionnement des amorces et des sondes dans des réactions monoplex	71
2.5. Spécificité des sondes	72
2.6. Fonctionnement des sondes dans des qPCR duplex.....	74
2.7. Fonctionnement des sondes dans une qPCR triplex	75
2.8. Détermination de limite de détection	77
3. Développement du système triplex – <i>black dead arm</i>	79
3.1. Détermination de la région cible et conception des sondes	79
3.2. PCR conventionnelle en gradient de température.....	80
3.3. Fonctionnement des amorces et des sondes dans des qPCR monoplexes	81
3.4. Spécificité des sondes	82
3.5. Fonctionnement des sondes dans des qPCR duplex.....	84
3.6. Fonctionnement des sondes dans une qPCR triplex	85
3.7. Détermination de limite de détection	87
4. Développement du système duplex – excoriose et eutypiose.....	89
4.1. Détermination de la région cible et conception des sondes	89
4.2. PCR conventionnelle en gradient de température.....	90
4.3. Fonctionnement des amorces et des sondes dans des qPCR monoplexes	92
4.4. Spécificité des sondes	92
4.5. Fonctionnement des sondes en qPCR duplex	94
4.6. Détermination de limite de détection	96
5. Résumé des quatre réactions multiplex développées.....	98
6. Validation avec les échantillons du terrain.....	100
DISCUSSION	105
1. Développement du système duplex – esca	105
1.1. Conception des sondes TaqMan®	105
1.2. Spécificité et sensibilité	107

1.3. Limite de détection	108
2. Développement du système triplex – pied noir	109
2.1. Identification des souches isolées	109
2.2. Conception des amorces et des sondes d'hybridation	111
2.3. Spécificité et sensibilité	112
2.4. Limite de détection	113
3. Développement du système triplex – <i>black dead arm</i>	114
3.1. Conception des sondes d'hybridation.....	114
3.2. Spécificité et sensibilité	115
3.3. Limite de détection	116
4. Développement du système duplex – excoriose et eutypiose.....	117
4.1. Identification des souches et conception des sondes	117
4.2. Spécificité et sensibilité	117
4.3. Limite de détection	118
5. Validation avec les échantillons du terrain.....	119
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE	122
ANNEXE.....	134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé de toutes les maladies cryptogamiques étudiées dans ce projet, ainsi que les espèces fongiques qui en sont responsables	24
Tableau 2 : Exemples de fluorochromes fréquemment attachés aux sondes TaqMan®, ainsi que leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission	34
Tableau 3. La liste des souches étudiées dans le présent projet, ainsi que leurs sources	39
Tableau 4 : La liste des sondes employées pour toutes les espèces fongiques étudiées, chacune responsable d'une maladie, ainsi que les paires de fluorochromes et <i>quencher</i> s qui y sont attachés.....	43
Tableau 5 : Les régions et les gènes séquencés pour identifier les souches étudiées, ainsi que les paires d'amorces universelles permettant leur amplification	47
Tableau 6 : Recette de base du mélange réactionnel de 20 µL et de 25 µL lors des essais de qPCR monoplex	50
Tableau 7 : Espèces fongiques utilisées lors du test de spécificité des sondes TaqMan® dans les quatre réactions multiplex	51
Tableau 8 : Recette de base du mélange réactionnel de 20 µL et de 25 µL lors des essais de qPCR duplex et triplex	53
Tableau 9 : Comparaison des valeurs de R ² des courbes standard et de l'efficacité des deux sondes, PA1 et PA2, dans les deux réactions monoplex	59
Tableau 10 : Chiffres sur les six réactions monoplex, ayant ciblé <i>P. chlamydospora</i> et <i>P. aleophilum</i> , optimisées	60
Tableau 11 : Résultat du séquençage des isolats provenant des vignes de l'Île-d'Orléans ainsi que les espèces prédites	66
Tableau 12 : Efficacité des trois réactions monoplex, chacune incluant individuellement MAC1, LIR1 et PAU1, lors du premier essai	72
Tableau 13 : Chiffres sur les huit réactions monoplex optimisées ayant ciblé <i>I. macrodidyma</i> , <i>I. liriodendri</i> et <i>C. pauciseptatum</i>	72
Tableau 14 : Chiffres sur les trois réactions duplex effectuées avec les sondes MAC1, LIR1 et PAU1	75
Tableau 15 : Chiffres sur les huit réactions monoplex optimisées, ayant ciblé <i>B. dothidea</i> , <i>D. seriata</i> et <i>N. parvum</i>	82
Tableau 16 : Chiffres sur les trois réactions duplex effectuées avec les sondes BD1, DS1 et NP2	85
Tableau 17 : Chiffres sur les quatre réactions monoplex optimisées, ayant ciblé <i>P. viticola</i> et <i>E. lata</i>	92
Tableau 18 : Effet de modification de la concentration de MgCl ₂ dans une réaction duplex contenant les sondes PHO1 et EUT1	94
Tableau 19 : Résumé des volumes de réactifs ajoutés, en µl, dans chacun des mélanges réactionnels	98

Tableau 20 : Le temps et la température d'hybridationélongation utilisés dans les quatre réactions multiplex développées	99
Tableau 21 : Valeurs de Ct associées à la détection des trois espèces dans les échantillons d'ADN extraits à l'aide des cinq troussees commerciales	104
Tableau A-1 : Recette du tampon d'extraction	134
Tableau A-2 : Recette des milieux utilisés dans ce projet.....	134

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Croissance du marché mondial du vin entre 2000 et 2015, en milliards de \$ CAN	4
Figure 2 : Lésions typiques de l'excoriose sur la tige de vigne observées en été et en hiver.....	10
Figure 3 : Comparaison entre le sarment atteint de l'eutypiose (haut A), le sarment sain (bas A) et le cep malade (B)	12
Figure 4 : Les exemples de symptômes observés sur les racines de la vigne atteinte du pied noir	19
Figure 5 : Cycle général des maladies cryptogamiques du bois de la vigne.....	25
Figure 6 : Fonctionnement de PCR en temps réel avec une sonde TaqMan®.....	31
Figure 7 : Courbe d'amplification générée par PCR en temps réel avec une sonde TaqMan® .	32
Figure 8 : Organisation d'un opéron de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes.	35
Figure 9 : Longueurs d'onde d'émission maximales des fluorochromes étudiés dans ce projet, ainsi que les longueurs d'onde de détection des canaux vert, jaune, orange et rouge.....	42
Figure 10 : Un exemple d'un alignement de la région cible chez les trois souches étudiées, avec la séquence de la sonde correspondante.....	56
Figure 11 : Séquences des sondes PC2 et PA2, alignées aux séquences d'une partie de la région ITS1 chez <i>P. chlamydospora</i> PARC50 et <i>P. aleophilum</i> PARC220	56
Figure 12 : Région ITS1 amplifiée chez les trois souches de <i>P. chlamydospora</i> (<i>P. chl.</i>) et chez les trois souches de <i>P. aleophilum</i> (<i>P. ale</i>) aux quatre températures d'hybridation par PCR en gradient de températures	57
Figure 13: L'amplification de la région ITS1 de la souche <i>P. chlamydospora</i> PARC50 détectée dans le canal jaune.....	59
Figure 14 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde PA2 contre l'espèce cible et sept espèces non-ciblées	61
Figure 15 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde PC2 contre l'espèce cible et sept espèces non-ciblées	62
Figure 16 : Courbes d'étalon générées suivant les réactions duplex et monoplex avec les sondes PA2 (haut) et PC2 (bas).....	63
Figure 17 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN génomique des souches <i>P. aleophilum</i> PARC220, PARC341 et PARC369, détectées par la sonde PA2, dans la réaction duplex.....	64
Figure 18 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN génomique des souches <i>P. chlamydospora</i> PARC50, PARC100 et PARC326, détectées par la sonde PC2, dans la réaction duplex.....	65
Figure 19: Alignement des séquences de la région ITS complète chez <i>I. macrodidyma</i> PARC345, <i>I. liriodendri</i> PARC60 et <i>C. pauciseptatum</i> IAF45.	68
Figure 20: Alignement des séquences d'une partie du gène codant pour la bêta-tubuline chez <i>I. macrodidyma</i> PARC345, <i>I. liriodendri</i> PARC60 et <i>C. pauciseptatum</i> IAF45.....	69

Figure 21 : Séquences des trois sondes alignées à celles du gène de l'histone H3 partiel chez <i>I. macrodidyma</i> PARC345, <i>I. liriodendri</i> PARC60, et <i>C. pauciseptatum</i> IAF45.....	70
Figure 22 : Gène de l'histone H3 partiel amplifié à l'aide des amorces H3F_1 et H3R_2 chez <i>I. macrodidyma</i> (<i>I. mac.</i>) PARC345, <i>I. liriodendri</i> (<i>I. lir.</i>) PARC72 et <i>C. pauciseptatum</i> (<i>C. pau.</i>) IAF45 aux trois températures d'hybridation par PCR en gradient de températures...	71
Figure 23 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde MAC1 (haut) et PAU1 (bas) contre leurs cibles (*) et huit espèces non-ciblées.....	73
Figure 24 : Courbes d'amplifications générées suite au test de spécificité de la sonde LIR1 contre l'espèce cible (<i>I. liriodendri</i>) et huit espèces non-ciblées	74
Figure 25 : Courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex dans lesquelles les dilutions d'ADN de <i>I. macrodidyma</i> sont détectées par la sonde MAC1.....	76
Figure 26 : Courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex dans lesquelles les dilutions d'ADN de <i>I. liriodendri</i> sont détectées par la sonde LIR1	76
Figure 27 : Courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex dans lesquelles les dilutions d'ADN de <i>C. pauciseptatum</i> sont détectées par la sonde PAU1	77
Figure 28 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des deux souches de <i>I. macrodidyma</i> PARC345 et PARC398, détectées par la sonde MAC1 dans la réaction triplex	78
Figure 29 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de <i>I. liriodendri</i> PARC60, PARC72 et PARC393, détectées par la sonde LIR1 dans la réaction triplex	78
Figure 30 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de <i>C. pauciseptatum</i> IAF44, IAF45 et IAF46, détectées par la sonde PAU1 dans la réaction triplex	79
Figure 31 : Séquences des sondes DS1, BD1 et NP2 alignées à celles de la région ITS2 chez <i>D. seriata</i> PARC90, <i>B. dothidea</i> PARC78 et <i>N. parvum</i> PARC15	80
Figure 32 : Région ITS2 amplifiée chez les trois souches de <i>D. seriata</i> , les trois souches de <i>B. dothidea</i> , les deux souches de <i>N. parvum</i> aux deux températures d'hybridation par PCR en gradient de températures	81
Figure 33 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde BD1(haut) et DS1 (bas) contre l'espèce cible (*) et huit espèces non-ciblées	83
Figure 34 : Courbes d'amplification générées suivant le test de spécificité de la sonde NP1 (haut) et de la sonde NP2 (bas)	84
Figure 35 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde BD1 et de l'ADN de <i>B. dothidea</i> PARC32	86
Figure 36 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde DS1 et de l'ADN de <i>D. seriata</i> PARC90	86
Figure 37 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde NP2 et de l'ADN de <i>N. parvum</i> PARC15	87
Figure 38 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de <i>D. seriata</i> PARC84, PARC90 et PARC91, détectées par la sonde DS1 dans la réaction triplex	88

Figure 39 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de <i>B. dothidea</i> PARC32, PARC78 et PARC201, détecté par la sonde BD1 dans la réaction triplex	88
Figure 40 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des deux souches de <i>N. parvum</i> PARC15 et PARC37, détectées par la sonde NP2 dans la réaction triplex..	89
Figure 41 : Séquences des sondes PHO1 et EUT1 alignées à celles de la région ITS1 partielle chez <i>P. viticola</i> et <i>E. lata</i>	90
Figure 42: Région ITS1 amplifiée chez une souche de <i>P. viticola</i> et les trois souches de <i>E. lata</i> aux quatre températures d'hybridation par PCR en gradient de températures	91
Figure 43 : Courbes d'amplification générées suite au test de spécificité de la sonde PHO1(haut) et EUT1 (bas) contre l'espèce cible (*) et neuf espèces non-ciblées	93
Figure 44 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction duplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde PHO1 et de l'ADN de <i>P. viticola</i> UCD2408Tx	95
Figure 45 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction duplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde EUT1 et de l'ADN de <i>E. lata</i> PARC303	95
Figure 46 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN de la souche <i>P. viticola</i> UCD2408Tx, détectées par la sonde PHO1 dans la réaction duplex.....	96
Figure 47 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches <i>E. lata</i> PARC131, PARC276 et PARC303, détectées par la sonde EUT1 dans la réaction duplex	97
Figure 48 : L'ADN ayant été extrait des racines de vigne Baltica D23474 à l'aide des cinq trousse d'extraction.....	101
Figure 49 : Courbes d'amplification générées suite à la réaction triplex en ajoutant l'ADN extrait à partir du pied de la vigne Baltica D23474 à l'aide de la trousse DNeasy PowerPlant Pro	103
Figure 50 : Comparaison structurale des monomères d'ADN, d'ARN et de LNA	106

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES DÉFINITIONS

AAC : Agriculture et agroalimentaire Canada.

ADVQ : Association des vignerons indépendants du Québec, fondée en 2006.

Anamorphe : la forme reproductrice asexuée (parfois dite imparfaite) d'un champignon.

BDA : *black dead arm* (bras mort noir en français)

Cépage : une variété de vigne. Celle qui produit des raisins rouges est appelée un cépage noir, tandis que celle qui donne des raisins blancs est nommée un cépage blanc

Conidie ou conidiospore : une spore assurant la reproduction asexuée d'un champignon sous forme anamorphique. Certaines espèces produisent deux types de conidies : macroconidie (grande taille) et microconidie (petite taille).

CRAM : Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries, et de l'Alimentation du Québec

OIV : Organisation internationale de la vigne et du vin. Il s'agit d'un organisme intergouvernemental, à caractère scientifique et technique, qui est composé de 46 États membres.

Plaies de taille (*pruning wound*) : dans la viticulture, il s'agit d'une pratique agricole qui consiste à couper certains rameaux pour limiter la croissance excessive de la plante, et pour ainsi augmenter la production des raisins de bonne grosseur (les viticulteurs encouragent la croissance d'un petit nombre de grappes par vigne, ce qui fait que ces fruits auront plus de nutriment pour se développer).

Pycnides : une fructification de champignon en forme de bouteille qui produit des conidies à la place des spores sexuées (ex. ascospores).

Rameau: une branche des vignes qui ne porte pas d'écorce, encore verte.

Sarment: jeune rameau de vigne de l'année qui pousse de la souche originale.

Téléomorphe : la forme reproductrice sexuée (parfois dite parfaite) d'un champignon.

INTRODUCTION

1. Viticulture et son importance dans le monde

La viticulture est une pratique agricole qui date de plus de 7000 ans et qui sert à cultiver des vignes pour la production des raisins (Qiu et al., 2015). Tandis que ces fruits sont consommés sous diverses formes, 80% des récoltes de raisins sont aujourd'hui transformées en vin. Étant donné que la vigne est la plante fruitière la plus cultivée au monde, la viticulture est pratiquée sur tous les continents, sauf en Antarctique (Mullins et al., 1992).

1.1. Taxonomie des vignes

Il existe différents cultivars de vignes en fonction des régions de production, mais tous appartiennent au genre *Vitis*. Ce dernier contient deux principaux sous-genres, soit *Muscadinia* Planch. et *Euvitis* Planch (Winkler et al., 1974; Olien, 1990). *Muscadinia* contient des espèces qui sont présentes en Amérique du Nord et au Mexique, dont seulement quelques-unes sont transformées en vin. Le sous-genre *Euvitis* forme de plus grandes grappes que *Muscadinia*, et il contient plus de 60 espèces différentes. Les espèces du sous-genre *Euvitis* sont cultivées en Europe, en Amérique, en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Asie. Parmi celles-ci, *Vitis vinifera* L. est l'espèce la plus commercialisée au monde et est responsable de la production de plus de 90% des vins. Les autres espèces de *Euvitis* sont souvent utilisées pour générer des hybrides de *V. vinifera* L. (Zhang et al., 1990; Alleweldt et al., 1991; Mullins et al., 1992; Clark et Rand, 2007). Ces espèces de vigne sont ensuite divisées en différents cépages ou cultivars, tels que Cabernet Sauvignon et Chardonnay. En 2012, on comptait environ 5000 cépages différents de vignes cultivés dans le monde (Pouzoulet, 2012). Dépendamment du cépage, les conditions optimales de croissance peuvent être très différentes.

1.2. Influence du climat sur la qualité des raisins

Parce que le goût des raisins est influencé par la combinaison de nombreux facteurs, il n'existe pas de site parfait sur lequel tous les cépages de vignes peuvent être cultivés. On doit cependant constater que les viticulteurs préfèrent des régions à plutôt haute latitude où la température n'est pas extrêmement tropicale (Shaw, 1999). En effet, les températures élevées des pays qui sont à proximité de l'Équateur ne permettent pas aux vignes de croître (Karvonen,

2016). Selon certaines études, les vignes plantées dans les régions tempérées de l'hémisphère nord qui sont situées aux latitudes moyennes produisent des raisins idéaux pouvant produire du vin ayant un équilibre entre l'acidité, le sucre et l'alcool (Becker, 1985; Shaw, 1999). La température pendant la saison de croissance est donc l'un des facteurs cruciaux pour la viticulture, et elle joue un rôle important dans la physiologie des vignes, la composition nutritionnelle des raisins, et sur le goût du vin (Coombe, 1987; Clark et Rand, 2007). Par exemple, les raisins mûrs de la Vallée de la Barossa, en Australie, ont tendance à contenir plus de sucres que ceux qui sont produits à Bordeaux, en France. Ce phénomène s'explique par le fait que le climat est plus chaud à Barossa qu'à Bordeaux. Pour cette raison, les vins australiens ont un goût plus alcoolique que ceux de la France (Clark et Rand, 2007). D'autres éléments influençant la viticulture, comme la composition chimique du sol et le taux de CO₂ dans l'air, qui sont variables d'un pays à l'autre, et même d'un vignoble à l'autre (Clark et Rand, 2007; Schultz, 2010). On parle alors de terroir.

1.3. Chiffres sur la production et la consommation des vins mondiale

Selon l'étude menée par *the Wine Institute* (2017), plus de soixante pays ont produit des vins au cours des cinq dernières années. Les pays producteurs de vins sont classés selon leur origine géographique (Liang, 2015). Ainsi, les producteurs de l'Ancien Monde regroupent ceux qui sont actifs dans les pays européens et qui sont implantés depuis des siècles. Les producteurs des États-Unis, de l'Argentine, du Chili, et de l'Océanie sont considérés comme faisant partie du Nouveau Monde (Liang, 2015). La viticulture étant une pratique très bien implantée dans les régions de l'Ancien Monde, la superficie totale couverte par les vignobles surpasse celle de tous les vignobles des autres pays producteurs. De ce fait, les pays européens produisent plus de vins que les pays du Nouveau Monde (OIV, Avril 2016). Par contre, selon cette étude, en 2015, la plus forte hausse de productivité a été observée au Chili, avec une augmentation annuelle de 28%. Néanmoins, à ce jour, les trois pays qui produisent le plus de vins demeurent l'Italie, la France et l'Espagne, avec une production respective de 49,5, 47,5 et 37,2 mhl (millions d'hectolitres) en 2015. La contribution de ces trois pays est considérable si l'on considère que 274,4 mhl de vins ont été produits au total par tous les pays du monde en 2015. Il existe un équilibre entre la production de vin et sa consommation annuelle. Ainsi, en 2016, 242 mhl de vins ont été consommés, ce qui équivaut à 91% des vins produits (OIV, Avril 2017). Les trois pays qui contribuent le plus à cette grande consommation de vins sont, depuis 2011, les États-Unis, la France et l'Italie avec respectivement 27,0, 22,5, et 20,2 mhl. Ces chiffres montrent

l'importance de la viticulture sur le plan économique. En effet, il s'agit d'une pratique profitable, car les vignes peuvent être cultivées dans divers sols et sous divers climats. En fait, plusieurs cépages ont tendance à produire des raisins de haute qualité lorsqu'ils poussent sous conditions de stress, telles que dans un sol pauvre en nutriments (Bisson et al., 2002). Ces fruits peuvent ainsi se transformer en un produit de valeur.

1.4. Développement du marché de vins international

En 2015, le marché international du vin a atteint plus de 42,4 milliards de dollars canadiens. Il s'agit d'une augmentation de 10,6% par rapport à l'année précédente (OIV, Avril 2016). Tandis que l'Espagne a exporté le plus de vins en quantité parmi tous les pays du monde, la valeur totale monétaire des vins exportés par la France était la plus élevée. Cela s'explique par le fait que l'Espagne produit des vins de bas prix contrairement à la France et à l'Italie, et ces pays sont connus aujourd'hui comme étant les trois exportateurs dominants. D'un autre côté, les importateurs principaux sont les États-Unis, l'Angleterre et l'Allemagne. À part ces régions, les pays asiatiques ont augmenté énormément leur consommation de vins dans les dernières années (Mariani et al., 2012). À ce titre, la Chine commence à montrer un grand intérêt dans la viticulture, le volume total de vins mis sur le marché domestique a augmenté de 132% en cinq ans, et la quantité importée s'est accrue de 44% entre 2014 et 2015 (OIV, Avril 2016; Agriculture et Agroalimentaire Canada, Octobre 2016). Ces chiffres soulignent que la contribution de l'Asie à la croissance du marché mondial de vins devient de plus en plus indéniable. En effet, grâce à la participation de nombreux pays dans différents continents, le marché mondial du vin continue de progresser (Figure 1), ce qui confirme l'importance de viticulture.

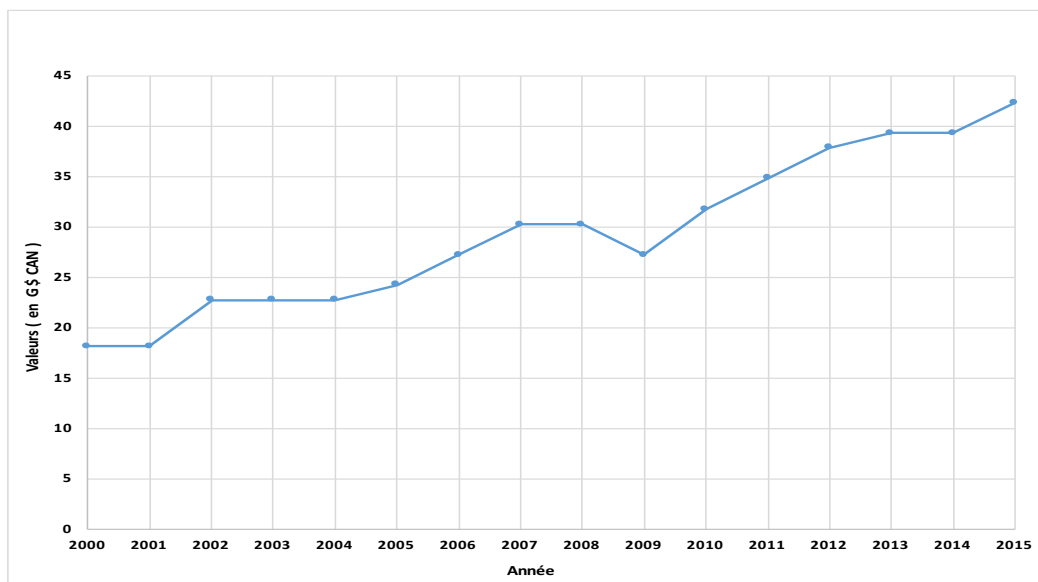


Figure 1 : Croissance du marché mondial du vin entre 2000 et 2015, en milliards de \$ CAN

Figure adaptée du rapport rédigé par l'OIV en avril 2016.

2. Viticulture et son importance au Canada

2.1. Viticulture au Canada

Le climat de certains pays nordiques n'est pas favorable à la viticulture. Par exemple, en Europe du Nord et en Amérique du Nord, dans les pays où la température peut descendre en dessous de 0°C au printemps, les bourgeons risquent de geler ce qui peut ralentir la production de raisins, ou même détruire certaines parties de la plante. Les cépages qui bourgeonnent et fleurissent tôt dans l'année, en avril par exemple, ne sont donc pas adaptés à de tels environnements (Karvonen, 2016).

Au Canada, le climat des provinces de l'est est très différent de celui des provinces de l'ouest. Pour cette raison, les industries viticoles ne sont pas également réparties dans toutes les provinces, mais elles sont concentrées dans certaines régions dont les conditions géographiques et climatiques favorisent la croissance de vignes. En effet, les principaux vignobles canadiens sont situés en Colombie-Britannique, dans la région de Niagara, dans le Parc national de la Pointe-Pelée en Ontario, en Nouvelle-Écosse, et dans le sud du Québec (Shaw, 1999; Shaw, 2001; Shaw, 2002). Parmi ces régions, 60% des vignobles canadiens sont

situés en Ontario, et 33% en Colombie-Britannique. Le Québec et la Nouvelle-Écosse occupent respectivement 5% et 3% des vignobles au Canada (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2013).

2.2. Viticulture au Québec - Caractéristiques du climat québécois

Le Québec pratique la viticulture depuis plus de trente ans, alors que l'hiver y est sévère et long (ADVQ, Août 2007). Comme cela a été mentionné précédemment, le climat du Québec n'est généralement pas approprié à la viticulture, principalement à cause de la saison froide qui dure plusieurs mois. À titre d'exemple, *V. vinifera* L., l'espèce de vigne la plus commercialisée dans le monde, ne tolère pas la température inférieure à -24°C (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2013). Mais certaines vignes, particulièrement les cépages hybrides, sont capables d'endurer une température aussi froide que -40°C. De plus, une épaisse couche de neige permet de protéger la plante lorsque la neige tombe avant que les premiers grands froids de l'hiver arrivent. Normalement, une longue période estivale bien chaude et sèche favorise une meilleure croissance de vignes (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2013). Au Québec, puisque la température en été est assez élevée, suffisamment de chaleur peut être accumulée pour réchauffer les vignes pendant tout le reste de la période de croissance (Karvonen, 2016).

2.3. Viticulture au Québec

Pratiques culturales. Même si l'accumulation de neige pendant l'hiver et la température élevée pendant l'été permettent la viticulture au Québec, il faut des pratiques culturales particulières (Dubois et Deshaies, 1997). Une fois que les cépages appropriés et les conditions de culture ont été déterminés expérimentalement, les vignes doivent être entretenues soigneusement chaque année. Comparée aux autres pays, la saison de croissance végétale au Québec est plus courte de quelques semaines pour les vignes (Dubois et Deshaies, 1997; Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2013). En plus des opérations standard pratiquées dans tous les vignobles dans le monde, certaines étapes particulières sont nécessaires pour la viticulture dans les pays nordiques, comme le buttage et le débutage. Le buttage consiste à couvrir les pieds des vignes avec la terre du vignoble, habituellement au début du novembre, pour que les plantes puissent se protéger contre le froid et le grand gel. À la fin d'avril ou au début de mai, la terre est enlevée pour que les bourgeons puissent se développer (Dubois et Deshaies, 1997). La taille est également l'une des pratiques importantes pour la croissance des vignes dans tous

les vignobles du monde, mais elle n'est pas toujours pratiquée à la même saison. Généralement, la taille estivale sert à contrôler le feuillage, tandis que la taille printanière vise à garder seulement les sarments productifs. Cela diminue le nombre de grappes par vigne, ce qui permet de concentrer le plus possible de nutriments dans ces fruits (Dubois et Deshaies, 1997; Jackson, 2008).

Cépages. Comme mentionné précédemment, seulement certains cépages sont adaptés aux conditions de froid intense. Aujourd'hui, une cinquantaine de cépages hybrides interspécifiques sont cultivés dans des vignobles québécois. Il s'agit de vignes qui résultent du croisement entre l'espèce *V. vinifera* et les espèces typiques de l'Amérique du Nord (Dubé et Turcotte, 2011). Les cépages hybrides ainsi créés acquièrent une bonne tolérance au gel, tout en conservant les caractéristiques de *V. vinifera* qui est nécessaire pour la production de raisins de cuve. Un autre avantage du croisement interspécifique avec les espèces nord-américaines est qu'il permet d'augmenter la résistance aux microorganismes et insectes phytopathogènes. La culture de vignes hybrides nécessite donc moins de pesticides (Jackson, 2008; Cadle-Davidson et al., 2011).

En 2016, 62,8% de la surface totale des vignobles québécois était couverte par dix cépages qui comprennent cinq blancs et cinq rouges. Parmi ceux-ci, le Frontenac noir couvre plus de 26% de la superficie viticole québécois (Association des vignerons du Québec, 2016). De plus, le climat froid du Québec est favorable à la culture de certains cultivars célèbres, tels que le Chardonnay et le Pinot noir (BMO Capital Markets Economic Research, 2012).

2.4. Développement du marché viticole canadien

Dans les dernières décennies, l'industrie viticole est rendue importante dans le monde, mais aussi au Canada. Récemment on constate une augmentation dans la consommation des vins canadiens. Par exemple, la consommation annuelle de vin était en moyenne de 22 bouteilles par personne en 2011, alors qu'elle n'était que de 13 bouteilles en 1995. Au même moment, on observait une diminution de la consommation de bières et de spiritueux de 8% en 2011 (BMO Capital Markets Economic Research, 2012). De plus, à l'échelle internationale, le Canada est situé parmi les dix plus grands pays importateurs de vin. En 2015, il était placé au sixième rang mondial, après avoir importé 4,1 mhl de vin (OIV, Avril 2016). La production de vins canadiens n'est pas énorme, ce qui explique un faible taux d'exportation ainsi qu'un taux élevé d'importation (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2016). Cependant, la vigne est la seule plante fruitière, au Canada, dont la surface et le marché continuent de s'agrandir au cours des

vingt dernières années (Vincent, 2002). Ainsi, la viticulture et le marché du raisin au Québec et au Canada sont en pleine expansion, et leur avenir est prometteur (Lasnier et al., 2002).

3. Maladies dévastatrices du bois de la vigne

Plusieurs microorganismes, tels que les virus, les bactéries, les nématodes et les oomycètes, sont capables d'infecter les vignes (Armijo et al., 2016). Parmi ceux-ci se retrouvent des champignons. Ces derniers peuvent non seulement provoquer des lésions mortelles, mais ils peuvent même être des vecteurs de transmission des virus phytopathogènes (Ward et al., 2004).

Les maladies cryptogamiques qui attaquent le bois sont les maladies de vigne les plus destructives (OIV, 2016). En général, elles entraînent tôt ou tard la mort des vignes infectées, ce qui oblige les vignerons à éliminer la majorité des vignes de leurs vignobles. Par conséquent, de nouvelles vignes plus résistantes aux maladies doivent y être implantées, et cela peut entraîner la perte de la typicité et de la qualité d'un vin d'une région en particulier (Larignon et al., 2009). Le coût du remplacement de toutes les vignes mortes ou malades dans le monde est estimé à plus de 1,5 milliard de dollars par année (Hofstetter et al., 2012). Pour minimiser les dommages, les viticulteurs ont recours à plusieurs solutions. Il y a quelques années, l'application de l'arsénite de sodium (AsNaO_2) était la pratique la plus courante et la plus efficace, car ce produit toxique était capable de tuer la plupart des champignons pathogènes des vignes. Mais son utilisation a été bannie en 2001 à cause de sa toxicité pour la santé humaine et l'environnement (Larignon et al., 2008). Aujourd'hui, il n'existe encore aucun antifongique légal ou méthode curative qui peut éliminer plusieurs espèces de champignons d'un seul coup (Rubio et Garzon, 2011; OIV, 2016). C'est pour cela que les vignerons essaient plusieurs pratiques culturales pour prévenir l'établissement des pathogènes sur leurs plantes. Par exemple, ils protègent les blessures de tailles pendant la saison de sporulation des champignons en les couvrant avec des sacs en plastique ou bien en y appliquant un mélange d'antifongiques. Puisque les plaies de taille constituent le site principal d'infection, cette pratique peut grandement réduire le risque de maladies du bois de la vigne (Diaz et Latorre, 2013).

Le type et la sévérité des maladies causées par des champignons qui se multiplient dans la partie boisée des vignes dépendent du climat, des cultivars et des espèces fongiques qui sont présentes dans chaque région. Par exemple, en Californie, *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.

colonise plus facilement le cultivar Cabernet Sauvignon que le Chardonnay (Úrbez-Torres et al., 2013). Le vignoble où on retrouve beaucoup de Cabernet Sauvignon est donc plus susceptible à la maladie de l'excoriose que le vignoble de Chardonnay. Au Québec, la présence des maladies de l'excoriose et de l'esca a déjà été rapportée (Nancy Shallow, communication personnelle, 2016). De plus, les viticulteurs dans les autres provinces du Canada signalent l'apparition des symptômes reliés à l'eutypiose, au pied noir et au *black dead arm* (Nancy Shallow, communication personnelle, 2016).

Le présent projet concerne un total de dix espèces fongiques, chacune étant responsable d'au moins l'une des cinq maladies qui seront décrites prochainement. La majorité d'entre elles sont des ascomycètes appartenant à différents genres. Cette section du travail présente la description de l'histoire et des caractéristiques de chacune des cinq maladies cryptogamiques du bois de la vigne. Également, les mycètes qui en sont responsables seront présentés, ainsi que les espèces ayant été étudiées en profondeur au cours de ce projet.

3.1. Excoriose

3.1.1. Historique de l'excoriose

L'excoriose est une maladie prévalente sur presque tous les continents, même dans des vignobles au Canada (Coleman, 1928; Shaw, 1999; Phillips, 2000; O'Gorman et al., 2009). Par exemple, au XIX^e siècle, elle a été décrite sous divers noms: « anthracnose ponctuée » (Fabre et Dunal, 1853) et « faux *black-rot* » (Viala et Ravaz, 1886). En ce temps-là, en Europe, la cause de la maladie a été attribuée aux deux champignons, *Phoma flaccida* et *Phoma reniformis* (Viala et Ravaz, 1886), qui constituaient en réalité une seule espèce, *Fusicoccum aesculi* (Phillips et Lucas, 1997).

L'exact terme « excoriose » a été utilisé pour la première fois en 1925 en France, lorsque la maladie était apparente dans de nombreuses régions dans ce pays (Viret et al., 2017b). À cette époque, on croyait que le pathogène responsable de l'excoriose en Europe n'était plus *F. aesculi*, mais plutôt *Neofusicoccum parvum* (Ravaz et Verge, 1928). En effet, *F. aesculi* était capable de causer le dépérissement de la vigne alors qu'il n'était nécessairement pas responsable de l'excoriose. (Julien Vivancos, communication personnelle, 2017) Aux États-Unis,

le champignon causal de la maladie dont les symptômes ressemblaient à ceux de l'excoriose européenne s'est révélé être ***Phomopsis viticola*** (Branas, 1967; Bugaret, 1987).

La littérature à cette époque l'appelait « *Dead-arm disease* » en anglais. Dans les années 1970 aux États-Unis, à cause de la découverte de la présence de *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. chez les vignes, les chercheurs ont conclu que les symptômes foliaires de l'excoriose étaient causés par *E. lata* (Moller et Kasimatis, 1981; Sosnowski et al., 2007; Úrbez-Torres et al., 2013). Or, les tests de pathogénicité ont révélé que *P. viticola* était capable de causer le « *dead-arm* » à lui seul, mais certains symptômes décrits dans des littératures à l'époque n'étaient pas parfois reproductibles par l'inoculation de cette espèce sur le bois de la vigne (Úrbez-Torres et al., 2013). En 1976, les chercheurs ont donc séparé le « *dead-arm* » en deux maladies : « *Phomopsis cane and leaf spot* » causée par *P. viticola*, et « *Eutypa dieback* » associée à *E. lata*. En français, on considère la première comme étant la « vraie » maladie de l'excoriose, et la dernière étant l'eutypiose, qui sera discutée dans la section 3.2. Finalement, il est maintenant accepté mondialement que *P. viticola* est le seul agent pathogène responsable de l'excoriose (Larignon, 2016).

3.1.2. Symptômes de l'excoriose

L'excoriose commence à se développer habituellement pendant la saison printanière et pluvieuse. Elle ne se transmet pas rapidement d'une vigne à l'autre, mais elle progresse lentement au fil des nombreuses années pour toucher ultimement l'ensemble des plantes dans un vignoble (Phillips, 2000). Les symptômes apparaissent dans plusieurs parties herbacées, incluant les feuilles, les fruits et les rameaux. Une fois infectées, les feuilles des vignes présentent des taches noires entourées de couleur jaunâtre sur les nervures et les limbes. Au cours du temps, elles finissent souvent par se déformer, se déshydrater et même tomber. Quant aux fruits, ceux qui sont matures risquent d'être infectés de manière plus grave que les jeunes baies. La peau des raisins malades se noircit et durcit, car elle est couverte par les organes de fructification de *P. viticola*. Ils finissent par se ratatiner avant de tomber (Laplante, 2006; Larignon, 2016; Viret et al., 2017b). Les lésions les plus typiques de l'excoriose apparaissent souvent sur les rameaux. En été, les tiges des vignes infectées par *P. viticola* seront couvertes de tâches nécrotiques noirâtres et allongées, tandis qu'elles deviennent souvent décolorées et remplies de petits points noirs, qui constituent des pycnides de champignons, en hiver (Figure 2) (Larignon, 2016; Viret et al., 2017b).



Figure 2 : Lésions typiques de l'excoriose sur la tige de vigne observées en été et en hiver.

L'image A compare une tige saine (gauche) et une tige atteinte de l'excoriose qui sont observées au début d'été. L'image B présente l'apparence d'un sarment en santé (haut) et celle d'un sarment malade (bas) en hiver. Figure adaptée de (Viret et al. 2017b).

Parmi les cinq maladies étudiées dans ce projet, celle qui est la plus prévalente dans des vignobles au Québec semble être l'excoriose (Nancy Shallow, communication personnelle, 2016). À titre d'exemple, le cultivar de Chaunac est très sensible à l'infection par *P. viticola* (Laplante, 2006). En effet, la maladie s'est avérée dévastatrice dans des régions fraîches où les précipitations printanières sont abondantes (Viret et al., 2017b).

3.1.3. Protection contre l'excoriose

L'excoriose peut réduire de moitié la productivité de certains vignobles (Pine, 1958; Berrysmith, 1962; Pscheidt et Pearson, 1989). Dans la plupart des vignobles du monde, des mesures préventives sont prises plutôt que les mesures curatives pour lutter contre cette maladie. Elles consistent à détecter la présence de signes d'infection, tels que les pycnides à la base des tiges, et à enlever les parties symptomatiques des vignes lors de la taille printanière. On peut également utiliser des cépages résistants à l'excoriose plutôt que ceux qui sont sensibles à la maladie. Toutefois, lorsque les plantes sont sévèrement affectées, on n'a pas d'autre choix que de les remplacer au complet pour prévenir la propagation de spores dans tout le vignoble (Laplante, 2006; Viret et al., 2017b).

3.1.4. Espèces associées à l'excoriose

Alors que plusieurs espèces fongiques différentes sont souvent isolées à partir du bois de la vigne manifestant des symptômes de l'excoriose, la majorité d'entre elles font partie du genre *Diaporthe*, dont la forme anamorphe s'appelle *Phomopsis* qui comprend plus de 1000 espèces

(Uecker, 1988). Selon des études effectuées aux États-Unis, les espèces isolées à partir des vignes malades comprennent *Phomopsis viticola*, *Diaporthe eres* Nitschke, *Diaporthe ambigua* Nitschke, et *Phomopsis fukushii* Tanaka & S. Endô (Baumgartner et al., 2013; Úrbez-Torres et al., 2013). Il a été rapporté que *Phomopsis amygdali* et *Diaporthe phaseolorum* peuvent aussi faire des dommages ressemblant à l'excoriose (Julien Vivancos, communication personnelle, 2017). Par contre, comme mentionné dans la section 3.1.1, *P. viticola* est l'agent principal de cette maladie en Amérique du Nord puisque cette espèce est beaucoup plus virulente que les autres colonisateurs des vignes (Úrbez-Torres et al., 2013). Les tests de pathogénicité ayant été effectués récemment ont démontré que cette espèce est capable de reproduire les symptômes de l'excoriose sur des fruits, des tiges, le bois, et aussi sur des feuilles (Cragnolini et al., 2009; Úrbez-Torres et Gubler, 2009b; Úrbez-Torres et al., 2013). Ceci étant dit, le présent travail assume que le seul agent principal relié à l'excoriose au Québec est *P. viticola*.

3.2. Eutypiose

3.2.1. Historique de l'eutypiose

L'eutypiose est présente dans la majorité des vignobles au monde, incluant le Canada (Moller et al., 1977; O'Gorman et al., 2009). Sa présence n'a cependant pas encore été rapportée dans les vignobles québécois. Le terme eutypiose a été employé pour la première fois en 1977 (Galet, 1977), mais sa première description a été faite en Angleterre au XIX^e siècle, lorsqu'un abricotier a été affecté. Ainsi, le premier isolement de l'agent pathogène, *E. lata*, a été effectué en 1900 à partir de l'abricotier en Écosse. Entre les années 1920 et 1960, les cas d'eutypiose sur l'abricotier ont été rapportés en Australie, aux États-Unis, et aussi dans les autres pays de l'Europe (Sosnowski et Wicks, 2010). Par la suite, le champignon a été identifié pour la première fois sur la vigne en 1978 (Moller et Kasimatis, 1978). À cette époque, il était appelé *Eutypa armeniaca*, mais on lui a attribué le nom officiel *E. lata* en 1984 (Rappaz, 1984).

3.2.2. Symptômes de l'eutypiose

En général, les cas d'eutypiose sont fréquemment rapportés chez les vignes adultes plutôt que chez les vignes jeunes, probablement parce que cette maladie se développe lentement sur le bois (Safodien, 2007). Mais il est souvent difficile de trouver les vignes affectées par cette

maladie puisque les lésions noires dans le tronc et dans les branches sont couvertes par l'écorce et donc ne sont pas visibles. Donc, pour diagnostiquer la maladie, on doit observer des symptômes plus apparents et typiques qui se développent surtout sur des sarments et aussi sur des feuilles en printemps (Fallot et al., 1997; Larignon, 2016). Les jeunes tiges atteintes de l'eutypiose sont clairement affaiblies et montrent une croissance beaucoup plus ralentie que les sarments sains (Figure 3) (Viret et al., 2017a). Il faut souligner que les symptômes de l'eutypiose ne ressemblent pas à ceux de l'excoriose, présentés dans la section précédente, même si la partie de la vigne la plus affectée par les deux maladies est commune, soit la tige. Dans le cas de l'eutypiose, les sarments dépérissent sans changer de couleur, alors que l'excoriose provoque soit un blanchissement ou soit un noircissement de tige, dépendamment de la saison. En plus des tiges, des feuilles peuvent également être affectées par l'eutypiose pendant la période printanière, habituellement 3 à 8 ans après l'infection par *E. lata* (Duthie et al., 1991; Tey-Rulh et al., 1991; Bertsch et al., 2013). Elles deviennent généralement petites, pâles, enroulées, et partiellement noires à cause de la nécrose (Larignon, 2016; Viret et al., 2017a). Au cours du temps, on constate fréquemment la déshydratation et la chute des feuilles. Quant aux grappes, les symptômes observés comprennent l'apparition de fruits de grandeurs variées, le dessèchement, et la chute des baies (Bertsch et al., 2013; Viret et al., 2017a). Ultimement, cette maladie se propage d'une branche à l'autre de la même vigne, et elle cause la mort prématurée de la plante (Fallot et al., 1997).

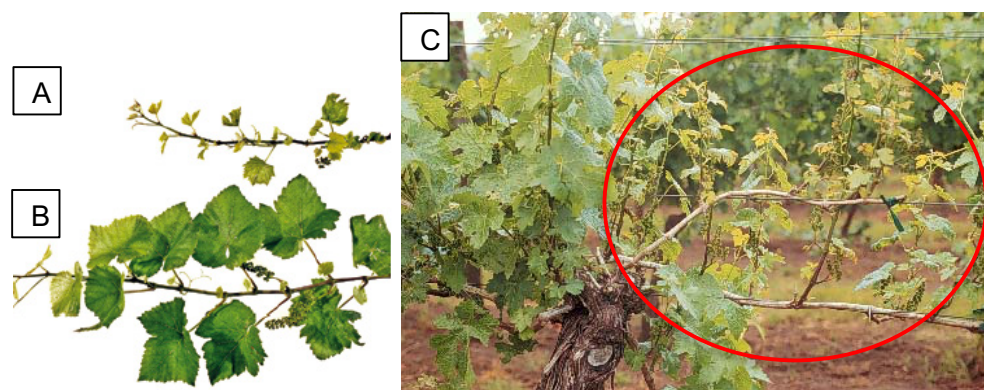


Figure 3 : Comparaison entre le sarment atteint de l'eutypiose (A), le sarment sain (B) et le cep malade (C)

Ayant une tige mince ainsi que des feuilles chlorotiques et enroulées, le sarment malade (A) semble être plus fragile que le sarment sain (B). Figure adaptée de (Viret et al., 2017a). L'image 3C montre le cep infecté par *Eutypa lata* (<https://pnwhandbooks.org/plantdisease/host-disease/grape-vitis-spp-eutypa-dieback>).

Il n'existe pas encore de cépages résistants à l'eutypiose, mais il y en a certains qui sont plus sensibles que d'autres. Par exemple, le Cabernet Sauvignon est plus affecté par la maladie que le cépage Savagnin (Fallot et al., 1997; Camps, 2008). De plus, la sévérité des symptômes foliaires de l'eutypiose varie d'une année à l'autre chez la même vigne (Fallot et al., 1997). À titre d'exemple, le taux d'incidence de l'eutypiose a diminué de 10 à 30% dans tous les vignobles investigués au sud de l'Australie entre 2001 et 2002, mais il a remonté l'année suivante. Cela signifie qu'une vigne infectée peut perdre l'expression de tous les symptômes foliaires pendant une année, et que ceux-ci peuvent réapparaître l'année suivante (Fallot et al., 1997; Sosnowski et al., 2007).

3.2.3. Protection contre l'eutypiose

Aujourd'hui, l'eutypiose reste une maladie cryptogamique encore difficile à contrôler, car l'agent pathogène se dissémine facilement. En effet, le transport de ses spores se passe toute l'année, et ce, à chaque fois qu'il y a une précipitation de 0,5 mm ou plus (Moller et Carter, 1965). Les mesures de lutttes sont pratiquement les mêmes que celles qui sont employées pour lutter contre l'excoriose. Pour la prévention, il est recommandé d'effectuer la taille de la vigne le plus tardivement possible, car les plaies qui sont créées tôt dans la saison sont exposées à l'air plus longtemps, et donc elles ont plus de chance d'être en contact avec les spores de *E. lata*. Il s'agit d'une méthode prophylactique qui peut être employée pour protéger la vigne contre toutes les maladies du bois de la vigne. Mais, même avec cette mesure de protection, il est évident que quelques spores peuvent rentrer par les blessures de taille, si les champignons sont déjà présents dans le vignoble. Dans un tel cas, comme décrit dans le paragraphe 3.1.3, les plantes entières doivent être arrachées et brûlées pour éliminer complètement les traces du pathogène (Catal et al., 2007; Viret et al., 2017a).

3.2.4. Espèces associées à l'eutypiose

L'agent pathogène principalement associé aux symptômes de l'eutypiose est ***Eutypa lata*** (Carter, 1988; Rolshausen et al., 2006). Sa forme anamorphe est *Libertella blepharis*, et il est parfois appelé par son synonyme, *Eutypa armeniacae* (Cortesi et Milgroom, 2001). C'est un ascomycète qui peut infecter au moins 80 espèces de plantes, telles que des abricotiers et des

vignes (Carter, 1957). Il semble que cette espèce se retrouve particulièrement dans des vignobles qui reçoivent plus de 250 mm de précipitation annuellement (Carter, 1988). Au cours de l'infection du bois de la vigne, ce champignon est capable de produire des toxines qui sont considérées comme la cause des symptômes foliaires, puisque le pathogène reste dans des parties boisées et ne se déplace pas vers les feuilles (Tey-Rulh et al., 1991; Mahoney et al., 2005). L'eutypine est un exemple des substances qui sont sécrétées par *E. lata* et qui migrent vers les organes herbacés de la vigne pour affaiblir la plante que le mycète colonise (Tey-Rulh et al., 1991; Fallot et al., 1997). Retrouvée dans la sève, la tige, les feuilles et les fleurs des vignes infectées, l'eutypine s'accumule dans les cellules de ces plantes et contribue au développement des symptômes de l'eutypiose (Deswarte et al., 1994; Amborabe et al., 2001).

L'équipe de Catal a rapporté le cas de la co-colonisation de *E. lata* et de *Eutypella vitis* (Schwein.) Ellis & Everh. chez les vignes du Massachusetts (Catal et al., 2007). De plus, d'autres espèces ont été observées sur la vigne atteinte de l'excoriose dans plusieurs pays dans le monde. Elles comprennent *Diatrype whitmanensis*, *Diatrype stigma*, *Cryptosphaeria pullmanensis*, et *Cryptovalsa ampellina* (Trouillas et Gubler, 2010; Trouillas et al., 2010). Par contre, on ne les a pas encore trouvées dans des vignobles canadiens, et donc le présent travail considère que l'agent principal pouvant causer l'eutypiose au Québec dans les prochaines années est *E. lata*.

3.3. Esca

3.3.1. Historique de l'esca

Le complexe de l'esca est présent particulièrement dans les pays de l'hémisphère nord, incluant le Canada (O'Gorman et al., 2009), mais elle est aussi prévalente en Australie et en Afrique du Sud (Pascoe et Edwards, 2002 et White et al. 2011a dans Larignon 2016). Les cas ont déjà été rapportés dans les vignobles au Québec, et elle est la deuxième plus commune parmi les cinq maladies étudiées au cours de ce projet (Nancy Shallow, communication personnelle, 2016).

Cette maladie a commencé à être étudiée intensément en France au début du XX^e siècle. À cette époque, on l'appelait « l'apoplexie », car les vignes atteintes se dépérissaient soudainement sans montrer des symptômes visiblement graves (Rolland, 1873; Ravaz, 1909; Vinet, 1909; Viala, 1922). En effet, les vignes malades présentaient des symptômes à l'intérieur

du bois, mais ceux-ci n'étaient habituellement pas visibles par une observation des parties externes de la plante (Surico, 2009). En 1922, le terme « esca » a été attribué à cette maladie pour la première fois (Viala, 1922). En 1926, les premiers symptômes visibles de l'esca ont été décrits, et il s'agissait des symptômes foliaires. Dans les années qui suivaient, les autres symptômes, tels que la nécrose des feuilles et la formation de pourriture sur le bois, ont été graduellement acceptés comme étant indicatifs de l'esca.

Depuis la fin du XX^e siècle, il y a beaucoup de discussion sur la nature de la maladie et sur la classification de ses symptômes. Proprement dit, l'esca regroupe cinq syndromes : 1) rayures de bois (souvent apparents dans le porte-greffe), 2) maladie de Pétri, 3) jeune esca, 4) pourriture blanche, et 5) esca propre. Les trois premiers touchent les jeunes vignes et sont causés par les mêmes champignons, mais leurs symptômes sont légèrement différents entre eux. Par exemple, la maladie de Pétri cause la chlorose des feuilles chez les vignes âgées de 1 à 7 ans (Edwards et al., 2007), tandis que le jeune esca provoque leur tigrure ainsi que la formation de stries dans le tronc et dans les branches chez les plantes ayant 10 ans et moins (Graniti et al., 2000; Surico, 2009). De plus, le jeune esca peut éventuellement progresser en esca propre plus tard (Graniti et al., 2000). Le quatrième syndrome est normalement provoqué par un basidiomycète. Le dernier, nommé l'esca propre, est le résultat de la cooccurrence du jeune esca et de la pourriture blanche sur la vigne adulte. Dans les publications récentes, le terme « esca » désigne souvent l'esca propre. Aujourd'hui, la discussion sur cette sous-division des symptômes de l'esca continue encore, et certaines études plus récentes commencent à leur proposer de nouveaux noms de syndromes (Graniti et al., 2000; Surico, 2009).

3.3.2. Symptômes de l'esca

Les cinq sous-divisions du complexe de l'esca ont été présentées brièvement dans le paragraphe 3.3.1. Mais aujourd'hui les gens utilisent les termes « esca » et « esca propre » de façon interchangeable dans la vie courante. Donc, pour faciliter la compréhension, seulement l'esca propre sera traité dans les sections restantes de ce travail, et il sera appelé esca simplement.

L'esca comprend une large gamme de symptômes sur différentes parties végétales, ce qui provoque tôt ou tard la mort totale de la plante. En effet, le complexe de l'esca peut prendre l'une des deux formes suivantes. La forme dite « chronique » ou « lente » cause la mort de l'hôte en quelques années, alors que les vignes atteintes de la forme « apoplectique » meurent plus rapidement, en quelques mois (Fischer et Kassemeyer, 2003). En effet, la forme

apoplectique de l'esca apparaît soudainement pendant la saison estivale, chaude et sèche. Elle cause l'élargissement de tâches nécrotiques sur des feuilles, ainsi que le dessèchement complet des feuilles et de la plante entière en quelques heures (Mugnai et al., 1999; Viret et al., 2017c). Dépendamment de différents facteurs, tels que l'âge de la vigne et le climat, les symptômes de la forme chronique de l'esca sur des feuilles et des fruits varient grandement d'une année à l'autre. Les feuilles atteintes de l'esca présentent souvent des zones chlorotiques qui sont jaunâtres chez les cépages blancs et rougeâtres chez les cépages rouges (Mostert et al., 2006; Viret et al., 2017c). Quant aux fruits affectés, ils exhibent des petits points bruns et mauves (Mostert et al., 2006). Par contre, les symptômes sur le bois sont assez stables. Ceux-ci comprennent plusieurs formes de décoloration. Les symptômes les plus typiques et stables de l'esca sont en fait la formation de stries noires et de zones nécrotiques à l'intérieur du bois, suivie par l'apparition de pourritures blanches ou noires, dépendamment des espèces fongiques responsables, sur l'écorce. La décoloration du bois dans le premier stade est causée par des ascomycètes, tandis que la pourriture est formée plus tard par des basidiomycètes (Surico, 2009).

Les symptômes dans des parties boisées de la vigne sont causés par les champignons eux-mêmes. Cependant, les symptômes sur les feuilles et les fruits sont le résultat de carence en nutriment et aussi des toxines sécrétées par les microorganismes et transportées via des vaisseaux (Mugnai et al., 1999; Fischer et Kassemeyer, 2003; Viret et al., 2017c). Par exemple, les champignons associés à l'esca produisent des fractions de polypeptides qui peuvent modifier le métabolisme des cellules végétales, ainsi que certaines enzymes oxydatives qui catalysent l'oxydation de phénol en quinone, un composé qui inhibe l'activité des protéines et des hormones végétales (Bertsch et al., 2013).

3.3.3. Protection contre l'esca

Les mesures de lutte contre les deux maladies qui ont été présentées précédemment dans les paragraphes 3.1.3 et 3.2.3 peuvent être appliquées pour prévenir l'infection des vignes par les champignons responsables de l'esca. De plus, une étude qui a été menée en Brésil en 2016 a montré l'activité antifongique de plusieurs produits envers *Phaeomoniella chlamydospora* qui est l'un des deux ascomycètes responsables de l'esca. Ces antifongiques incluent le pyraclostrobin, le mancozeb, le difeconazole et le tebuconazole (Rusin et al., 2016). Parmi ceux-ci, le mancozeb est utilisé par certains vignobles au Québec (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2006).

3.3.4. Espèces associées à l'esca

L'esca est causé par un groupe de divers champignons. Comme décrit au paragraphe 3.3.2, les symptômes les plus apparents de ce complexe de maladies est la formation de stries noires dans le bois, ainsi que l'apparition de pourriture sur l'écorce. La première partie des symptômes est causée par les premiers colonisateurs les plus communs qui sont *Phaeomoniella chlamydospora* Crous & W. Gams et *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai. En effet, ce sont les deux espèces qui sont souvent isolées à partir des lésions du bois de la vigne affectée par l'esca, mais celle qui est la plus retrouvée dans la nécrose centrale semble être *P. chlamydospora* (Mugnai et al., 1999). Une fois que les premiers colonisateurs ont causé des lésions dans le bois, un second colonisateur, souvent un basidiomycète, vient pousser sur l'écorce. Le deuxième colonisateur n'est pas toutefois considéré comme étant la cause de l'esca. Un tel organisme est appelé « champignon de la pourriture blanche » puisqu'il forme une sorte de moisissure blanche par-dessus la lésion causée par des ascomycètes. Il s'agit de *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. en Europe, et *Fomitiporia polymorpha* M. Fisch. en Amérique du Nord (Fischer, 2002; Morales-Cruz et al., 2015).

D'un autre côté, certaines études démontrent la présence des espèces des genres *Botryosphaeria*, *Diplodia* et *Fusicoccum*, chez les vignes affectées par la maladie de l'esca. Notamment, l'étude effectuée en France par Bruez et al. montre que *Diplodia seriata* De Not. est l'espèce la plus abondante isolée du bois de telles vignes. Cela est probablement dû aux erreurs d'identification des maladies, car les symptômes de l'esca et ceux du *black dead arm* (section 3.5.4), causé par *D. seriata* et les espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*, se ressemblent fort (Bruez et al., 2014).

En résumé, le présent travail considère que l'esca au Québec est causé principalement par *P. chlamydospora* et *P. aleophilum*, créant une lésion qui sera ensuite colonisée graduellement par *F. polymorpha*. Cela signifie que *F. polymorpha* ne peut pas être détecté si *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* ne se sont pas installées au préalable sur la vigne. Ainsi il suffit pour nous de repérer seulement l'un des deux premiers champignons colonisateurs pour prédire si la plante est atteinte de l'esca. Les seuls pathogènes ciblés dans ce projet sont donc *P. chlamydospora* et *P. aleophilum*.

3.4. Pied noir

3.4.1. Historique du pied noir

Le pied noir est une maladie cryptogamique du bois de la vigne présente dans la majorité des vignobles de différents pays, incluant le Canada (O'Gorman et al., 2009; Petit et al., 2011). Les cas de vignes atteintes du pied noir ont commencé à être rapportés à partir du début des années 1990 (Oliveira et al., 2004). C'est donc une maladie du bois de la vigne relativement récente, mais son taux d'incidence augmente de plus en plus dans le monde (Halleen et al., 2004; Oliveira et al., 2004). Il y a encore beaucoup de confusion concernant les espèces fongiques responsables du pied noir, ainsi que leur nomenclature.

3.4.2. Symptômes du pied noir

Il affecte surtout les jeunes vignes âgées de 2 à 8 ans (Gubler et al., 2004). Les symptômes visibles comprennent l'affaiblissement et le dessèchement du tronc, la nécrose des feuilles, l'absence de développement de nouveaux bourgeons, ainsi que le ralentissement de la croissance de la vigne (Oliveira et al., 2004). Or, les lésions caractéristiques du pied noir apparaissent habituellement sur les parties végétales immergées sous le sol, mais aussi à la base du cep. En effet, les racines sont les parties les plus sévèrement affectées par les champignons associés au pied noir. Elles présentent habituellement des tâches noires et nécrotiques au centre et ne se développent que peu profondément dans le sol (Scheck et al., 1998; Larignon, 2016). Également, on constate le développement de deux plateaux de racines qui poussent parallèlement au sol (Halleen et al., 2004) (Figure 4). Les symptômes chez les vignes adultes sont similaires à ceux qui sont présents chez les jeunes plantes qui ont été décrites ci-haut. Par contre, les vignes âgées ont tendance à dépérir et à mourir plus lentement (Gubler et al., 2004).



Figure 4 : Les exemples de symptômes observés sur les racines de la vigne atteinte du pied noir

L'image A compare la racine saine (gauche) et la racine atteinte du pied noir (droite). Les signes de nécrose noirs sont présents sur la plante malade. L'image B montre la formation d'un double plateau de racines sur la même vigne. Figure A adaptée de <http://www.villaappalaccia.com/esca.html>, Figure B adaptée de Probst, 2011.

3.4.3. Protection contre le pied noir

Jusqu'à présent, il n'y a aucune méthode de contrôle préventive à long terme contre la maladie du pied noir (Petit et al., 2011). Toutefois, certaines mesures prophylactiques peuvent être entreprises pour essayer de minimiser la propagation de la maladie dans les vignobles. Par exemple, les cépages hybrides nord-américains qui sont résistants au phylloxera, un insecte qui s'attaque aux vignes, semblent être susceptibles à l'infection par les champignons du pied noir (Scheck et al., 1998; Halleen et al., 2006a). Il est donc recommandé de bien examiner la susceptibilité de chacun des cépages contre la maladie avant de les planter dans un nouveau vignoble. Également, l'utilisation de fongicides et le traitement à l'eau chaude ont pu contrôler le pied noir dans certains pays (Julien Vivancos, communication personnelle, 2017).

La caractéristique du pied noir est que les champignons peuvent contaminer aussi bien le sol que les racines. Ainsi, la désinfection du sol par fumigation et/ou par rotation des cultures peut être efficace pour réduire la quantité de spores dans la terre. À titre d'exemple, les plantes de moutarde peuvent être cultivées dans le vignoble avant d'y planter les vignes (Damm et Fourie, 2005).

3.4.4. Espèces associées au pied noir

Le pied noir est associé à plusieurs espèces fongiques qui appartiennent à l'un des genres suivants : *Ilyonectria* (= téléomorphe du genre *Cylindrocarpon*) ou *Campylocarpon* (A. Cabral et al., 2012). Selon Agusti-Brisach et al., les espèces associées au pied noir sont « ***Cylindrocarpon liriodendri*** J.D. MacDon. & E.E. Butler, ***Cylindrocarpon macrodidymum*** Schroers, Halleen & Crous, ***Cylindrocarpon pauciseptatum*** Schroers & Crous, *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous, et *Campylocarpon pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous. » (Agusti-Brisach et al., 2011). Toutefois, l'implication des deux dernières espèces de *Campylocarpon* dans le développement du pied noir est remise en question aujourd'hui, car elles n'ont été retrouvées que dans les vignobles en Afrique du Sud et en Uruguay (Halleen et al., 2004; Abreo et al., 2010; A. Cabral et al., 2012). Malgré que les espèces causant le pied noir varient d'une région à l'autre, les deux principaux champignons sont considérés comme étant ***Ilyonectria liriodendri*** (Halleen, Rego & Crous) P. Chaverri & C. Salgado et ***Ilyonectria macrodidyma*** (Halleen, Schroers & Crous) P. Chaverri & C. Salgado selon les études récentes (Halleen et al., 2004; Petit et Gubler, 2005; Halleen et al., 2006b; Alaniz et al., 2007). Ce sont les téléomorphes du genre *Cylindrocarpon*. En plus de ces deux espèces fongiques, *C. pauciseptatum* a aussi été isolée à partir des racines des vignes malades dans plusieurs pays: en Slovénie, en Nouvelle-Zélande, en Uruguay, en Espagne, au Portugal et en Brésil (Schroers et al., 2008; Abreo et al., 2010; Ana Cabral et al., 2011; Martin et al., 2011; Santos et al., 2014b). Le test de pathogénicité a confirmé que *C. pauciseptatum* est capable de provoquer des lésions nécrotiques dans les racines de la vigne (Alaniz et al., 2009).

Jusque tout récemment, les chercheurs pensaient que *Cylindrocarpon destructans* était l'un des agents pathogènes principaux du pied noir, car l'isolement de ce champignon à partir des lésions de la vigne était souvent rapporté (Rego et al., 2000; Petit et al., 2011; Probst, 2011). Son implication dans le développement du pied noir a pourtant été fréquemment discutée et remise en question depuis longtemps. Tandis que plusieurs auteurs ont indiqué la présence de ce champignon chez les vignes affectées par le pied noir, Halleen et al. ont finalement montré en 2006 que les souches isolées de plantes atteintes du pied noir et identifiées comme *C. destructans* étaient en vérité *I. liriodendri* (Halleen et al., 2006a; Petit et Gubler, 2007; Chaverri et al., 2011).

Ainsi, même aujourd'hui, l'identification des champignons du genre *Ilyonectria* est souvent erronée, et cela apporte beaucoup de confusion. Ce problème est dû au fait qu'on a encore tendance à identifier les espèces fongiques en se basant sur l'observation de leur morphologie. Comme les colonies du genre *Ilyonectria* sont très similaires les unes des autres, il est fortement conseillé de révéler leur identité par séquençage d'un gène. Mais ce dernier ne permet pas toujours de régler le problème, car le séquençage de la région ITS (*Internal Transcribed Region*) n'est pas suffisant pour tirer une conclusion. En effet, puisque les séquences d'ADN des espèces appartenant au genre *Ilyonectria* ne sont pas assez divergente, il est essentiel d'effectuer des séquençages sur plus de deux gènes. Dans le présent projet, les gènes codant pour la bêta-tubuline et l'histone H3 ont été séquencés, en plus de la région ITS, pour confirmer l'identité des souches des champignons du pied noir (Petit et Gubler, 2005; A. Cabral et al., 2012). De telles analyses multigéniques permettent de mieux différencier les espèces phylogéniquement proches.

En résumé, le présent projet considère que *I. liriodendri*, *I. macrodidyma*, et *C. pauciseptatum* sont largement impliqués dans le développement des symptômes du pied noir des vignes au Canada. Ces trois espèces fongiques seront traitées dans ce travail.

3.5. Black dead arm

3.5.1. Historique du BDA

Le *black dead arm* (BDA), ou le « bras mort noir » en français, est une maladie du bois observée dans des vignobles dans plusieurs pays en Europe (Lehoczky, 1974a; Cristinzio, 1978; Larignon et al., 2000; Rego et al., 2009), en Amérique du Sud (Auger et al., 2004), et en Amérique du Nord (Úrbez-Torres, 2011). Elle est aussi présente au Canada, mais dans les provinces autres que le Québec (Nancy Shallow, communication personnelle, 2016). Le terme « *black dead arm* » a été utilisé pour la première fois en Hongrie en 1974 (Lehoczky, 1974a). Depuis ce temps, plusieurs symptômes foliaires ont été décrits, tels que la formation de taches rougeâtres avec le contour jaune (Larignon et al., 2001). De plus, on observe une coloration noire dans les tissus vasculaires des zones ligneuses, ce qui est l'origine du terme « *black dead arm* » (Julien Vivancos, communication personnelle, 2017). Puisque ces symptômes ressemblaient à ceux de l'esca, certains auteurs concluent que le BDA n'est pas une maladie bien distincte, mais est

plutôt une phase transitoire de l'esca (Lecomte et al., 2006). Par contre, d'autres études plus approfondies sur les symptômes foliaires de l'esca et du *BDA* montrent qu'ils sont clairement deux maladies différentes (Larignon et al., 2001; Larignon, 2012; Bertsch et al., 2013).

3.5.2. Symptômes du *BDA*

Le *BDA* se manifeste sous deux formes chez les vignes âgées de plus de 8 ans : la forme sévère (ou apoplectique) et la forme douce (ou chronique). Dans les deux cas, les symptômes commencent toujours par apparaître sur des feuilles pendant la saison printanière. Ultimement les deux formes provoquent la chute des feuilles (Larignon et al., 2001).

La forme douce de cette maladie produit des taches nécrotiques de couleurs différentes sur le contour des feuilles, soit rouge vin, chez les cépages noirs et jaune-orange chez les cépages blancs. Le flétrissement des fleurs et des fruits peut être observé (Larignon et al., 2001; Úrbez-Torres et al., 2006). D'un autre côté, la forme sévère du *BDA* typiquement entraîne le dépérissement et la défoliation rapide de plusieurs tiges. Elle est habituellement accompagnée par un dessèchement des fleurs et des fruits, comme dans le cas de la forme douce (Larignon et al., 2001; Úrbez-Torres et al., 2006; Larignon et al., 2009). Des lésions peuvent aussi se retrouver dans le bois où une nécrose sectorielle de couleur grise se crée (Larignon et al., 2001; Úrbez-Torres et al., 2006).

3.5.3. Protection contre le *BDA*

Aucune méthode de contrôle efficace contre le *BDA* n'a encore été trouvée jusqu'à présent. Il est difficile de développer une méthode qui prévient complètement le *BDA*, car de nombreuses espèces différentes sont impliquées dépendamment des régions ou des pays. La prévention peut être efficace dans un pays, mais pas dans une autre région (Úrbez-Torres, 2011). Aujourd'hui, la mesure la plus pratiquée semble être encore l'excision de la partie infectée de la vigne. L'application des antifongiques après la taille, préférablement pendant une période sèche, est fortement recommandée dans certains pays (Sosnowski et al., 2008; Sosnowski et al., 2010). Récemment, une autre méthode de taille a été développée, et elle était plus ou moins efficace contre les champignons associés au *BDA*. La technique s'appelle une double-taille, qui consiste à effectuer une première taille globale au début de l'hiver, et une dernière taille pendant la saison sèche lorsque la chance d'infection des plaies de la vigne par les spores est minimisée.

(Úrbez-Torres et Gubler, 2009a). Toutes ces techniques ne sont pas nécessairement pratiquées au Québec encore.

3.5.4. Espèces associées au *BDA*

Le *black dead arm* est causé par un complexe de différents champignons appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*. Tout d'abord, les symptômes ont été attribués à *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., dont la forme téléomorphe est appelée *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker, en Hongrie (Lehoczky, 1974b). Par la suite, d'autres espèces du même genre ont été associées au *BDA* qui a émergé dans plusieurs pays : ***Botryosphaeria dothidea*** (Moug.) Ces. & De Not., ***Neofusicoccum parvum***. (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips et ***Diplodia seriata*** De Not. (Savocchia et al., 2007). Depuis leur découverte en tant que pathogènes du bois de la vigne, plusieurs tests de pathogénicité ont été effectués. Tandis que la virulence de *B. dothidea* a pu être confirmée en 2003, celle de *N. parvum* a été vérifiée l'année suivante en inoculant la culture fongique sur une pousse verte excisée et sur la vigne plantée. Dans les deux cas, *N. parvum* a été considéré comme étant l'une des espèces de la famille *Botryosphaeriaceae* les plus virulentes (van Niekerk et al., 2004; Úrbez-Torres, 2011). Un peu plus tard, l'implication de *D. seriata* dans le développement des lésions associées à *BDA* a été confirmée (Úrbez-Torres et al., 2008). Finalement, les études plus complètes et récentes qui ont examiné la virulence des trois espèces et celle des autres espèces de la même famille ont montré que *N. parvum* est classé parmi les plus virulents, et que *B. dothidea* et *D. seriata* sont considérés comme étant modérément virulents (Luque et al., 2009; Úrbez-Torres et Gubler, 2009b; Úrbez-Torres et al., 2010a; Úrbez-Torres et al., 2010b).

Ainsi, le présent projet traitera de *B. dothidea*, *N. parvum* et *D. seriata* en tant que trois agents pathogènes qui provoquent les lésions associées au *black dead arm*.

Tableau 1 : Résumé de toutes les maladies cryptogamiques étudiées dans ce projet, ainsi que les espèces fongiques qui en sont responsables

Maladies cryptogamiques	Espèces fongiques
excoriose	○ <i>Phomopsis viticola</i>
eutypiose	○ <i>Eutypa lata</i>
esca	○ <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ○ <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
pied noir	○ <i>Ilyonectria liriodendri</i> ○ <i>Ilyonectria macrodidyma</i> ○ <i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>
black dead arm	○ <i>Botryosphaeria dothidea</i> ○ <i>Diplodia seriata</i> ○ <i>Neofusicoccum parvum</i>

4. Cycle d'infection des champignons pathogènes du bois de la vigne

Concernant les cinq maladies du bois de la vigne qui ont été décrites dans la section précédente, les cycles d'infection et de propagation de différents champignons phytopathogènes se ressemblent entre eux.

Habituellement les champignons phytopathogènes restent pendant un certain temps sur le bois qu'ils ont infecté et colonisé, même après la mort de la plante. À ce stade, ils sont sous la forme de périthèce qui renferme des spores (Safodien, 2007). Pendant la saison des pluies, des gouttes d'eau tombent sur l'organe de fructification pour que les spores se disséminent. Ces champignons peuvent voyager sur une très longue distance pour finalement atterrir au site d'infection primaire, soit les plaies de taille. Ces dernières sont créées pendant une période fixe de l'année, qui commence vers la fin de l'automne et qui termine vers le début du printemps, dépendamment des régions (Rolshausen et al., 2010). Outre ces blessures du bois générées

par les humains, celles qui sont causées par des stress environnementaux et des animaux ravageurs sont également sujettes à la colonisation fongique. Une fois que les spores ont réussi à rentrer dans le xylème de la vigne, ils vont traverser vers l'extérieur, soit le cambium et le phloème, pour finalement germer et se multiplier dans la partie du vaisseau juste en dessous de l'écorce (Petzoldt et al., 1983; Rooney-Latham et al., 2005; Eskalen et al., 2007; Safodien, 2007; Úrbez-Torres et Gubler, 2009b). Pendant ou suivant ce processus de multiplication, les champignons, tout en restant dans des parties boisées de la plante, affectent diverses parties de la vigne pour perturber les fonctions essentielles au maintien de la vie végétale (Rolshausen et al., 2010). Ultimement, les champignons matures généreront des organes de fructification dans lesquels ils survivent sous forme de spores pour se préparer à la prochaine dissémination.

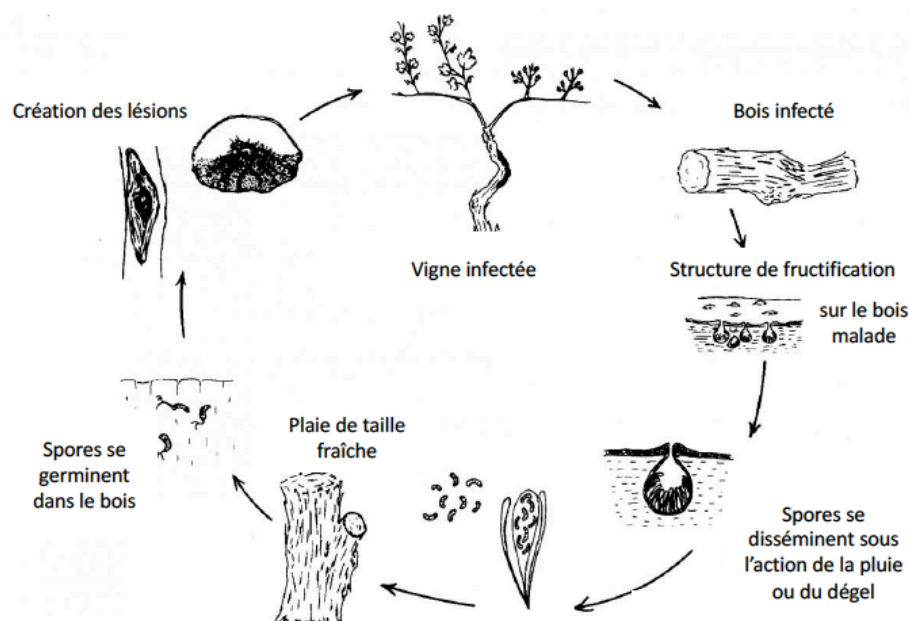


Figure 5 : Cycle général des maladies cryptogamiques du bois de la vigne

Cette illustration résume le cycle général des maladies du bois de la vigne présentées dans ce mémoire. Seule la maladie du pied noir peut avoir une autre source d'infection, soit les champignons qui restent dans le sol. La figure a été adaptée de <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-11>.

D'un autre côté, les champignons associés au pied noir ont leur propre cycle d'infection, qui est légèrement différent de celui des autres maladies. Comme il a été expliqué dans la section précédente, il s'agit d'une maladie qui affecte sévèrement les racines de la vigne. En effet, les espèces du genre *Cylindrocarpon*, responsables des symptômes de cette maladie, sont

capables de produire des chlamydospores qui restent dans les racines infectées et le sol. Lorsque les molécules sécrétées par les racines stimulent la germination de ces chlamydospores dans le sol, les champignons peuvent alors se multiplier et développer des hyphes pour envahir le pied de la plante (Horsfall et Dimond, 1960). Lorsque cette partie est colonisée par les espèces du genre *Cylindrocarpon*, ces dernières décomposent les cellules végétales et des pourritures sèches s'y forment. Ces activités fongiques limitent l'acquisition et le transport des nutriments provenant du sol, ce qui provoque la mort rapide chez les jeunes vignes, mais la mort graduelle chez les vignes plus âgées. Une fois que la vigne est morte, les champignons produisent des chlamydospores dans les racines afin de pouvoir recommencer le cycle d'infection (Petit et al., 2011; Probst, 2011). D'autres pathogènes sont aussi retrouvés occasionnellement dans le sol des vignobles. Par exemple, *P. chlamydospora*, qui est l'un des champignons responsables des symptômes de l'esca, est capable d'infecter des jeunes vignes par voie aérienne ou racinaire (Gubler et al., 2004).

Les champignons pathogènes du bois de la vigne sont donc capables de se propager infiniment, tant qu'il y ait des spores et des vignes vivantes dans l'environnement. Comme ceci a été mentionné précédemment, la meilleure solution à ce jour pour minimiser les dégâts causés par les maladies cryptogamiques du bois de la vigne au Québec est l'élimination complète des plantes infectées. Puisque des traitements aux antifongiques aujourd'hui coûtent cher et qu'ils ne sont pas toujours efficaces contre tous les pathogènes, les viticulteurs ont tendance à simplement brûler des vignes symptomatiques, ce qui cause une diminution d'un grand nombre de sources de raisins.

5. Méthodes de détection des champignons pathogènes

Les premières méthodes de diagnostic des champignons phytopathogènes utilisées par les mycologues en étaient une descriptive et basées sur l'observation des symptômes sur le bois, l'isolement et la culture des champignons sur des milieux sélectifs, ainsi que l'observation de leur morphologie microscopique (Atkins et Clark, 2004). Par contre, puisqu'elles peuvent être longues et ne donnent pas toujours des résultats conclusifs, de nouvelles techniques plus robustes ont été testées et mises en place au cours des 30 dernières années. Ces techniques incluent l'utilisation des anticorps spécifiques aux antigènes des champignons pathogènes, ainsi

que l'utilisation des amorces spécifiques aux régions précises de leurs gènes (PCR) (Atkins et Clark, 2004; Tsedaley, 2015).

5.1. Identification par méthode traditionnelle

Aujourd'hui, la majorité des institutions, laboratoires et banques de cultures fongiques emploient la méthode traditionnelle pour identifier les pathogènes. Elle consiste à cultiver le champignon inconnu sur un milieu sélectif et à observer la morphologie des structures fongiques. Ensuite, ses caractères microscopiques seront également étudiés pour les comparer avec les descriptions publiées (encyclopédie et articles par exemple). Comme certains genres de champignons présentent un phénotype typique et unique, la méthode traditionnelle sert à avoir une idée vague sur l'identité du pathogène. Mais, d'un autre côté, elle ne donne pas un résultat précis et concluant parce que plusieurs espèces peuvent partager le même morphotype, et la même espèce peut parfois présenter un phénotype différent selon le milieu sur lequel elle est cultivée. De plus, non seulement que cette méthode nécessite facilement une ou deux semaines, mais elle ne peut pas être utilisée pour identifier un pathogène incultivable (Tsui et al., 2011; Tsedaley, 2015).

Pour cette raison, certains laboratoires incluent dans leur méthode le séquençage d'un ou des gènes pour une identification plus précise des pathogènes. La technique la plus pratiquée aujourd'hui est certainement le séquençage Sanger des gènes amplifiés par PCR, car il nécessite moins d'argent et de temps d'attente que les autres techniques de séquençage. La cible la plus fréquemment séquencée chez les champignons est la région ITS (*internal transcribed spacer*), qui est décrite en détail dans la section 6.1. Elle est considérée comme étant un code à barres standard d'ADN des champignons et des plantes (Wang et al., 2015). Mais lorsque le séquençage de la région ITS ne fournit pas suffisamment d'informations pour l'identification bien précise d'un champignon, il faut étudier d'autres gènes en parallèle. Parmi plusieurs candidats, les plus communs sont les gènes codant pour le facteur d'élongation 1- α et le bêta-tubuline. On peut ensuite comparer les séquences des gènes obtenues avec celles qui sont déposées dans des banques de données publiques, comme le GenBank, pour identifier le pathogène inconnu.

5.2. Identification par PCR

La PCR (réaction en chaîne par polymérase) conventionnelle qui utilise une paire d'amorces spécifiques à une espèce est une méthode facile qui prend moins de temps que le séquençage (Majumder et al., 2013). Pour ce faire, on cible une région d'un gène qui est particulière chez une espèce fongique, et on dessine une paire d'amorces qui amplifient seulement l'ADN de ce champignon. Ainsi, l'identification des champignons par PCR ne nécessite aucune analyse de séquences, car le résultat du test est obtenu en migrant les produits PCR sur le gel d'agarose. De plus, cette technique est de plus en plus employée pour diagnostiquer la maladie des plantes puisqu'elle est facile à entreprendre et sensible, ce qui signifie qu'un champignon peut être détecté même s'il n'est présent qu'en faible quantité dans l'environnement (Tsedaley, 2015). Or, l'utilisation de PCR pour la détection des champignons peut causer des problèmes lorsque la région ou le gène cible n'est pas sélectionné de manière attentive. En effet, même aujourd'hui, il existe plusieurs erreurs dans les séquences déposées dans des bases de données publiques, surtout dans celles des champignons (communication personnelle, Jose Ramon Urbez-Torres, 2017). Donc si on se base sur une séquence erronée d'un gène fongique pour dessiner des amorces, la réaction développée risque d'entraîner un résultat faux-négatif ou faux-positif (détection d'une espèce autre que la cible).

Plusieurs autres techniques basées sur le principe de PCR sont étudiées et développées dans le but d'identifier des champignons pathogènes plus rapidement et plus facilement. Par exemple, le RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe) consiste à générer aléatoirement des fragments de tailles différentes à l'aide de plusieurs amorces courtes ajoutées dans une réaction PCR. Ces produits donnent un profil unique sur le gel, ce qui nous permet d'identifier un champignon en le comparant aux profils des autres champignons de référence (Williams et al., 1990). Le désavantage du RAPD comme outil de diagnostic est qu'il faut avoir une culture pure du champignon inconnu, contrairement à la technique de PCR conventionnelle où les amorces sont spécifiques. Un autre exemple est le PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) qui est une technique comportant plus d'étapes que le RAPD mais aussi plus de précision dépendamment des amorces utilisées. En principe, cette méthode amplifie une certaine région par PCR chez le champignon inconnu, et ce produit PCR est digéré par des enzymes de restriction. Le profil de cette digestion est ensuite analysé pour identifier le pathogène au niveau des espèces (Atkins et Clark, 2004). En 2006, 27 espèces du genre *Phytophthora* ont été identifiées en effectuant la PCR avec une paire d'amorces spécifiques à

ce genre et en utilisant les enzymes de restriction qui génèrent des profils uniques à chacune des espèces (Drenth et al., 2006).

5.3. PCR en temps réel

L'apparition de PCR en temps réel, ou qPCR, a grandement facilité l'identification de champignons phytopathogènes. Lorsqu'on la compare à la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel ne nécessite pas la confirmation du résultat par la migration des produits amplifiés sur le gel d'agarose. Elle est donc la méthode plus rapide et moins laborieuse que la PCR conventionnelle. De plus, une fois qu'on a ajouté tous les réactifs dans le tube (ou dans un puits si on utilise une plaque à 96 puits), ce dernier ne sera pas ouvert jusqu'à l'obtention d'une courbe de résultat. Le risque de contamination croisée est donc moins grand pour la PCR en temps réel que pour la PCR conventionnelle (Schaad et Frederick, 2002).

Principalement il existe deux types de qPCR : non spécifique et spécifique. La qPCR non spécifique se base sur le principe des molécules qui émettent la fluorescence lorsqu'elles s'hybrident sur l'ADN à double-brin. Le fluorophore le plus communément choisi dans ce cas est SYBR Green I (Gudnason et al. 2007 atkins). Comme cette molécule réagit à tous les double-brins amplifiés pendant la réaction, on doit utiliser une paire d'amorces qui est bien spécifique à une espèce fongique pour la détecter à partir d'un groupe de microorganismes environnementaux. De plus, le risque de générer des amplicons non spécifiques et des dimères d'amorces est élevé (Okubara et al., 2005; Edwards et al., 2007). D'un autre côté, la qPCR spécifique utilise une sonde d'hybridation, marquée par un fluorochrome et un *quencher* (« désactiveur » en français), qui cible spécifiquement une séquence d'ADN particulière. Contrairement à la qPCR non spécifique, la qPCR spécifique n'émet pas de signaux fluorescents jusqu'à ce que la sonde s'hybride à son ADN complémentaire, c'est-à-dire l'ADN du champignon cible. L'exemple de la chimie de qPCR spécifique est la technologie TaqMan®.

5.3.1 PCR en temps réel avec la technologie TaqMan®

Parmi plusieurs options de qPCR, la technique de PCR en temps réel avec la technologie TaqMan® (Heid et al., 1996) est employée dans le présent projet. Il s'agit d'une variation de la méthode PCR qui permet d'amplifier la séquence d'ADN ciblée et de suivre la production du produit d'amplification en temps réel par l'émission de fluorescence, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN.

Une sonde TaqMan® est un oligonucléotide, d'environ 25 à 30 bases (Holland et al., 1991; Lee et al., 1993; Mirmajlessi et al., 2015), dont la séquence est complémentaire à celle de l'ADN cible. Son extrémité 5' est attachée à une molécule fluorescente, telle que 6-FAM (= 6-*carboxyfluorescein*), qui est maintenu normalement non-fluorescente par une molécule de *quencher*, liée à l'extrémité 3' de la même sonde. En effet, le *quencher* a le rôle d'inhiber l'émission des signaux fluorescents par le fluorochrome lorsqu'ils sont tous les deux attachés à la même sonde. Le mécanisme de cette inhibition dépend des types de *quencher*. Une fois que ce dernier a absorbé l'énergie transmise par le fluorophore, il peut la libérer sous forme de lumière d'une autre longueur d'onde (s'il est un *quencher* fluorescent) ou il peut rester non-fluorescent (s'il est un *dark quencher*). Dans les deux cas, le *quencher* doit être situé assez proche du fluorophore pour qu'il puisse accomplir sa tâche (Didenko, 2001).

Le déroulement d'une qPCR avec une sonde TaqMan® est illustré dans Figure 6. Suite à l'étape de dénaturation pendant la qPCR, une sonde TaqMan® s'hybride à la séquence d'ADN cible en simple-brin. Elle s'y attache plus rapidement que la paire d'amorces, car la T_m de la sonde est plus élevée que celle des deux amorces utilisées dans la même réaction. Ensuite, pendant l'étape d'élongation, l'ADN polymérase commence la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce sens. C'est pendant cette étape où l'enzyme exerce une activité d'exonucléase 5'-3' et ainsi clive la molécule fluorescente de la sonde TaqMan® pour pouvoir y placer des nucléotides (Schaad et Frederick, 2002). Lorsque cet événement arrive, le *quencher* ne peut plus inhiber l'émission d'énergie du fluorophore libéré, ce qui fait qu'il y a l'émission d'un signal coloré à chaque fois que la polymérase synthétise un nouveau brin d'ADN complémentaire au fragment cible. En effet, dans une qPCR avec une sonde TaqMan®, l'étape d'hybridation et l'étape d'élongation sont souvent combinées ensemble, ce qui réduit le temps total de réaction comparativement à une PCR conventionnelle.

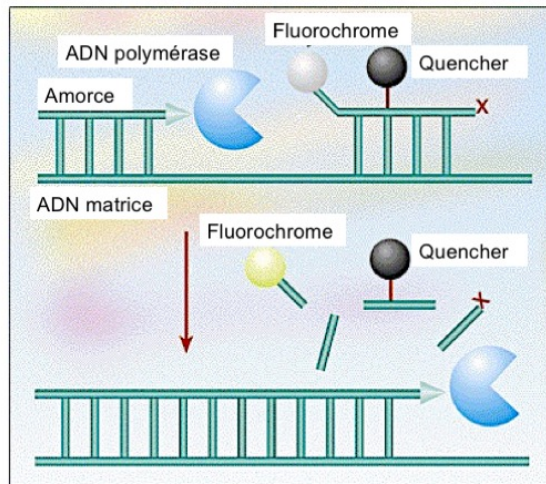


Figure 6 : Fonctionnement de PCR en temps réel avec une sonde TaqMan®

L'ADN polymérase *Taq* synthétise un nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce sens 5'. À l'étape suivante, l'enzyme atteint la sonde et clive le fluorophore de la sonde, ainsi libérant la molécule pour que celle-ci puisse émettre la lumière fluorescente. L'enzyme continue sa tâche jusqu'à la fin de la séquence, et un nouveau cycle de PCR recommence. Figure adaptée de Gene Quantification (<http://dyes.gene-quantification.info>)

Normalement, la PCR en temps réel TaqMan® génère une courbe d'amplification qui décrit le rapport entre l'intensité des signaux fluorescents émis par la sonde et le nombre de cycles de PCR effectués. Comme le montre la figure 7, l'intensité de la fluorescence augmente en fonction du nombre de cycles, parce que plus le nombre de cycles s'élève, plus la séquence cible est amplifiée, et plus la molécule fluorescente est émise à cause du clivage d'un fluorochrome par l'ADN polymérase. Ce qui est important à considérer dans cette courbe est la valeur de Ct, aussi appelé le cycle seuil. Il s'agit du nombre de cycles à partir duquel le signal fluorescent dépasse le niveau seuil prédéterminé (ligne horizontale nommée *threshold* dans la figure 7). Évidemment, quand la quantité initiale d'ADN cible est grande, elle atteint le niveau seuil en moins de temps, c'est-à-dire avec un faible nombre de cycles. C'est pour cette raison que la quantité originale d'ADN dans un tube réactionnel est inversement proportionnelle à la valeur de Ct.

Ces Ct servent donc à quantifier précisément la concentration d'ADN cible présent dans un échantillon au départ. Pour la quantification d'ADN par la technologie TaqMan®, on doit construire une courbe d'étalonnage avec l'ADN cible dilué en série. En effectuant une qPCR en présence de chacune des dilutions de l'ADN cible, on génère une courbe standard, ayant au

moins quatre points, qui illustre le nombre de cycles en fonction de la quantité de cet ADN. Ainsi, on peut se référer à cette courbe pour déterminer la concentration d'ADN qui est présent dans un échantillon inconnu.

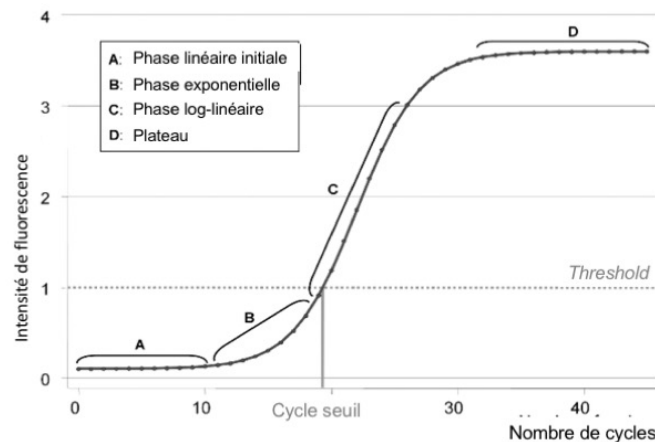


Figure 7 : Courbe d'amplification générée par PCR en temps réel avec une sonde TaqMan®

La courbe illustre l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles. Le cycle seuil, C_t , est indiqué sur l'axe des x et est le nombre de cycles à partir duquel le niveau d'intensité dépasse son seuil, qui est à 1. Figure adaptée de CARAGUEL et al. 2011.

5.3.2. qPCR multiplex en temps réel avec la technologie TaqMan®

Dans le cas de ce projet, la technique de qPCR en temps réel multiplex plutôt que monoplexe est utilisée. Il s'agit d'un type de qPCR qui permet de détecter la présence de plusieurs cibles en une seule réaction. Un tel mélange réactionnel contient généralement deux ou plusieurs séquences d'ADN à amplifier, une ou plusieurs paires d'amorces, ainsi que des sondes TaqMan®, chacune attachée à un fluorophore dont la longueur d'onde d'émission est différente de celle des autres sondes (Tableau 2). En plus de cette détection simultanée de plusieurs pathogènes, un autre avantage de qPCR multiplex dans le cadre de ce projet est que cette technique permet de formuler une hypothèse sur la quantité de plusieurs pathogènes présents dans une réaction. Par exemple, en effectuant une qPCR avec un échantillon environnemental contenant l'ADN de l'espèce A et l'ADN de l'espèce B, on pourrait avoir une idée sur la quantité d'une espèce par rapport à l'autre. Si le C_t correspondant à la quantité de l'ADN de l'espèce A

arrive avant celui de l'espèce B, on peut supposer que l'espèce A est plus abondante que l'espèce B dans cet échantillon.

Tandis qu'il existe plusieurs avantages attribués à la qPCR multiplex, on doit considérer de nombreux critères pour élaborer une telle réaction. L'un des critères les plus importants est la taille de l'amplicon. En effet, la taille idéale devrait se situer entre 50 et 200 pb, mais une longueur jusqu'à 400 pb est tolérée. Un amplicon plus long prend plus de temps à dénaturer et à amplifier, et il risque de se dégrader au fur et à mesure que le nombre de cycles augmente pendant la réaction de qPCR. Ainsi, un amplicon de 200 pb a plus de chance d'être amplifié au complet qu'un amplicon de 500 pb (Integrated DNA Technologies, 2013; Debode et al., 2017; PREMIER Biosoft, s.d.). Dans le cadre de mon projet, les mêmes amorces amplifient la même région cible des pathogènes à détecter, et ce sont les sondes qui font la différenciation des espèces en s'hybridant aux séquences cibles. Il est donc important, non seulement de sélectionner un amplicon qui contient environ 200 nucléotides, mais aussi de pouvoir y trouver des séquences dans lesquelles on retrouve suffisamment de variations interspécifiques.

Lors du design des sondes TaqMan®, on doit respecter les points principaux suivants : 1) la taille qui se situe entre 15 et 30 nucléotides, 2) un contenu en guanine et en cytosine de 30 à 80%, 3) absence d'une guanine à l'extrémité 5' à cause de sa capacité inhibitrice de fluorescence, et 4) une T_m qui est 5 à 10°C plus élevée que celle des amorces pour permettre l'hybridation des sondes avant celle des amorces (Bustin, 2000; Mackay et al., 2002; Integrated DNA Technologies, 2013; PREMIER Biosoft, s.d.). Le dernier critère est particulièrement important. Si la T_m des sondes et celle des amorces étaient identiques, elles s'hybrideraient sur l'amplicon à la même température. Dans cette condition, dès que les amorces se reposent sur la cible, l'amplification commence avant l'hybridation de la sonde. Ainsi, la cible serait amplifiée continuellement sans l'émission de fluorescence. Ce phénomène pourrait grandement diminuer la sensibilité de la réaction. Finalement, une fois que le design des sondes est complété, il est primordial de vérifier que chacune des sondes dessinées ne s'hybride pas sur les amorces et les autres sondes dans une réaction multiplex.

Tableau 2 : Exemples de fluorochromes fréquemment attachés aux sondes TaqMan®, ainsi que leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation (en nm)	Longueur d'onde d'émission (en nm)
FAM	496	516
HEX	538	555
ROX	588	608
Cy5	648	668

Source : Integrated DNA Technologies

6. Gènes ciblés dans ce projet

6.1. Région ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

La région ITS, soit l'abréviation de *internal transcribed spacer*, ou bien *espaceur transcrit interne* en français, est une région d'ADN non-codant chez les eucaryotes. Plus précisément, la région « ITS1 » est située entre le gène de l'ARN ribosomique (=ARNr) 18S et celui de l'ARNr 5.8S, et la région « ITS2 » est placée entre cet ARNr 5.8S et le gène de l'ARNr 28S. Ainsi, la séquence entière qui comprend ITS1, ITS2 et 5.8S est appelée « la région ITS » (Schoch et al., 2012).

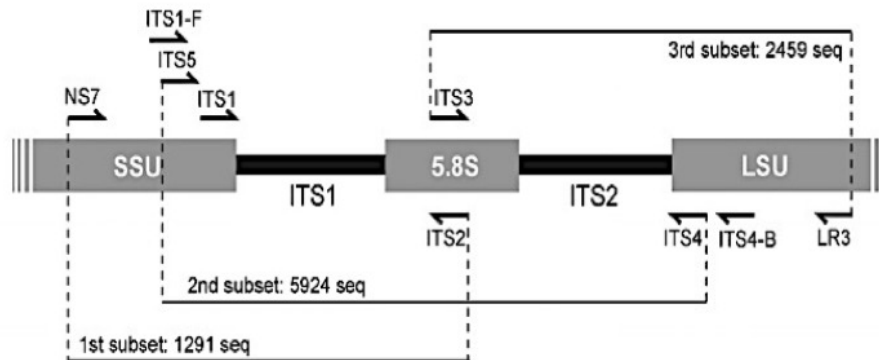


Figure 8 : Organisation d'un opéron de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes.

« SSU » représente le gène de l'ARNr 18S (*Small SubUnit RNA*), et « LSU » désigne le gène de l'ARNr 28S (*Large SubUnit RNA*). (Figure tirée de (Bellemain et al., 2010)).

Cette région d'ADN est aujourd'hui considérée comme étant l'une des excellentes cibles dans le but d'identifier une espèce eucaryote, incluant les plantes (Sass et al., 2007) et les champignons (Koljalg et al., 2013). En mycologie, elle est même devenue un code à barres officiel (Bellemain et al., 2010). En effet, la région ITS possède deux grands avantages, qui lui permettent d'être un marqueur génétique préféré chez des champignons depuis plus de 20 ans. D'abord, elle contient des régions conservées et hypervariables entre les différentes espèces du même genre. Les régions conservées, particulièrement le gène 5.8S, servent à dessiner des paires d'amorces universelles, tandis que les régions hypervariables sont utiles à différencier une espèce de l'autre. De plus, en utilisant la région ITS, le séquençage ne nécessite pas une énorme quantité de cellules fongiques, car le nombre de copies de cette région est assez élevé, pouvant aller jusqu'à 250 copies par cellules. C'est un avantage pour détecter par exemple un champignon dans un échantillon de sol, où la quantité d'ADN fongique n'est pas abondante (Bellemain et al., 2010).

Plusieurs champignons pathogènes ont déjà été détectés par PCR à l'aide des amorces et des sondes d'hybridation qui ciblent la région ITS de ces microorganismes (Edel et al., 2000; Irina et al., 2005). Par exemple, Bernal-Martinez et al. se sont basés sur la séquence de la région ITS1 pour développer une PCR en temps réel multiplex qui permet de détecter des champignons qui sont cliniquement importants (Bernal-Martinez et al., 2013).

Or, l'identification des espèces eucaryotes se base fréquemment sur la séquence de leur ITS2 ou de leur ITS au complet, car les informations concernant les séquences de la région ITS1 ne

sont pas toujours déposées dans des bases de données publiques, telles que NCBI (Wang et al., 2015). Par contre, la région ITS1 a des avantages sur ITS2 lorsqu'on veut la cibler pour effectuer une PCR en temps réel. Par exemple, la taille de la région ITS1 est plus faible que celle de la région ITS2. Comme discuté dans la section 5.3.2, un amplicon court est préférable lorsqu'on effectue une qPCR. De plus, le contenu en guanine et en cytosine dans la région ITS1 est moins élevé que celui de la région ITS2. Une séquence riche en guanine et en cytosine est normalement difficile à amplifier (McDowell et al., 1998). Donc généralement la région ITS1 est amplifiée plus facilement que la région ITS2. De plus, chez les champignons, les animaux et les plantes, les paires d'amorces universelles amplifiant la région ITS1 sont plus efficaces. Celles-ci incluent la paire ITS1/ITS2 (Wang et al., 2015).

6.2. Gène de l'histone H3

Tandis que la région ITS fait partie d'un ADN non codant, le gène de l'histone H3 code pour l'une des quatre protéines histones de cœur (Piontkivska, 2003). Ces dernières jouent un rôle important dans l'organisation de l'ADN eucaryotique et aussi dans la régulation génique par les modifications post-traductionnelles des queues d'histones (Hays et al., 2002). Parmi ces histones de cœur, le gène codant pour H3 sert à construire un arbre phylogénétique des espèces qui sont fortement apparentées (Glass et Donaldson, 1995; Myburg et al., 2002). En effet, chez les protistes et les champignons, la séquence peptidique de H3 montre une grande divergence interspécifique comparativement aux organismes supérieurs. De même, on constate souvent une grande variation nucléotidique dans ce gène qui est suffisante pour pouvoir différencier plusieurs espèces fongiques (Piontkivska, 2003).

Dans le présent projet, le gène de l'histone H3 a été ciblé pour développer une réaction multiplex qui sert à détecter les champignons du pied noir. Il s'agit d'un gène sur lequel on se base très souvent pour révéler l'identité des espèces fongiques qui provoquent cette maladie chez les vignes. Tel que mentionné dans la section 5.1, les autres régions qui sont couramment séquencées pour l'identification de ces champignons incluent le gène de bêta-tubuline, le gène de facteur d'élongation 1- α , ainsi que la région ITS. (A. Cabral et al., 2012; Úrbez-Torres et al., 2014) Mais il a été démontré récemment que le gène de l'histone H3 est le plus fiable parmi ces quatre régions pour identifier les espèces appartenant aux genres *Ilyonectria*, *Cylindrocarpon*, et *Campylocarpon*.

7. La problématique

Parmi les cinq maladies cryptogamiques décrites, l'excoriose et l'esca sont déjà présents dans des vignobles québécois. De plus, l'infection d'un vignoble à l'Île-d'Orléans par les champignons du pied noir a été observée à l'été 2016. Le pied noir se retrouve aujourd'hui dans plusieurs vignobles de différentes régions au Québec (communication personnelle, Caroline Provost, 2017). Les cas de l'eutypiose et du *black dead arm* ont été aussi rapportés dans les autres provinces du Canada, et donc ils ont la possibilité de s'installer au Québec dans un futur proche. Particulièrement, le laboratoire de diagnostic en phytoprotection au MAPAQ s'inquiète de dégâts qui pourraient être causés par les espèces fongiques présentées dans ce mémoire. C'est pour cette raison qu'il y a un besoin pressant de méthodes de détection fiables et rapides des champignons phytopathogènes dans le bois de la vigne. Une détection rapide de ces agents pathogènes avant le développement des symptômes permettrait de prévenir la propagation des champignons et des maladies dans toute la province.

Or, aujourd'hui la majorité des laboratoires identifient les pathogènes fongiques par l'observation de morphologie macroscopique et microscopique, suivie par le séquençage de la région ITS. Cette procédure est généralement longue et laborieuse, car elle nécessite la culture et l'isolement des champignons, et les résultats obtenus ne sont pas toujours concluants. Une meilleure solution plus rapide et plus précise est donc nécessaire pour dépister les vignes malades dans un vignoble, ce qui permettrait de prévenir des conséquences néfastes sur l'activité viticole au Québec.

Avec l'aide offert par le MAPAQ et le CRAM, le présent projet avait comme objectif principal de développer des méthodes de détection des champignons phytopathogènes du bois de la vigne. Dix champignons provoquant les cinq maladies seront ciblés et détectés par PCR en temps réel multiplex avec des sondes TaqMan®. Ces méthodes optimisées seront ultimement fournies au laboratoire de diagnostic en phytoprotection au MAPAQ, qui s'en servira comme un outil de diagnostic de routine pour dépister des vignes malades.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

1. Souches

Au total, vingt-six souches de dix espèces fongiques différentes ont été étudiées au cours de ce projet. Parmi celles-ci, vingt-deux souches nous ont été envoyées directement par le Dr José Ramón Úrbez-Torres, un chercheur au *Summerland research and development centre* (Centre de Recherche et de Développement de Summerland) en Colombie-Britannique. Une souche de *Phomopsis viticola*, un champignon précédemment collecté par le Dr Úrbez-Torres, nous a été fournie par le Dr Florent Trouillas de l'Université de Californie à Davis. De plus, trois souches de *Cylindrocarpon pauciseptatum* ont été isolées à partir des racines des vignes des cépages Vidal, Baltica et Radisson, provenant de l'Île-d'Orléans, qui ont été échantillonnées en été 2016. Les souches sont présentées dans le tableau 3.

Avant de commencer le projet, toutes les souches ont été cultivées sur le milieu solide PDA (*Potato Dextrose Agar*), avec incubation à 25°C pendant au moins 5 jours. Pour une conservation à court terme, ces colonies ont été repiquées sur le milieu PDA frais à tous les trois à six mois, et elles ont été conservées à 4°C. De plus, les cultures ont été conservées à long terme de deux manières. La première méthode consistait à cultiver chaque souche dans un flacon à scintillation en verre de 20 ml contenant une pente de 10 ml de PDA 3,9% supplémenté de carbonate de calcium 1,5% jusqu'à ce que le mycélium couvre toute la surface de l'Agar. Une fois scellé avec du parafilm, ces flacons étaient conservés à 4°C. La seconde méthode a requis un tube de polypropylène de 15 ml de type Falcon contenant de l'eau distillée doublement stérilisée, dans laquelle une dizaine de morceaux de mycélium cultivé sur du PDA étaient déposés.

Tableau 3. La liste des souches étudiées dans le présent projet, ainsi que leurs sources

Espèces fongiques	Souches	Source
<i>Phomopsis viticola</i>	UCD2408Tx	UCD*
<i>Eutypa lata</i>	PARC131	CRDS**
	PARC276	CRDS
	PARC303	CRDS
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	PARC50	CRDS
	PARC100	CRDS
	PARC326	CRDS
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	PARC220	CRDS
	PARC341	CRDS
	PARC369	CRDS
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	PARC32	CRDS
	PARC78	CRDS
	PARC201	CRDS
<i>Diplodia seriata</i>	PARC84	CRDS
	PARC90	CRDS
	PARC91	CRDS
<i>Neofusicoccum parvum</i>	PARC15	CRDS
	PARC37	CRDS
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>	PARC60	CRDS
	PARC72	CRDS
	PARC393	CRDS
<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	PARC345	CRDS
	PARC398	CRDS
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	IAF44	IDO***
	IAF45	IDO
	IAF46	IDO

* UCD = Université de Californie à Davis

**CRDS = Centre de Recherche et de Développement de Summerland.

***IDO = Souches isolées à partir des racines des vignes de l'Île-d'Orléans atteintes du pied noir.

2. Amorces et sondes d'hybridation TaqMan®

Les paires d'amorces universelles utilisées pour développer les réactions multiplex, ITS1(5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3')/ITS2 (5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3') et ITS3 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3')/ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), ainsi que les amorces conçues pour la région du gène de l'histone H3, H3F_1 (5' AGC TTG CTT CCA AGG CTG 3') et H3R_2 (5' GGT GAG GCT TCT TGA CAC C 3'), ont été synthétisées par AlphaDNA (Montréal). Tandis que la séquence des paires d'amorces universelles a été trouvée dans la littérature (Glass et Donaldson, 1995), H3F_1 et H3R_2 ont été dessinées à l'aide des outils en ligne Clustal Omega (EMBL-EBI ; www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) et PrimerQuest® (IDT). De plus, les amorces utilisées pour le séquençage de certaines espèces ont été synthétisées également par AlphaDNA. Elles incluent Bt2a (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCT TTC 3') /Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3'), pour le gène de bêta-tubuline, et EF1-728 (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3')/EF1-986R (5' TACTTGAAGGAACCCTTACC 3') pour le gène du facteur d'élongation 1-alpha.

Les sondes d'hybridation TaqMan® ont été conçues pour s'apparier spécifiquement à leurs espèces cibles. Pour chacun des groupes multiplex résumés dans le tableau 4, une dizaine des séquences de la région ITS chez les espèces cibles qui se retrouvaient dans la banque de données NCBI ont été alignées à l'aide de l'outil Clustal Omega pour trouver les variations nucléotidiques interspécifiques dans cette région. Lorsque la variation dans la région ITS n'était pas suffisamment grande entre les espèces cibles, un autre gène a été ciblé. Les régions cibles utilisées pour développer chacune des quatre réactions multiplex sont indiquées dans le tableau 4. Dans le fond, les séquences qui étaient conservées entre les souches de la même espèce, mais qui contenaient des variations interspécifiques, ont été retenues comme candidates des sondes.

Parmi ces candidates, la séquence, 1) dont la température de fusion (ou « Tm ») était 5 à 10 °C plus élevée que la Tm des amorces, 2) dont le contenu en guanine et en cytosine (= contenu en GC) était compris entre 30% et 70%, et 3) qui ne contenait pas de structures secondaires, a été sélectionnée (Bio-Rad Laboratories, 2006; Abreo et al., 2010; Integrated DNA Technologies, 2013). Il est important que la Tm des sondes soit suffisamment supérieure à celle des amorces, car ainsi la sonde s'attache à son ADN cible avant que les deux amorces puissent s'y lier (Bustin, 2000; Mackay et al., 2002). De plus, lorsque le contenu en GC est supérieur à 70%, la sonde a tendance à se refermer sur elle-même. Quand il est inférieur à 30%, elle risque de ne

pas pouvoir s'hybrider à sa cible (Xia, 2010). En plus de ces critères, une attention particulière a été portée aux extrémités 5' de la séquence de sonde. En effet, la présence de guanine à l'extrémité 5' peut inhiber l'émission de fluorescence (Poitras et Houde, 2002)

Par la suite, les fluorochromes et les *quencher*s ont été choisis pour que les sondes combinées dans une même réaction soient attachées à des fluorochromes dont les longueurs d'onde d'émission sont suffisamment différentes. Plus précisément, HEX et Cy5 ont été utilisés dans une réaction duplex, tandis que HEX, Cy5 et ROX ont été sélectionnés pour effectuer une réaction triplex. Le thermocycleur choisi pour effectuer toutes les réactions qPCR au cours de mon projet était Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science). L'instrument a été sélectionné puisqu'il présentait des avantages par rapport au thermocycleur de Thermo Fisher Scientific. Tandis que ce dernier ne pouvait pas effectuer une réaction triplex en raison du nombre maximal de fluorochromes détectables, on pouvait combiner jusqu'à quatre fluorophores différentes avec Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, 2006).

HEX, ROX et Cy5 émettent un maximum de fluorescence à 555 nm, 608 nm et 668 nm, respectivement. Dans Rotor-Gene™ 6000, leur détection s'effectue individuellement à 555 nm (canal jaune – HEX), 610 nm (canal orange – ROX), et 660 nm (canal rouge – Cy5). Puisque leur signal est capté par les canaux dont les longueurs d'onde de détection sont différentes, les risques d'interférence dans la fluorescence sont minimisés. Les molécules de *quencher* choisies pour chacun de ces fluorochromes sont indiquées dans le tableau 3.

Les dix sondes conçues ont été commandées et synthétisées chez *Integrated DNA Technologies* (IDT; Coralville, CA).

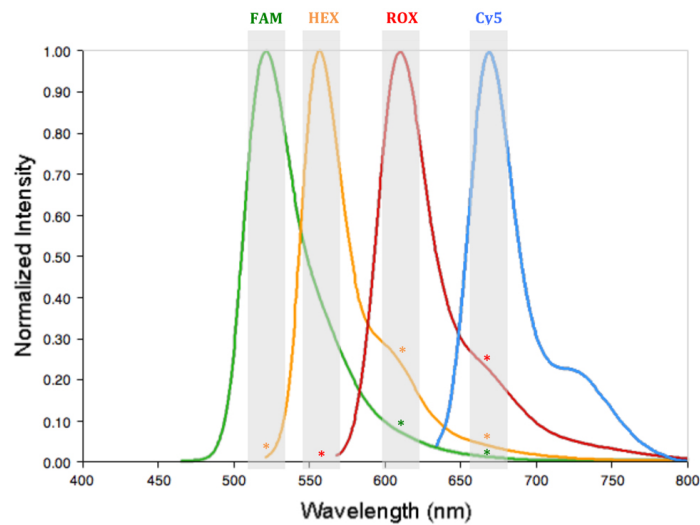


Figure 9 : Longueurs d'onde d'émission maximales des fluorochromes étudiés dans ce projet, ainsi que les longueurs d'onde de détection des canaux vert, jaune, orange et rouge.

Les longueurs d'onde d'émission maximales de FAM, HEX, ROX et Cy5, qui sont commandées chez IDT, sont 520nm, 555nm, 608nm, et 668nm, respectivement. Les longueurs d'onde de détection des canaux vert, jaune, orange et rouge, installés dans le thermocycleur Rotor-Gene 6000, sont 510nm, 555nm, 610nm, et 660nm, respectivement. Tandis que les courbes de ROX et de Cy5 sont colorées en rouge et en bleu, leurs signaux sont détectés chacun par le canal orange et le canal rouge, respectivement. (Figure tirée de www.caister.com)

Tableau 4 : La liste des sondes employées pour toutes les espèces fongiques étudiées, chacune responsable d'une maladie, ainsi que les paires de fluorochromes et *quencher* qui y sont attachés

Groupe (maladie)	Espèces responsables	Nom de la sonde (Séquence 5'→3')	Gène ou région cible	Fluorophore/ <i>Quencher</i>
Multiplex 1 (esca)	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	PC2 (TCCTCTGGGCC CGATCTCCA)	ITS1	5'Cy5/ 3' IBRQ-Sp
	<i>Phaeoacremoni um aleophilum</i>	PA2 (CCTGCCGGAGG GCACAGACT)	ITS1	5'HEX/ 3' IBFQ
Multiplex 2 (pied noir)	<i>Ilyonectria liriodendri</i>	LIR1 (TTTCTCCTGCGC CGACCTGAC)	Histone 3	5'Cy5/ 3' IBFQ
	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	MAC1 (ATCGCCGGCGC GCCATTTA)	Histone 3	5'ROX/ 3' IBFQ
	<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	PAU1 (CCCACCGCATC ATCGTACTGACC)	Histone 3	5'HEX/ 3' IBFQ
Multiplex 3 (black arm) dead	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BD1 (TCCTTTGCGGG CGCGCCTC)	ITS2	5'HEX/ 3' IBFQ
	<i>Diplodia seriata</i>	DS1 (TGTTTCAGCCCTC AAGCGTAGTAG)	ITS2	5'ROX/ 3' IBFQ
	<i>Neofusicoccum parvum</i>	NP2 (TCCACGGACGC GCCTT)	ITS2	5'Cy5/ 3' IBFQ
Multiplex 4 (excoriose et eutypiose)	<i>Phomopsis viticola</i>	PHO1 (ACTCATACCTTA CCGTTGCCTCGG)	ITS1	5'Cy5/ 3' IBRQ-Sp
	<i>Eutypa lata</i>	EUT1 (CCCGGTACCTA CCCTGTAGCTAC C)	ITS1	5'HEX/ 3' IBFQ

Légende : Cy5 = cyanine 5 ; HEX = hexachloro-6-carboxyfluorescein; ROX = 6-carboxyl-X-rhodamine; IBRQ-Sp = Iowa black red quencher IBFQ = Iowa black fluorescein quencher.

MÉTHODES

1. Isolement des souches fongiques associées au pied noir

Alors que la majorité des souches étudiées dans ce projet ont été fournies par le Dr Urbez-Torres (*Summerland Research and Development Centre*), les souches de *C. pauciseptatum* ont été isolées à partir des racines des vignes provenant de l'Île-d'Orléans.

Les racines de vignes de cépages Vidal, Baltica et Radisson provenant d'un vignoble à l'Île-d'Orléans, présentant des symptômes du pied noir, ont été sélectionnées pour tenter l'isolement des champignons pathogènes. Elles ont été ensuite désinfectées en les trempant dans l'éthanol 70% pendant 10 secondes et dans l'eau de Javel 1% pendant 2 minutes. Les racines ont été finalement laissées dans l'eau stérile pendant 5 minutes pour enlever l'eau de Javel qui y restait. Une fois secs, les tissus à l'intérieur des racines et collets ont été taillés à l'aide d'un scalpel. Chacun des morceaux taillés a été coupé en trois pour que chaque partie soit déposée sur un milieu solide additionné d'antibiotiques. Les trois milieux employés étaient le « PDA+3 », le milieu « MEA (*malt extract agar*) +3 », ainsi que le milieu « SNA (*synthetic nutrient agar*) +2 ». La recette détaillée des trois milieux solides est présentée à l'Annexe.

Les étapes 2 à 9 qui suivent ont été effectuées lors du développement de la première réaction multiplex. Par la suite, elles ont été répétées pour développer la deuxième, troisième et quatrième réaction multiplex.

2. Extraction d'ADN fongique

L'extraction d'ADN de toutes les souches a été effectuée de la même manière. La souche a été cultivée dans le milieu liquide YPD (« *Yeast extract Peptone Dextrose* », ou « extrait de levure, peptone et dextrose ») jusqu'à ce qu'il y ait suffisamment de biomasse. Environ 1,5 ml de cette culture pure a été transféré dans un microtube de type Eppendorf et centrifugé à 14000 rpm pendant 10 minutes. Une fois le surnageant décanté, 1 ml de tampon d'extraction (Annexe) et 3 μ l de solution de RNase (stock à 10 mg/ml ; Thermo Scientific) ont été ajoutés au culot. La solution a ensuite été transférée dans un tube FastPrep contenant 150 à 200 mg de billes de verre stériles dont le diamètre était 0,5 mm. Deux cycles de *beadbeating*, avec le programme de 6 m/s pendant 60 secondes, ont été effectués. Une fois que le surnageant a été vidé dans un nouveau tube de type Eppendorf, 1 ml de tampon d'extraction et 3 μ l de solution de RNase ont été ajoutés une autre fois dans le même tube FastPrep, et l'étape de *beadbeating* a été répétée. L'ADN contenu dans le surnageant récupéré des deux microtubes de 1,5 ml a ensuite été précipité à l'acétate d'ammonium à une concentration finale dans chacun des deux tubes de 2M. Suivant deux cycles de centrifugation à 14000 rpm de 15 minutes à 4°C, les surnageant additionnés du même volume d'isopropanol ont été incubés à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, la centrifugation de 30 minutes a été suivie par deux lavages du culot avec de l'éthanol 70%.

Également, le test de différentes trousse d'extraction d'ADN a été effectué, car une trousse commerciale nécessite beaucoup moins de temps de manipulations lorsqu'on la compare à la méthode d'extraction décrite dans le paragraphe ci-haut. Les six trousse d'extraction d'ADN essayées étaient la trousse FastDNA® SPIN for Soil (MP Biomedicals), la trousse DNeasy PowerLyzer PowerSoil (Mo Bio), la trousse DNeasy PowerPlant Pro (Mo Bio), la trousse E.Z.N.A® Fungal DNA Mini (Omega Bio-tek), la trousse E.Z.N.A® Plant DNA Mini (Omega Bio-Tek), et la trousse FavorPrep Soil DNA Isolation Mini (Omega Bio-Tek). Après avoir broyé le bois à l'aide d'un mortier et d'un pilon, les protocoles fournis par les manufacturiers ont été suivis lors d'extraction. L'ADN a été élué dans 40 μ l à 80 μ l d'eau stérile dépendamment des trousse, et la migration a été effectuée sur gel d'agarose 1%. Les aliquotes ont été conservées par la suite à -20°C.

3. Identification des souches fongiques par séquençage des gènes cibles

Le séquençage Sanger était nécessaire pour confirmer l'espèce d'appartenance de chacune des vingt-trois souches fournies, et aussi pour révéler l'identité des souches isolées à partir des racines des vignes atteintes du pied noir. Les gènes séquencés étaient différents d'une espèce à l'autre, dû à une difficulté d'identification de certaines espèces fongiques. Par exemple, les amorces universelles ayant été développées pour l'identification des ascomycètes Bt2a et Bt2b ont été employées pour amplifier une partie du gène codant pour la bêta-tubuline (Glass et Donaldson, 1995), ainsi que EF1-728 et EF1-986R pour le gène de facteur d'élongation 1α (Carbone et al., 1999). Les informations sont résumées au tableau 5.

Tableau 5 : Les régions et les gènes séquencés pour identifier les souches étudiées, ainsi que les paires d'amorces universelles permettant leur amplification

	Espèce	Gène séquencé	Amorces choisies	Taille attendue approximative de l'amplicon*
esca	<i>P. chlamydospora</i>	ITS	ITS1 / ITS4***	520 à 600 pb
	<i>P. aleophilum</i>			
pied noir	<i>I. liriodendri</i>	ITS	ITS1 / ITS4	450 à 700 pb
	<i>I. macrodidyma</i>	BT**	Bt2a / Bt2b	250 à 480 pb
	<i>C. pauciseptatum</i>	H3	H3-1a / H3-1b***	440 à 500 pb
black dead arm	<i>B. dothidea</i>	ITS	ITS1 / ITS4	470 à 600 pb
	<i>D. seriata</i>			
	<i>N. parvum</i>			
excoriose	<i>P. viticola</i>	ITS	ITS1 / ITS4	450 à 550 pb
		Ef1 α **	EF1-728 / EF1-986R	345 pb
eutypiose	<i>E. lata</i>	ITS	ITS1 / ITS4	460 à 610 pb
		Ef1 α	EF1-728 / EF1-986R	270 pb

*Selon les données déposées sur NCBI.

** BT représente le bêta-tubuline, et EF1 α représente le gène de facteur d'élongation 1 α .

***Voir la section « 2. Amorces et sondes d'hybridation TaqMan® » dans le chapitre « Matériel » pour leurs séquences.

D'abord, l'ADN extrait a été amplifié en utilisant la paire d'amorces universelles indiquées dans le tableau 5. Chacune des réactions de PCR, dont le volume était 25 μ L, contenait 2,5 μ L de 10X ThermoPol™ Reaction Buffer (New England BioLabs), 0,5 μ L MgCl₂ 25 mM, 0,25 μ L BSA concentré à 20 μ g/ μ L, 0,5 μ L dNTPs 10 mM, 0,5 μ L de chacune des amorces concentrées à 10 μ M, 0,25 μ L Taq polymérase, au minimum 30 ng d'ADN, et elle a été complétée avec de l'eau distillée stérile. Les régions et les gènes cibles ont été amplifiés à l'aide d'un thermocycleur C1000 Touch™ (Bio-Rad) avec un programme permettant une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, qui était suivie par 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'une période d'hybridation de 30 secondes, et d'élongation à 72°C. Le tout se terminait par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. La température d'hybridation des amorces ITS1/ITS4 était de 57°C, et celle des autres paires d'amorces de 58°C. L'étape d'élongation

durait 1 minute pour amplifier la région ITS, tandis qu'elle était de 30 secondes pour les autres gènes.

Les amplicons ont été migrés ensuite sur un gel d'agarose 1,5% additionné de GelRed dont la concentration finale dans le gel était 0,005%. Ces produits PCR ont ensuite été purifiés sur colonne, en suivant le protocole décrit dans le manuel d'instruction de la trousse EZ-10 Spin Column PCR Products Purification (Bio Basic). L'ADN purifié a été envoyé à l'institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) qui nous fournit des services de séquençage. Tous les résultats de séquençage en format ABI ont été analysés à l'aide du logiciel Geneious R9 (Biomatters Ltd.), et les séquences obtenues ont été comparées avec les données déposées dans GenBank par BLAST.

4. Purification de l'ADN

La purification d'ADN extrait a été nécessaire lors du développement de la réaction duplex permettant de détecter la présence de l'ADN de *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum*. Cette purification permettait d'obtenir une bonne efficacité de réaction duplex. Pour purifier l'ADN fongique, la trousse PowerClean® DNA Clean-Up (Mo Bio) a été utilisée en suivant le protocole indiqué dans le manuel d'instruction du manufacturier.

5. PCR conventionnelle en gradient de température

Avant de procéder à l'amplification par PCR, tout ADN fongique extrait a été quantifié avec la trousse Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific). L'ADN génomique ainsi quantifié a été amplifié par PCR en gradient de température pour déterminer la température optimale d'hybridation des amorces. Elle a été ensuite utilisée dans l'étape d'hybridation/élongation au premier essai de qPCR monoplex.

Une réaction PCR était réalisée dans un volume de 25 µl comprenant 2,5 µl de tampon 10X ThermoPol™ Reaction (New England BioLabs), 0,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,25 µL de BSA 10mM, 0,5 uL dNTP 20 µg/µL, 0,5 µl de chacune des amorces (concentrée à 10 µM), 0,25 µl de Taq polymérase, environ 30 ng d'ADN, et complété avec de l'eau distillée stérile. Le programme PCR comportait une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie par 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une période d'hybridation de 30 secondes

et d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes. Le cycle se terminait par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Les températures d'hybridation testées pour chacune des quatre paires d'amorces étaient les suivantes : 55°C, 57°C, 59°C et 60°C (multiplex #1) ; 60°C, 62°C et 64°C (multiplex #2) ; 60°C et 64°C (multiplex #3) ; 60°C, 62°C, 64°C et 66°C (multiplex #4).

Les produits PCR ont été par la suite migrés sur le gel d'agarose 1,5% pour vérifier la taille approximative des amplicons, l'intensité des bandes, ainsi que l'absence de bandes non-spécifiques.

6. Test du fonctionnement des sondes en condition monoplex

Le thermocycleur utilisé pour toutes les expériences de PCR en temps réel tout au long de mon projet était Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science). L'objectif de cette étape était de s'assurer que l'efficacité de chacune des sondes dans une réaction monoplex soit supérieure à 0,90, et d'optimiser la réaction, au besoin.

Pour ce faire, la dilution en série de l'ADN fongique cible a été effectuée, allant de 3 ng à 3×10^{-3} ng par réaction, et par la suite une réaction monoplex a été effectuée en triplicata pour chacune de ces dilutions.

Une fois que ces réactions ont été complétées et que le seuil (*threshold*) a été ajusté manuellement, une courbe d'étalonnage a été générée de manière automatique par le logiciel RotorGene-6000 series software 1.7. En tenant compte de la pente de cette courbe, l'efficacité de la réaction a été calculée par le logiciel. Une efficacité de 1,00 signifie que la quantité de l'ADN est doublée après chaque cycle de qPCR. Une réaction dont l'efficacité est comprise entre 0,90 et 1,10 est alors considérée comme étant idéale, c'est-à-dire que les amorces et la sonde accomplissent bien leurs tâches ensemble dans cette réaction. L'expérience a été répétée en utilisant toutes les souches de l'espèce cible.

Le mélange réactionnel monoplex contenait 2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), deux amorces, une sonde d'hybridation TaqMan®, ainsi que l'ADN, et il a été complété avec de l'eau exempte de DNase et de RNase (Qiagen). Le volume de chacun de ces réactifs ajoutés dans le mélange réactionnel de base est résumé dans le tableau 6. Toutefois, le volume modifié

et optimisé des réactifs dans chacune des réactions multiplex est indiqué dans le chapitre « Résultats ».

Le programme de qPCR commençait toujours avec une étape d'activation de l'ADN polymérase Hot-Star Taq à 95°C pendant 5 minutes, suivie par 45 cycles de dénaturation à 95C pendant 15 secondes ainsi que d'hybridation/ élongation. Le temps et la température optimisés de cette dernière étape, pour chacune des quatre réactions multiplex, sont aussi présentés dans le chapitre « Résultats ».

Tableau 6 : Recette de base du mélange réactionnel de 20 µL et de 25 µL lors des essais de qPCR monoplex

Réactif (concentration du stock original)	Volume ajouté par réaction de 20 µL (en µL)	Volume ajouté par réaction de 25 µL (en µL)
Master Mix (2X)	10	12,5
Amorce sens (100 µM)	1	1,25
Amorce anti-sens (100 µM)	1	1,25
Sonde (100 µM)	0,4	0,5

Il s'agit d'une recette basée sur les essais de qPCR monoplex effectuée au cours de ce projet. Les volumes des réactifs ajoutés dans le mélange réactionnel de base ont été résumés dans ce tableau. Les volumes d'eau et d'ADN ont été exclus.

7. Test de spécificité

Une fois que le bon fonctionnement de la paire d'amorces commune et des sondes spécifiques dans une réaction monoplex a été confirmé en utilisant toutes les souches des espèces cibles, le test de spécificité, toujours en condition monoplex, a été effectué pour chacune des sondes. L'objectif de cette étape était de s'assurer que les sondes ne détectaient aucun ADN de champignons non ciblés. Pour ce faire, toutes les espèces non ciblées qui étaient disponibles

dans la collection fongique ont été utilisées comme témoins négatifs. L'ADN de l'espèce cible a été utilisé comme témoin positif. Les espèces sélectionnées lors du test de spécificité de chacune des quatre réactions multiplex sont résumées dans le tableau 5. Par exemple, lors du test de spécificité de la sonde PC2, sept espèces constituaient des témoins négatifs, incluant l'ADN de *P. aleophilum*, alors que l'ADN de *P. chlamydospora* agissait comme témoin positif. L'ADN de *C. pauciseptatum* et celui de *P. viticola* n'ont pas été inclus parce que ces espèces n'avaient pas encore été obtenues ou isolées au moment de ce test.

Brièvement, 3 ng d'ADN de chacune des espèces sélectionnées ont été ajoutés individuellement dans des tubes remplis du mélange réactionnel optimisé à l'étape 6 (test du fonctionnement des sondes en condition monoplex). Une souche par espèce a été choisie, et la réaction a été effectuée en triplicata pour chacune des espèces testées.

Tableau 7 : Espèces fongiques utilisées lors du test de spécificité des sondes TaqMan® dans les quatre réactions multiplex

	Multiplex #1	Multiplex #2	Multiplex #3	Multiplex #4
<i>P. chlamydospora</i>	P (PC2)	N	N	N
<i>P. aleophilum</i>	P (PA2)	N	N	N
<i>I. macrodidyma</i>	N	P (MAC1)	N	N
<i>I. liriodendri</i>	N	P (LIR1)	N	N
<i>C. pauciseptatum</i>	-	P (PAU1)	N	N
<i>B. dothidea</i>	N	N	P (BD1)	N
<i>D. seriata</i>	N	N	P (DS1)	N
<i>N. parvum</i>	N	N	P (NP2)	N
<i>E. lata</i>	N	N	N	P (EUT1)
<i>P. viticola</i>	-	-	-	P (PHO1)

N signifie que l'espèce a été sélectionnée comme étant un témoin négatif. P représente le témoin positif, et le nom de la sonde spécifique à chacun des témoins positifs est mis entre parenthèses.

8. Optimisation des conditions de qPCR multiplex

Dans le présent projet, une réaction duplex contient l'ADN de deux espèces différentes ainsi que deux sondes spécifiques à celles-ci. De même, une réaction triplex comprend l'ADN de trois champignons et trois sondes spécifiques.

Le premier objectif de cette étape était de vérifier que l'efficacité de chacune des sondes a atteint un niveau acceptable en présence de l'ADN de deux espèces (pour un système duplex) ou de trois espèces (pour un système triplex) dans une même réaction. Puisque les concentrations des réactifs et les paramètres de qPCR ont été déjà optimisés en condition monoplex précédemment (étape 6), théoriquement peu ou pas d'optimisation devrait être nécessaire à cette étape. Des réactions multiplex ont été effectuées de façon similaire aux réactions monoplex décrites à l'étape 6, c'est-à-dire qu'elles ont été effectuées en triplicate, en utilisant l'ADN dilué en série dont la quantité était 3 ng, 3×10^{-1} ng, 3×10^{-2} ng et 3×10^{-3} ng. Par la suite, elles ont été optimisées au besoin si l'efficacité de la réaction multiplex n'était pas comprise entre 0,90 et 1,10. Les détails du développement de chacune des quatre réactions multiplex sont indiqués dans le chapitre « Résultats ».

En parallèle, pour chacune des sondes, les valeurs de cycles seuil (Ct) mesurées dans une réaction monoplex et dans une réaction multiplex ont été comparées. Cette comparaison avait pour but de vérifier que les sondes dans la réaction multiplex sont aussi sensibles que dans la réaction monoplex.

Tableau 8 : Recette de base du mélange réactionnel de 20 μ L et de 25 μ L lors des essais de qPCR duplex et triplex

Réactif (concentration du stock original)	Volume ajouté par réaction de 20 μ L (en μ L)		Volume ajouté par réaction de 25 μ L (en μ L)
	Duplex	Triplex	Triplex
Master Mix (2X)	10	10	12,5
MgCl₂ (25 mM)	1,2	1,2	1,5
Amorce sens (100 μM)	2	3	3,75
Amorce anti-sens (100 μM)	2	3	3,75
Sonde 1 (100 μM)	0,4	0,4	0,5
Sonde 2 (100 μM)	0,4	0,4	0,5
Sonde 3 (100 μM)	0	0,4	0,5

Il s'agit d'une recette sur laquelle on s'est basé lors de tous les essais de qPCR duplex et triplex effectués au cours de ce projet. Les volumes des réactifs ajoutés dans le mélange réactionnel de base ont été résumés dans ce tableau. Les volumes d'eau et d'ADN ont été exclus. Lorsque tous les réactifs ne peuvent pas être inclus dans un volume de 20 μ L, il est fortement recommandé d'augmenter le volume à 25 μ L.

9. Détermination de la limite de détection

Suite à la complétion du développement d'un système multiplex, la limite de détection de chacune des sondes employées a été déterminée. L'objectif de cette étape était de trouver la quantité minimale d'ADN que chacune des sondes peut détecter en condition multiplex. Pour ce faire, des réactions multiplex ont été effectuées en suivant la procédure décrite dans 8. Mais, cette fois-ci, l'ADN de toutes les souches fongiques ajouté dans la réaction a été dilué jusqu'à une concentration de 3×10^{-6} ng par réaction. L'expérience a été répétée en utilisant toutes les souches des espèces ciblées.

10. Validation de la réaction triplex du pied noir

Une fois que l'optimisation des quatre réactions multiplex a été complétée, la validation de la réaction multiplex #3, permettant la détection des espèces responsables du pied noir, a été effectuée. Pour ce faire, l'ADN a été extrait à partir des racines de vigne Baltica D23474 atteinte de la maladie ayant été fournies par un vignoble de l'Île d'Orléans. La réaction triplex #3 a été effectuée en duplicata en ajoutant cet ADN dans le mélange réactionnel optimisé.

RÉSULTAT

Afin de développer une trousse moléculaire de détection de champignons responsables de cinq maladies du bois de la vigne (esca, pied noir, *BDA*, excoriose et eutypiose), quatre systèmes qPCR multiplex ont été mis au point (voir le tableau 5 dans le chapitre « Matériel et Méthodes »). Dans cette section du mémoire, les résultats obtenus au cours du développement de ces quatre réactions seront présentés de manière chronologique.

1. Développement de la qPCR duplex – esca

Les deux espèces fongiques ciblées lors du développement du premier système multiplex sont *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum*. Les amorces universelles ITS1 et ITS2 ont été ajoutées dans la réaction pour amplifier la région ITS1, à laquelle deux sondes d'hybridation TaqMan® spécifiques s'attachent, chez ces deux champignons responsables des premiers symptômes de la maladie de l'esca.

1.1. Détermination de la région cible et conception des sondes

Comme mentionné ci-haut, la région cible a été la région ITS1, soit la région située entre le gène de l'ARNr 18S et 5,8S chez des champignons (revoir la figure 8). Elle fait partie d'une grande région qui s'appelle la région ITS, qui est très souvent utilisée dans l'identification des champignons par séquençage. Justement, lors du séquençage d'ADN des souches de *P. chlamydospora* et de *P. aleophilum* étudiées dans ce projet, la région ITS nous a permis d'identifier correctement les deux espèces. Elle contient donc une ou des régions hypervariables interspécifiques qui différencient *P. chlamydospora* de *P. aleophilum*. Les sondes ont été dessinées à l'aide de l'outil PrimerQuest® en se basant sur ces régions hypervariables, et l'alignement des sondes et des séquences d'ADN des deux espèces est présenté à la figure 11. Selon BLAST, la sonde PC2 est spécifique à l'ADN de *P. chlamydospora*, et la sonde PA2 ne s'hybride que sur l'ADN de *P. aleophilum*.

```

PARC326      GAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTCAGGGTCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCTTTG
PARC100      -----GCGGAAGGATCATTATCGAGTCAGGGTCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCTTTG
PC2          -----TCCTCTGGGCCCCGATCTCCA-----
PARC50       -----AAGGATCATTATCGAGTCAGGGTCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCTTTG
                        *****

PARC326      TTTATCATACCTTTGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTCAGT
PARC100      TTTATCATACCTTTGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTCAGT
PC2          -----
PARC50       TTTATCATACCTTTGTTGCTTTGGCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTTCAGT

```

Figure 10 : Un exemple d'un alignement de la région cible chez les trois souches étudiées, avec la séquence de la sonde correspondante

Les séquences de la région ITS1 chez les trois souches de *P. chlamydospora* PARC50, PARC100 et PARC326 ont été obtenues en analysant les résultats du séquençage à l'aide du logiciel Geneious R9. Par la suite, l'alignement a été effectué à l'aide de l'outil en ligne Clustal Omega pour trouver la région consensus chez les trois souches, telle qu'illustrée dans cette figure. La même procédure a été répétée pour confirmer que chacune des dix sondes s'hybride sur la région cible des souches étudiées.

```

P_aleophilum      TCG-----AGTTTCGTACTCCAAACCCTTTGTGAACATACCTGTTTTCGTTGC
PA2               -----
P_chlamydospora   GAGTCAGGGTCCTCTGGGCCCCGATCTCCAACCCTTTGTTTATCATACCTTTGTTGCTTTG
PC2               -----TCCTCTGGGCCCCGATCTCCA-----

P_aleophilum      TTCGGCAGGTCGGGGGCCAACCCCGCCCGCCGGACTCCCCCTCGCGGGGCTGCGCCG
PA2               -----
P_chlamydospora   GCAGACCCGTCCTTCGGGACCGTCGGGGGCGTT-----CAGTCGCCTCTGGC-
PC2               -----

P_aleophilum      GCGGGCCTGCCGG--AGGGCACAGACTCTGTATTCAAAAACGTACCTCTCTGAGTTATCT
PA2               -----CCTGCCGG--AGGGCACAGACT-----
P_chlamydospora   CAGCGTCTGCCAGTAGCCCAACCAAAATTCTTTGTTACATGTGACGTCTGAACGGTTCCA
PC2               -----

```

Figure 11 : Séquences des sondes PC2 et PA2, alignées aux séquences d'une partie de la région ITS1 chez *P. chlamydospora* PARC50 et *P. aleophilum* PARC220

Ces séquences ont été obtenues suite au séquençage de la région ITS et alignées à l'aide de Clustal Omega. Les séquences cibles dans la région ITS1 des deux espèces, sur lesquelles les deux sondes s'hybrident, ont été encadrées en bleu ; la séquence de PC2 est absente de la région ITS1 de *P. aleophilum*, et celle de PA2 est absente de la région ITS1 de *P. chlamydospora*.

1.2. PCR conventionnelle en gradient de température

Le développement de la première réaction duplex a débuté après vérification du fonctionnement des deux amorces, ITS1 et ITS2, sur l'ADN de toutes les six souches de *P. chlamydospora* et *P. aleophilum*. De plus, comme il s'agissait de la première utilisation de ces amorces, leur fonctionnement aux différentes températures d'hybridation a été évalué par PCR en gradient de température. Selon le résultat présenté dans la figure 12, ITS1 et ITS2 ont réussi à amplifier la région cible chez les six souches étudiées à toutes les températures d'hybridation testées, soit 55°C, 57°C, 59°C, et 60°C. Sur les gels d'agarose 1,5% montrés dans la figure 12, les amplicons des souches PARC220, PARC50, PARC100 et PARC326 ont produit des bandes particulièrement intenses à 60°C.

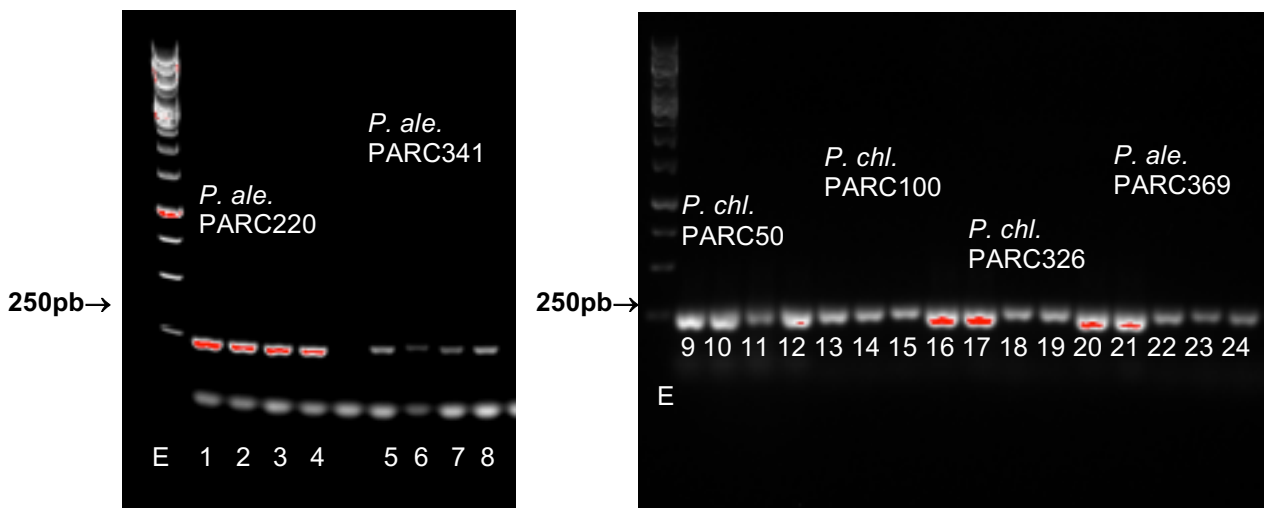


Figure 12 : Région ITS1 amplifiée chez les trois souches de *P. chlamydospora* (*P. chl.*) et chez les trois souches de *P. aleophilum* (*P. ale.*) aux quatre températures d'hybridation par PCR en gradient de températures

Les quatre bandes de la même souche représentent les produits PCR amplifiés à 55C, 57C, 59C et 60C (du gauche à droite)

E = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

- #1, 2, 3, 4 = région ITS1 de *P. ale.* PARC220 amplifiée à 55°C, 57°C, 59°C et 60°C
- #5, 6, 7, 8 = région ITS1 de *P. ale.* PARC341 amplifiée à 55°C, 57°C, 59°C et 60°C
- #9, 10, 11, 12 = région ITS1 de *P. chl.* PARC50 amplifiée à 55°C, 57°C, 59°C et 60°C
- #13, 14, 15, 16 = région ITS1 de *P. chl.* PARC100 amplifiée à 55°C, 57°C, 59°C et 60°C
- #17, 18, 19, 20 = région ITS1 de *P. chl.* PARC326 amplifiée à 55°C, 57°C, 59°C et 60°C
- #21, 22, 23, 24 = région ITS1 de *P. ale.* PARC369 amplifiée à 55°C, 57°C, 59°C et 60°C

1.3. Fonctionnement des sondes dans des qPCR monoplex - Sondes PC1 et PA1

Une fois que le bon fonctionnement des amorces ITS1 et ITS2 a été vérifié sur l'ADN des deux espèces en question, le fonctionnement de chacune des deux sondes préalablement conçues a été vérifié individuellement. Les premières sondes qui ont été conçues pour s'hybrider sur la région ITS1 de *P. aleophilum* et de *P. chlamydospora* ont été nommées PA1 (5' AGG G+CA CAG ACT C+T+G TAT TC 3') et PC1 (5' TCC TCT GGG CCC GAT CTC CA 3'), respectivement. Selon le résultat présenté dans le paragraphe précédent, la température d'hybridation optimale et commune pour toutes les souches testées était 60°C. Pour commencer, le premier test monoplex a été effectué avec le programme de qPCR comportant une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 15 secondes. Chacune des réactions monoplex a été effectuée en utilisant le mélange réactionnel de base, présenté au tableau 6 dans le chapitre « Matériel et Méthodes », et elle a été complétée jusqu'à un volume de 20 µL en ajoutant de l'eau sans nucléases.

La réaction monoplex contenant la sonde PA1 amplifiait bien l'ADN de la souche *P. aleophilum* PARC341, mais la valeur du R^2 de la courbe standard était plutôt faible, tel que montré dans le tableau 9. Comme ce problème persistait après plusieurs essais, la séquence de la sonde a été modifiée en ciblant un autre endroit de la région ITS1 chez *P. aleophilum*. L'efficacité de cette nouvelle sonde PA2 dans des réactions monoplex était toujours supérieure à 0,90, et la courbe standard qui relie le Ct et la quantité d'ADN de la souche PARC341 était linéaire, avec un R^2 de 0,99766 (voir le tableau 9). Ce résultat montre que PA2 s'hybride à son ADN cible à chaque cycle d'amplification, ce qui n'était pas le cas avec la sonde PA1.

Quant à la sonde PC1, alors que l'efficacité de la sonde dans des réactions monoplex était idéale, la fluorescence verte émise par la sonde PC1 a été détectée dans le canal jaune, tel qu'illustré dans la figure 13. Donc, pour résoudre ce problème d'interférence, le fluorochrome qui était attaché à l'extrémité 5' de PC1, FAM, a été remplacé par Cy5. Cette nouvelle sonde liée au Cy5, dont la fluorescence est normalement captée par le canal rouge, a été nommée PC2.

Tableau 9 : Comparaison des valeurs de R^2 des courbes standard et de l'efficacité des deux sondes, PA1 et PA2, dans les deux réactions monoplex

	<i>P. aleophilum</i> PARC341		<i>P. aleophilum</i> PARC369	
	R^2	Efficacité	R^2	Efficacité
PA1 (seuil = 0,056)*	0,87604	1,02715	0,93778	1,18517
PA2 (seuil = 0,024)*	0,99766	0,89996	0,94581	1,05584

*Les valeurs du seuil (*threshold*) des deux réactions monoplex (la première inclut PA1, et la deuxième contient PA2) ont été ajustées séparément pour obtenir une meilleure efficacité de réaction.

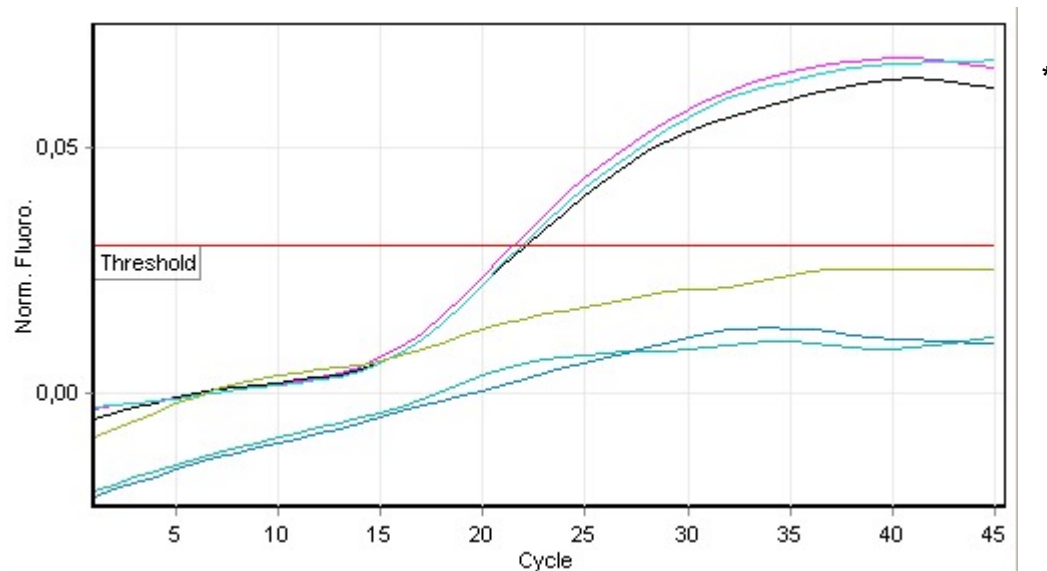


Figure 13: L'amplification de la région ITS1 de la souche *P. chlamydospora* PARC50 détectée dans le canal jaune.

Les trois courbes d'amplification marquées par une étoile (*) représentent le résultat de l'hybridation de la sonde PC1 sur la région ITS1 de *P. chlamydospora* PARC50. Les trois courbes en-dessous du niveau seuil sont les témoins négatifs. On voit l'interférence de fluorescence dans cette figure, puisque le signal vert émis par la sonde PC1 ne devrait pas être lu par le canal jaune normalement.

1.4. Fonctionnement des sondes dans des qPCR monoplex - Sondes PC2 et PA2

Après le remplacement du fluorochrome de PC1 et le renouvellement des tubes d'amorces, une grande diminution de l'efficacité de réaction monoplex a été observée avec les deux sondes, PC2 et PA2. Pour résoudre ce problème, les deux réactions monoplex ont dû être réoptimisées en augmentant la température d'hybridation/élongation et en ajoutant du MgCl₂ en excès dans le mélange réactionnel.

Enfin, les valeurs de l'efficacité de réactions monoplex optimisées étaient acceptables pour chacune des six souches testées, tel que résumé au tableau 10, lorsque l'étape d'hybridation/élongation a été effectuée à 66°C pendant 30 secondes. Le nouveau mélange réactionnel de 20 µL a été additionné de 1,2 µl de MgCl₂ (revoir le tableau 6 pour la recette du mélange réactionnel de base), dont le stock était concentré à 25mM.

Tableau 10 : Chiffres sur les six réactions monoplex, ayant ciblé *P. chlamydospora* et *P. aleophilum*, optimisées

	<i>P. chlamydospora</i>			<i>P. aleophilum</i>		
	PARC50	PARC100	PARC326	PARC220	PARC341	PARC369
Seuil	0,080			0,030		
R ²	0,97879	0,98661	0,97591	0,98917	0,99188	0,99805
Efficacité	1,04089	0,96813	0,92610	0,90491	0,91560	1,02380

1.5. Spécificité

Une fois que le bon fonctionnement des deux sondes a été vérifié individuellement dans les deux réactions monoplex, leur spécificité a été examinée en choisissant *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* comme témoins positifs, et les espèces non-cibles comme témoins négatifs.

Selon la figure 14, les signaux fluorescents dont l'intensité a dépassé la ligne du seuil sont seulement ceux qui ont été émis par la sonde PA2 en présence de l'ADN de *P. aleophilum*. Les autres courbes d'amplification étaient en dessous du seuil. Par contre, la figure 15 montre que la sonde PC2 a réagi avec l'ADN de certaines espèces fongiques non-cibles, car certaines courbes d'amplification dépassent légèrement le seuil vers la fin de PCR. Plus précisément, PC2 a détecté 3 ng d'ADN de *E. lata*, *D. seriata*, *B. dothidea*, *N. parvum*, et *I. macrodidyma*. Toutefois, leur détection a été aléatoire, c'est-à-dire que seulement un réplica sur trois de chacune des espèces mentionnées précédemment a dépassé le seuil. Une amplification non spécifique qui n'est pas aléatoire a été observée lorsque 3 ng d'ADN de *P. aleophilum* a été ajouté dans la réaction monoplex contenant PC2. Cependant, selon la figure 15, cette détection non spécifique a eu lieu tard, seulement à partir du 40^e cycle de qPCR.

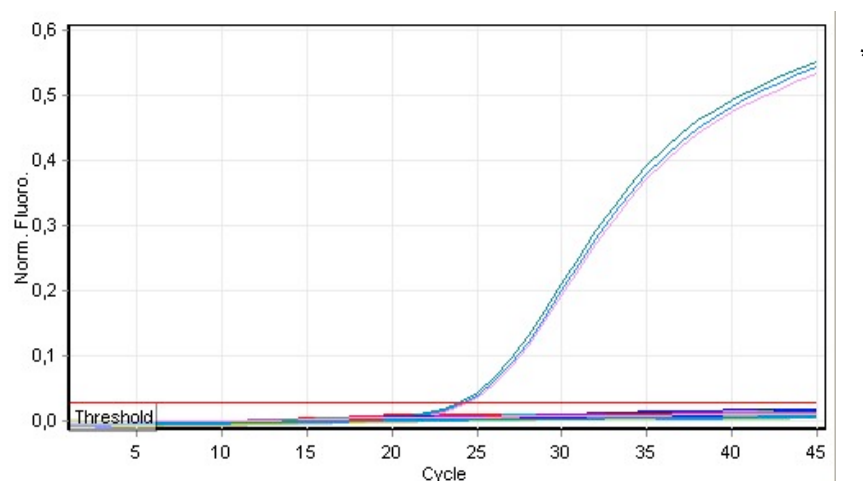


Figure 14 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde PA2 contre l'espèce cible et sept espèces non-ciblées

Les trois courbes (*) représentent les triplica du témoin positif (3 ng d'ADN de *P. aleophilum*). Toutes les autres courbes sont des témoins négatifs, soit l'ADN des sept espèces non-ciblées (revoir le tableau 7 pour les noms des espèces). Le seuil a été ajusté à 0,030.

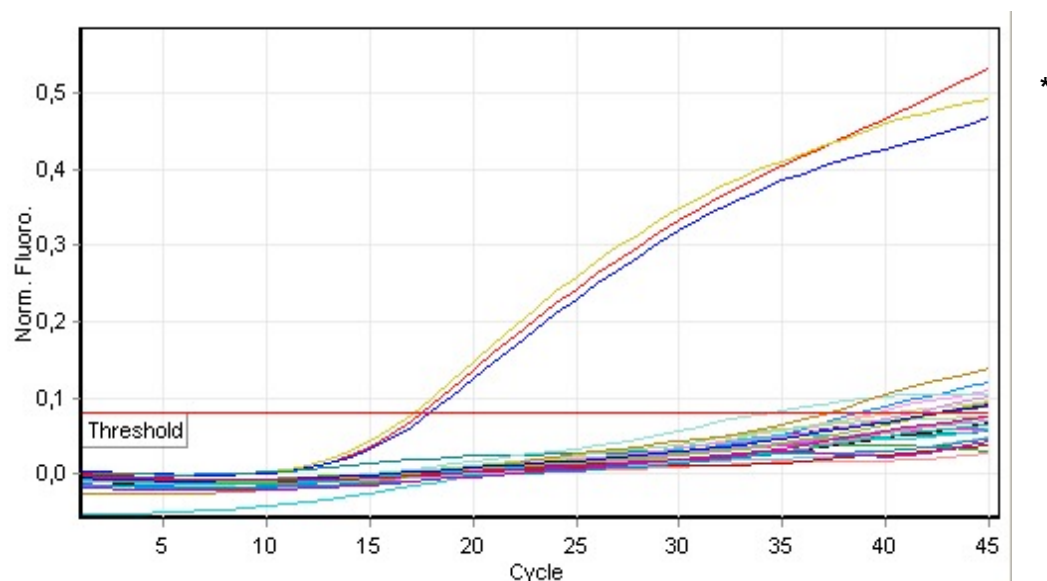


Figure 15 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde PC2 contre l'espèce cible et sept espèces non-ciblées

Les trois courbes (*) représentent les triplicats du témoin positif, soit 3 ng d'ADN de *P. chlamydospora*. Les autres courbes du bas sont des témoins négatifs, c'est-à-dire 3 ng d'ADN des espèces non-ciblées qui incluent *E. lata*, *D. seriata*, *B. dothidea*, *N. parvum*, *I. macrodidyma*, et *P. aleophilum*. Le seuil a été ajusté à 0,080.

1.6. Fonctionnement des sondes dans la qPCR duplex

Il n'y a eu aucun besoin d'optimisation lors des essais de la réaction duplex. Cette dernière a été effectuée en utilisant le mélange réactionnel identique à celui qui a été optimisé dans l'étape 1.4 (Fonctionnement des sondes dans des qPCR monoplex - Sondes PC2 et PA2), mais contenant cette fois-ci 2 μ L de chacune des amorces (10 μ M) et 0,4 μ L de chacune des deux sondes (10 μ M) (revoir le tableau 8 pour les volumes exacts des réactifs). Également, 2 μ L d'ADN de *P. chlamydospora*, ainsi que 2 μ L d'ADN de *P. aleophilum*, dont la concentration variait de 3x10⁻³ ng à 3 ng d'ADN par réaction, ont été ajoutés pour générer des courbes d'étalon.

Les valeurs de l'efficacité de chacune des sondes dans une réaction duplex ont été calculées de la même façon qu'à l'étape 1.3. La figure 16 montre que la réaction utilisant l'ADN génomique des souches *P. aleophilum* PARC341 (haut) et *P. chlamydospora* PARC100 (bas) a donné une efficacité de 0,90 pour les deux sondes. De plus, elle présente également les courbes d'étalonnage résultant des deux réactions monoplex ayant été effectuées parallèlement à la

réaction duplex. Les deux courbes du haut comparent les courbes d'étalonnage générées suite à la réaction duplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde PA2 avec l'ADN de *P. aleophilum* PARC341. On constate qu'elles se superposent l'une sur l'autre, ce qui signifie que, dans ces deux réactions, il n'y a pas de différence dans les valeurs de Ct auxquelles chacune des dilutions d'ADN cible est détectée. La même conclusion peut être tirée en analysant les courbes du bas, qui ont été générées à la suite de la réaction duplex et de la réaction monoplex avec la sonde PC2 et l'ADN de *P. chlamydospora* PARC100. Selon l'axe des ordonnées dans ce graphique, la différence de Ct entre ces deux réactions est inférieure à 2 cycles.

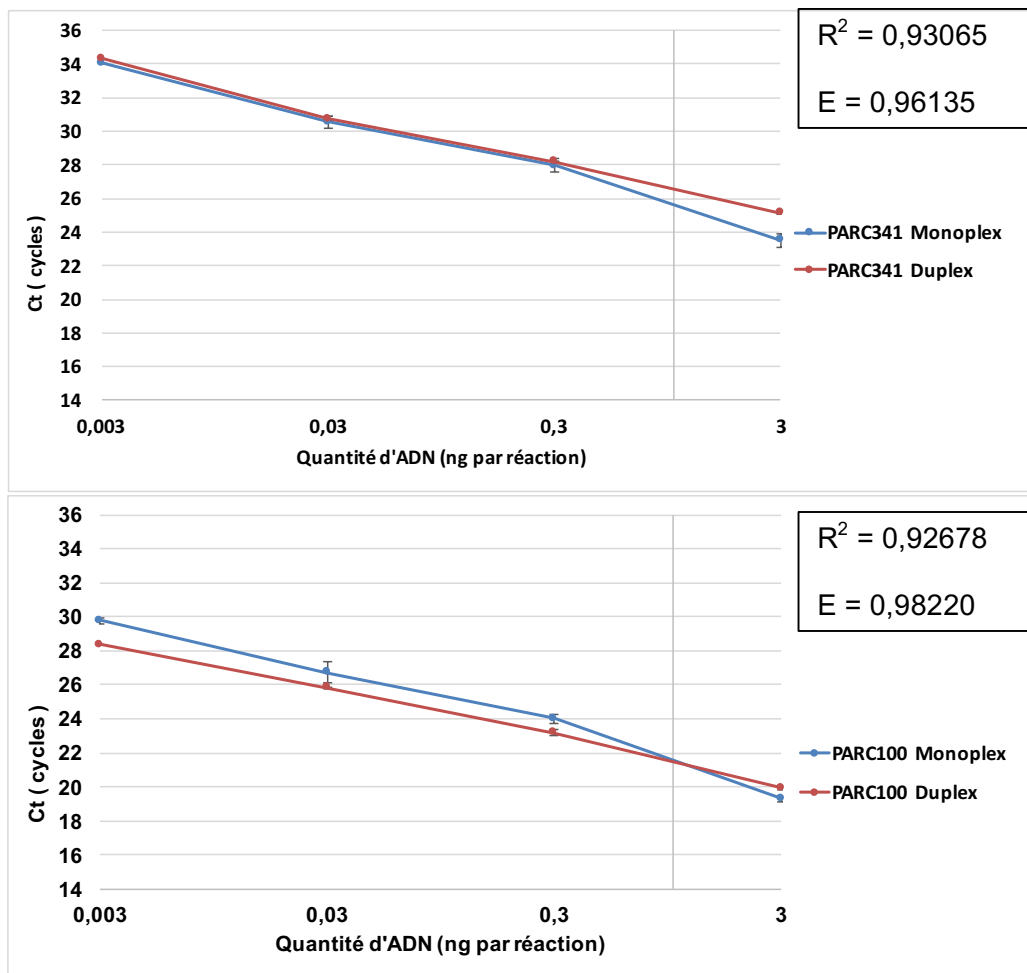


Figure 16 : Courbes d'étalon générées suivant les réactions duplex et monoplex avec les sondes PA2 (haut) et PC2 (bas)

Les deux courbes d'étalon du haut comparent les valeurs de Ct auxquelles chacune des dilutions d'ADN de *P. aleophilum* a été détectée par la sonde PA2 dans une réaction duplex (rouge) et dans une réaction monoplex (bleu). Les deux courbes du bas sont les résultats obtenus avec la sonde PC2. Les valeurs de R^2 et de l'efficacité de chacune des sondes en condition duplex sont encadrées.

1.7. Détermination de limite de détection des deux sondes

Même s'il s'agit de la même espèce, la limite de détection était variable dépendamment des souches. D'après la figure 17, PA2 pouvait détecter au minimum 3×10^{-3} ng d'ADN de la souche PARC341, 3×10^{-4} ng d'ADN de PARC369, et 3×10^{-5} ng d'ADN de PARC220. D'un autre côté, la figure 18 indique que la quantité minimale d'ADN détectable par la sonde PC2 était 3×10^{-6} ng d'ADN par réaction pour toutes les trois souches testées. Toutefois, à cette concentration d'ADN, une grande variabilité dans les valeurs de Ct a été observée entre les trois répliques de la même souche. Par exemple, seulement un réplica du triplicata de l'ADN de la souche PARC100 s'est révélé positif, tandis que les signaux fluorescents des deux autres répliques étaient en dessous du seuil.

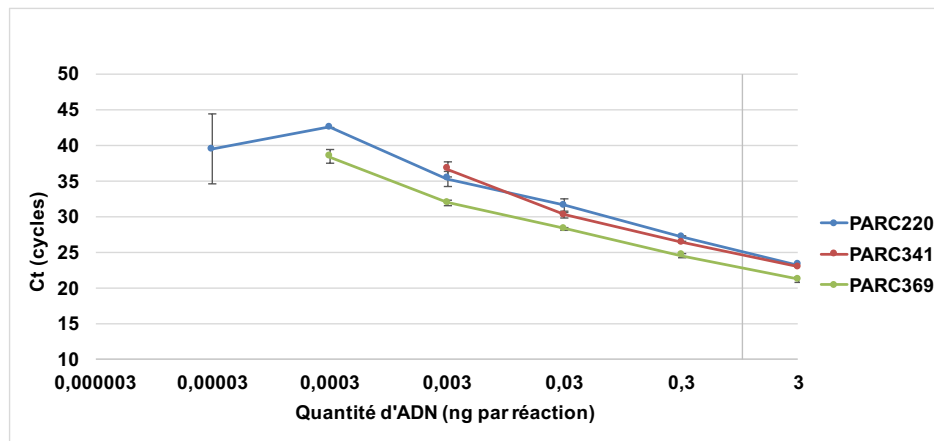


Figure 17 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN génomique des souches *P. aleophilum* PARC220, PARC341 et PARC369, détectées par la sonde PA2, dans la réaction duplex

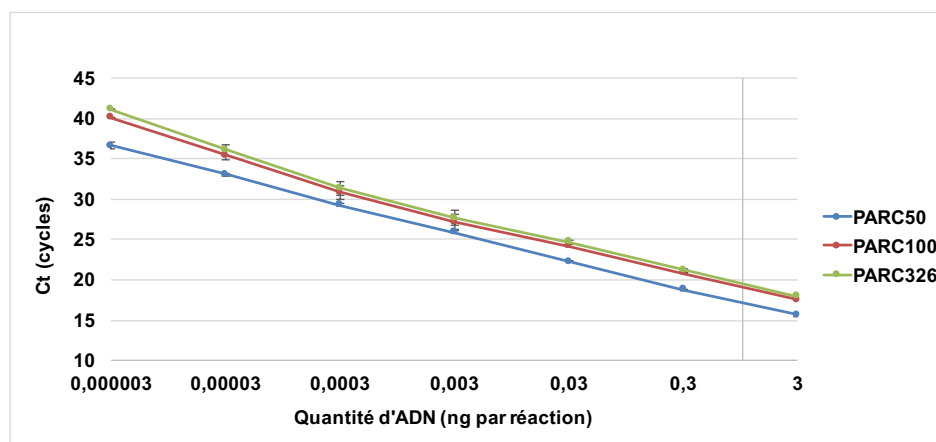


Figure 18 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN génomique des souches *P. chlamydospora* PARC50, PARC100 et PARC326, détectées par la sonde PC2, dans la réaction duplex

2. Développement de la réaction triplex – pied noir

Les trois espèces fongiques ciblées lors du développement du deuxième système multiplex étaient *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria liriodendri*, et *Cylindrocarpon pauciseptatum*.

2.1. Isolement et identification des souches

Les deux espèces fongiques qui sont principalement responsables du pied noir dans la majorité des pays sont *I. macrodidyma* et *I. liriodendri*. Deux souches de *I. macrodidyma* et trois souches de *I. liriodendri* ont été fournies par Dr Urbez-Torres.

La troisième espèce, *C. pauciseptatum*, a été sélectionnée parce qu'elle est un pathogène des vignes qui est prévalent dans plusieurs pays, et aussi parce qu'elle est l'espèce que j'ai pu isoler le plus abondamment (trois souches ont pu être isolées) à partir des racines de vignes affectées par le pied noir provenant d'un vignoble situé à l'Île-d'Orléans. Les autres espèces fongiques qui ont été isolées à partir de trois variétés de vigne (revoir la section « 1. Isolement des souches » dans le chapitre « Matériel et Méthodes ») étaient *I. macrodidyma*, *I. liriodendri*, *Ilyonectria torresensis*, *Ilyonectria robusta*, et *Neonectria obtusispora*. Les isolats ont été conservés à 4°C sur 20 ml du milieu PDA 3,9%. Leurs appartenances sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résultat du séquençage des isolats provenant des vignes de l'Île d'Orléans ainsi que les espèces prédites

Souche	Identité (%)	Query cover (%)	Accession	Espèce prédite
IAF33	99,8	100,00	KX611632	<i>I. liriodendri</i>
IAF36	98,9	100,00	AM419084	<i>N. obtusispora</i>
IAF37	99,5	100,00	JF735390	<i>I. robusta</i>
IAF40	99,7	100,00	KF512000	<i>I. liriodendri</i>
IAF42	100,0	100,00	KX611632	<i>I. liriodendri</i>
IAF44	99,9	100,00	KM519666	<i>C. pauciseptatum</i>
IAF45	99,6	100,00	KM519666	<i>C. pauciseptatum</i>
IAF46	99,9	100,00	KM519666	<i>C. pauciseptatum</i>
IAF47	98,8	100,00	KX343147	<i>I. macrodidyma</i>
IAF54	99,3	100,00	KX778701	<i>I. liriodendri</i>
IAF58	100,0	100,00	KX343145	<i>I. macrodidyma</i>
IAF62	100,0	100,00	KR019360	<i>I. torresensis</i>

Les prédictions d'espèces ci-dessus ont été effectuées en se basant sur des alignements de séquences avec l'algorithme Blast et la base de données génomique NCBI. Trois gènes, soit la région ITS, le gène de bêta-tubuline, et le gène de l'histone H3 ont été utilisés pour l'identification de ces souches.

Il est connu que les champignons des genres *Ilyonectria/Cylindrocarpon* sont relativement difficiles à identifier de façon claire et précise, car les séquences de leur région ITS, et même parfois d'autres gènes, sont très ressemblantes (Halleen et al., 2004; Halleen et al., 2006a; A. Cabral et al., 2012). Ainsi, au moins deux gènes devaient être séquencés pour mieux les identifier. Afin de confirmer l'identité des souches des genres *Ilyonectria/Cylindrocarpon* fournies et isolées dans mon projet, la région ITS, le gène codant pour la bêta-tubuline, et/ou le gène codant pour l'histone H3 ont été séquencés.

À la fin de ce processus, l'identité des cinq souches fournies par le Dr Úrbez-Torres, ainsi que celle des trois souches de *C. pauciseptatum* isolées ont été confirmées (tableau 11), et elles ont été retenues pour effectuer les expériences qui suivent.

2.2. Détermination de la région cible et conception des sondes

Une fois que les espèces à étudier dans ce volet du projet ont été sélectionnées, les séquences de la région ITS, du gène codant pour la bêta-tubuline, et du gène codant pour l'histone H3 chez les trois espèces ont été alignées. Dans la région ITS et dans le gène bêta-tubuline, il n'était pas possible de trouver une région variable entre ces espèces, car les séquences se ressemblaient beaucoup entre elles, tel que montré par les figures 19 et 20. Le gène codant pour l'histone H3 a été ainsi choisi pour être ciblé lors du développement du deuxième système multiplex.

```

PARC345 ITS      TAGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA-T
PARC60 ITS      -----CCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATA
IAF45 ITS      -----CCTGTGAACA-T
                      *****

PARC345 ITS      ACCTATTGTGCTCGGCGGTGCCTGTTCCGACAGCCCGCCAGAGGACCCCAAACCCCTG
PARC60 ITS      CCATTATCGTTGCCTCGGCGGTGCCGCTTCGGCGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACCCCTG
IAF45 ITS      ACCATTTGTGCTCGGCGGTGCCTGTTCCGACAGCCCGCCAGAGGACCCCAAACCCAA
                      *      * ***** * * * * ***** * * *

PARC345 ITS      ATTACATTGAAGAGTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAACTTTCAACAACGG
PARC60 ITS      ATTTTATAACAGTATCTTCTGAGTA-AATGATTAAATCAATCAAACTTTCAACAACGG
IAF45 ITS      ACTTCCTTGAGTGAGTCTTCTGAGTA-ACCGATTAAATCAATCAAACTTTCAACAACGG
                      * *      * * ***** * ***** *****

PARC345 ITS      ATCTCTTGCTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
PARC60 ITS      ATCTCTTGCTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
IAF45 ITS      ATCTCTTGCTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
                      ***** *****

PARC345 ITS      AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTATTCTGGCGGG
PARC60 ITS      AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGG
IAF45 ITS      AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGG
                      ***** *****

PARC345 ITS      CATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGGTTGGGGATCGG
PARC60 ITS      CATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGGTTGGAGATCGGC
IAF45 ITS      CATGCCTGTTCGAGCGTCATTACATCCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGGTTGGGGATCGGC
                      ***** ***** * * ***** * * *

PARC345 ITS      CGAGCC-TCCGCGCCCGCGCTCCCTAAATCTAGTGCGGTCTCGCTGTAGCTTCCTCTG
PARC60 ITS      GAGCCCTCCGGGGCGCGCGGCTCCCAAATATAGTGGCGGTCCCGCTGTAGCTTCCTCTG
IAF45 ITS      GAGCCTCAG--CGCCCGCGTCCCTAAATTTAGTGCGGTACGCTGTAAATTCYTCTG
                      *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PARC345 ITS      CG-----
PARC60 ITS      CGTAGTAGCACACCTCGCACTGGAAAAACAGCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCACTTCT
IAF45 ITS      CGTAGTAGCACTTAGCACTGGAAAAACAGCGCGGCCACSCCGTAAA-----
                      **

PARC345 ITS      -----
PARC60 ITS      GAAAG
IAF45 ITS      -----

```

Figure 19: Alignement des séquences de la région ITS complète chez *I. macrodidyma* PARC345, *I. liriodendri* PARC60 et *C. pauciseptatum* IAF45.

Séquences ont été obtenues suite à l'analyse du séquençage de la région ITS chez les trois souches. Les amorces ITS1 et ITS4 ont été utilisées lors du séquençage.

```

PARC60 Bt      -----TGCTGCTTTCTGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGACAGCAAT
IAF45 Bt      -----CAAT
PARC345 Bt     AACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGCGAGCATGGTCTTGACAGCAAT
               ****

PARC60 Bt      GGTGTCTACAACGGTACCTCCGAGCTGCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAG
IAF45 Bt      GGTGTCTACAACGGCACTTCCGAGCTCCAGCTCGAACGCATGAGCGTCTACTTCAACGAG
PARC345 Bt     GGTGTCTACAACGGCACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAG
               ***** ** ***** ***** *****

PARC60 Bt      GTACGCGAAATCTGCTCT-----GCCCTATACATGAAGTGTCAAACCTCACACCACGTA
IAF45 Bt      GTACGTGAATAAACTCTGCTGCTGCTCGGCCGCTGGAAGCACGAAACTCACACCACCA
PARC345 Bt     GTACGTGATCAAACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAAGCACGAAACTCACACCACCA
               ***** **          ** * * ***** *****

PARC60 Bt      GGCCTCTGGAAACAAGTATGTCCCTCGCGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCAT
IAF45 Bt      GGCCTCTGGCAACAAGTATGTCCCTCGCGCCGTCCTCGTCGATYTCGAGCCCGGTACCMT
PARC345 Bt     GGCCTCTGGCAACAAGTATGTCCCTCGCGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCAT
               ***** ***** ***** *****

PARC60 Bt      GGACGCTGTCGTCGCGGTCTTTTCGGCCAGCTCTTCGCGCCCGACAACCTTCGTCTTCGG
IAF45 Bt      GGACGCCGTCCGTGCCGGCCCTTCGGCCAGCT-----
PARC345 Bt     GGACGCCGTCCGTGCCGGCCCTTCGGCCAGCTCTTCGCGCCCGACAACCTTCGTCTTCGG
               ***** ***** ** *****

```

Figure 20: Alignement des séquences d'une partie du gène codant pour la bêta-tubuline chez *I. macrodidyma* PARC345, *I. liriodendri* PARC60 et *C. pauciseptatum* IAF45.

Séquences ont été obtenues suite à l'analyse du séquençage du gène codant pour la bêta-tubuline chez les trois souches. Les amorces Bt2a et Bt2b ont été utilisées lors du séquençage. La grande variation interspécifique est encadrée dans cette figure, mais il n'y a pas de différence nucléotidique entre les séquences de *I. macrodidyma* et *C. pauciseptatum*.

Le problème avec le gène codant pour l'histone H3 était sa taille. Tandis que la qPCR TaqMan® exige que la taille de l'amplicon soit égale ou inférieure à 150 pb idéalement, la taille complète du gène amplifiée par les amorces universelles H3-1a et H3-1b, qui ont été développées pour l'identification des ascomycètes (Glass et Donaldson, 1995), était située entre 500 et 600 pb. Une paire d'amorces a donc été nouvellement conçues, en utilisant les outils Primer3 et PrimerQuest®, pour que celle-ci amplifie une partie seulement de ce gène. De cette manière, la taille de l'amplicon générée par les nouvelles amorces H3F_1 et H3R_2 a été diminuée à 200 pb. Parallèlement, l'outil PrimerQuest® a été employé pour dessiner trois sondes d'hybridation TaqMan®, chacune spécifique à l'une des trois espèces étudiées dans ce volet (Figure 21). Les trois fluorochromes sélectionnés étaient HEX(PAU1), ROX (MAC1), et Cy5 (LIR1).

```

LIR1      -----TTT-CTCCTGCGCCGACCTGAC-----
I_liriodendri  --TG-----AGTTTT-CTCCTGCGCCGACCTGACCGTCTGTCTTCTGCCCCGACGCG--
MAC1      -----ATCGCCGGCGCGCCATTTA-----
I_macrodidyma CTTGCTTCCAAGGCTGGTGAGTCCCATCGCCGGCGCGCCATTTACCTGACACGTCGCGTT
PAU1      -----
C_pauciseptatum -----AAGGCTGGTGAGT-----CTCGCCGCGTCATTTAATTGACGCGTCGCTCC

LIR1      -----
I_liriodendri  --TCTTGCAACATCCATCTTCATCACATACTGACATTACACAGCCCGCAAGAGCGCCCCA
MAC1      -----
I_macrodidyma TCCATCAAAAATGCATCGCCATACTAACCTTAACCATCAACAGCCCGCAAGAGCGCCCCC
PAU1      ---CCCAC---CGCATCATCGTACTGACC-----
C_pauciseptatum CCCCTAC---CGCATCATCGTACTGACCTCGAACCCCAACAGCCCGCAAGAGCGCCCCC

```

Figure 21 : Séquences des trois sondes alignées à celles du gène de l'histone H3 partiel chez *I. macrodidyma* PARC345, *I. liriodendri* PARC60, et *C. pauciseptatum* IAF45.

Ces séquences ont été obtenues suite à l'analyse des résultats du séquençage de la région amplifiée par H3-1a et H3-1b. Les trois sondes ont été conçues dans la région amplifiée par H3F_1 et H3R_2, ce qui est montrée dans cette figure.

2.3. PCR conventionnelle en gradient de température

Comme il s'agissait des amorces nouvellement dessinées, la température d'hybridation optimale de H3F_1 et H3R_2 devait être vérifiée par PCR en gradient de température. Pour ce faire, l'ADN des trois souches spécifiées dans la figure 21, soit une souche par espèce, a été amplifié par les amorces à 60°C, 62°C et 64°C.

Selon le résultat présenté par la figure 21, les températures d'hybridation optimales de H3F_1 et H3R_2 étaient 60°C et 62°C. Parmi ces deux options, la température 60°C a été retenue pour effectuer la prochaine expérience, qui consistait à examiner le fonctionnement de chacune des sondes dans une qPCR monoplex.

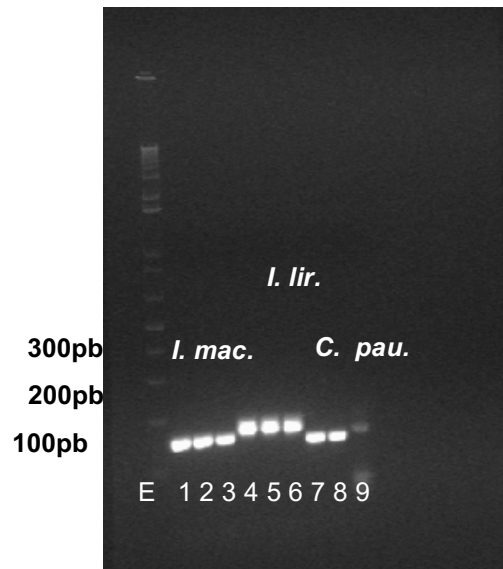


Figure 22 : Gène de l'histone H3 partiel amplifié à l'aide des amorces H3F_1 et H3R_2 chez *I. macrodidyma* (*I. mac.*) PARC345, *I. liriodendri* (*I. lir.*) PARC72 et *C. pauciseptatum* (*C. pau.*) IAF45 aux trois températures d'hybridation par PCR en gradient de températures

E	= 1Kb Plus DNA Ladder
#1, 2, 3	= Produits PCR de <i>I. mac.</i> PARC345 amplifiés à 60°C, 62°C et 64°C
#4, 5, 6	= Produits PCR de <i>I. lir.</i> PARC72 amplifiés à 60°C, 62°C et 64°C
#7, 8, 9	= Produits PCR de <i>C. pau.</i> IAF45 amplifiés à 60°C, 62°C et 64°C

2.4. Fonctionnement des amorces et des sondes dans des réactions monoplex

Le premier test du fonctionnement des sondes dans une qPCR monoplex a été effectué en utilisant le programme habituel, comportant une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 30 secondes. Le mélange réactionnel de 20 µl (revoir le tableau 6 pour les volumes des réactifs), additionné de 1,2 µL de MgCl₂ (stock concentré à 25mM), a été utilisé. Ce test a été effectué individuellement en utilisant les souches *I. macrodidyma* PARC345, *I. liriodendri* PARC72 et *C. pauciseptatum* IAF45, en présence des sondes MAC1, LIR1 et PAU1, respectivement. Comme l'efficacité des trois réactions monoplex dépassait la limite supérieure théorique (Tableau 12), qui est 1,10, il a été jugé qu'une optimisation était nécessaire.

Tableau 12 : Efficacité des trois réactions monoplex, chacune incluant individuellement MAC1, LIR1 et PAU1, lors du premier essai

Sonde utilisée	Souche testée	Efficacité de réaction
MAC1	<i>I. macrodidyma</i> PARC345	1,15045
LIR1	<i>I. liriodendri</i> PARC72	1,13917
PAU1	<i>C. pauciseptatum</i> IAF45	1,12187

L'optimisation de la réaction monoplex en question a requis des modifications de temps et de température d'hybridation/élongation. Après avoir effectué plusieurs essais, le meilleur résultat, résumé dans le tableau 13, a été obtenu lorsque le programme de qPCR comprenait une étape d'hybridation/élongation à 64°C pendant 20 secondes.

Tableau 13 : Chiffres sur les huit réactions monoplex optimisées ayant ciblé *I. macrodidyma*, *I. liriodendri* et *C. pauciseptatum*

Espèce	<i>I. macrodidyma</i>		<i>I. liriodendri</i>			<i>C. pauciseptatum</i>		
Souche	345	398	60	72	393	44	45	46
Threshold	0,040		0,040			0,040		
R ²	0,99748	0,99726	0,97131	0,99068	0,99671	0,99307	0,99209	0,99714
Efficacité	1,12123	1,12636	1,04864	1,12309	1,08418	1,09840	1,07583	1,10369

2.5. Spécificité des sondes

Le test de spécificité des trois sondes, MAC1, LIR1 et PAU1, a été effectué en condition monoplex en utilisant l'ADN des neuf espèces fongiques mentionnées dans le chapitre « Matériel et Méthodes ».

Selon les courbes des figures 23-MAC1 et 23-PAU1, il n'y a eu aucune amplification non-spécifique dans les réactions monoplex examinées. Chacune des trois sondes était alors très spécifique à l'ADN cible. Par contre, la figure 24 montre que le canal rouge a détecté le signal fluorescent émis par la sonde MAC1 lorsqu'elle s'est hybridée à l'ADN de *I. macrodidyma*. Comme MAC1 est attaché au fluorochrome ROX, qui émet une fluorescence de couleur orange

à 608 nm, son signal n'est pas supposé d'être capté par le canal rouge qui lit seulement la fluorescence émise à 660 nm (Corbett Life Science, 2006). Le remplacement du fluorochrome est nécessaire si une telle interférence de fluorescence donne un résultat faux positif, mais dans la figure 24, l'amplification n'a été détectable qu'après 39 cycles de PCR. Comme les futurs utilisateurs des réactions multiplex développées dans ce projet seront avisés que le nombre de cycles maximal qu'ils pourront atteindre sera 38 pour cette réaction, aucun changement du fluorochrome n'a été effectué.

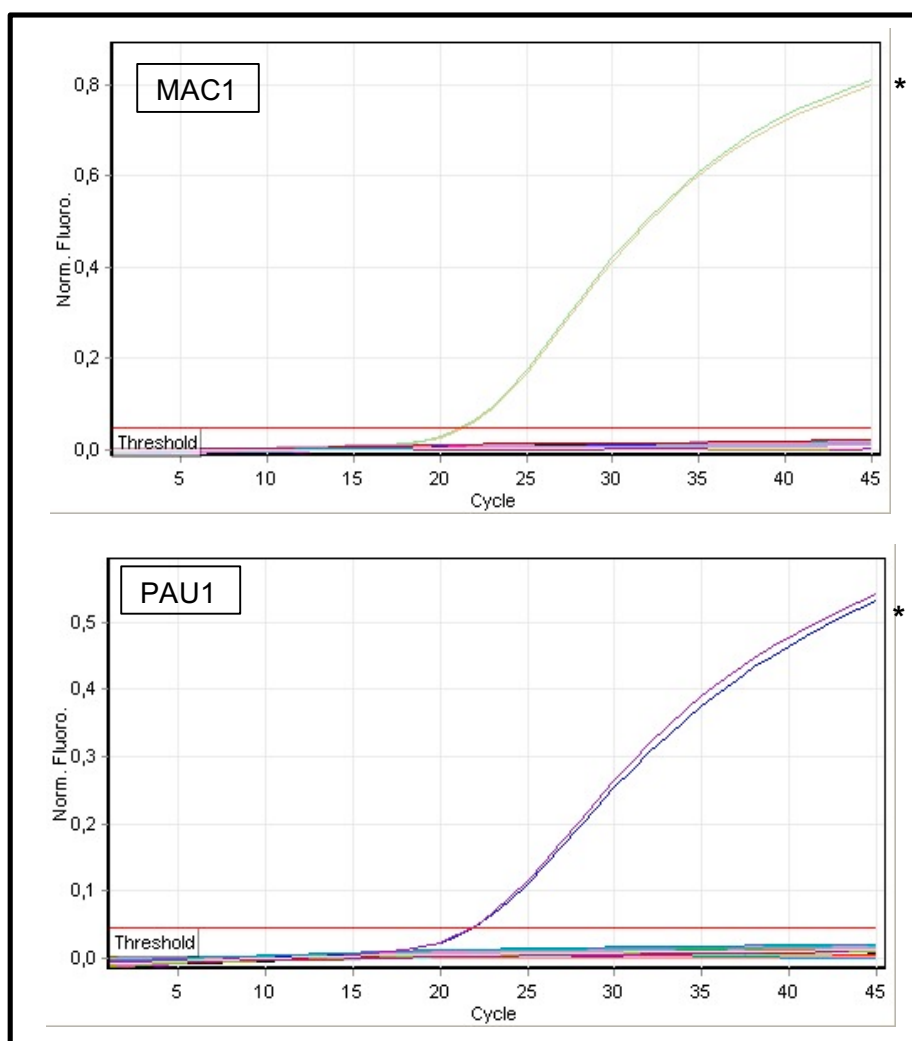


Figure 23 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde MAC1 (haut) et PAU1 (bas) contre leurs cibles (*) et huit espèces non-ciblées

Le témoin positif (*) était 3 ng d'ADN génomique de *I. macrodidyma* et de *C. pauciseptatum* pour MAC1 (haut) et PAU1 (bas), respectivement. Les espèces de témoin négatif sont indiquées dans le tableau 7. Le seuil a été ajusté à 0,045 dans les deux cas.

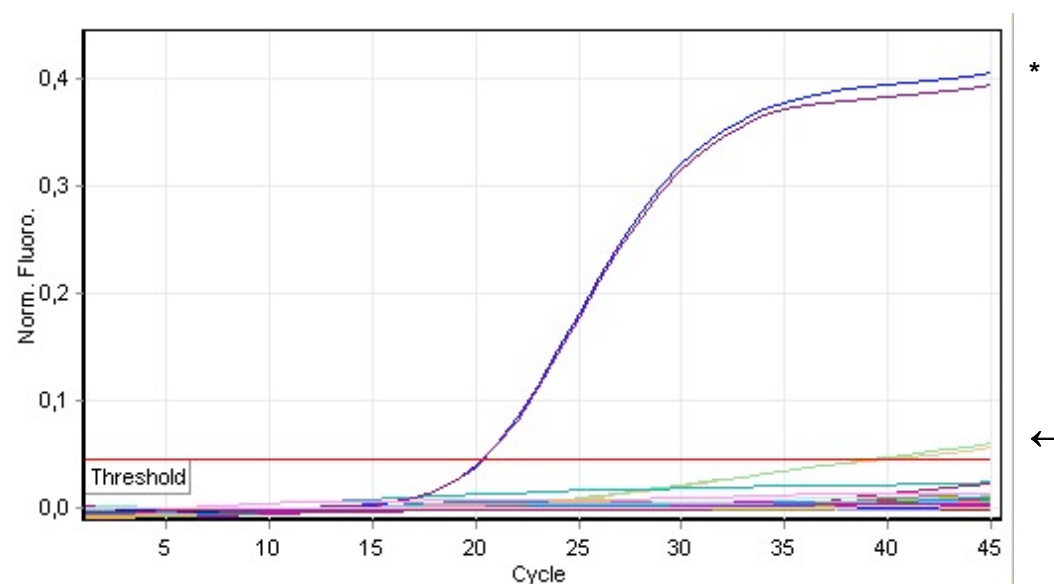


Figure 24 : Courbes d'amplifications générées suite au test de spécificité de la sonde LIR1 contre l'espèce cible (*I. liriodendri*) et huit espèces non-ciblées

Les trois courbes d'amplifications (*) représentent la présence de l'espèce cible dans les réactions effectuées en triplicata. Celles qui sont indiquées par la flèche est le résultat d'interférence de fluorescence orange (MAC1 – *I. macrodidyma*) qui est lue par le canal rouge.

2.6. Fonctionnement des sondes dans des qPCR duplex

Avant d'examiner l'efficacité des sondes en condition triplex, trois réactions duplex ont été effectuées pour évaluer le fonctionnement de chaque paire de sondes. Les souches sélectionnées dans cette étape du projet étaient *I. macrodidyma* PARC398, *I. liriodendri* PARC393, et *C. pauciseptatum* IAF45. Selon le tableau 14, l'efficacité de chacune des trois réactions duplex testées était toujours comprise entre 0,90 et 1,10, sauf celle de la sonde MAC1 dans une réaction contenant également la sonde PAU1. Dans cette réaction, l'efficacité de la sonde MAC1 était 1,12947, soit légèrement au-dessus de sa limite théorique supérieure. Toutefois, lors du développement de la réaction multiplex ciblant l'ADN des champignons responsables de l'esca, il avait été déterminé que l'efficacité de réaction a tendance à diminuer lorsqu'on augmente le nombre de sondes ajoutées dans le mélange réactionnel. Ainsi, aucune optimisation de réaction n'a été effectuée à cette étape, car il était fort probable que l'efficacité de la sonde MAC1 tomberait dans une marge acceptable en condition triplex.

Tableau 14 : Chiffres sur les trois réactions duplex effectuées avec les sondes MAC1, LIR1 et PAU1

Paire des sondes	MAC1 – LIR1		LIR1 – PAU1		MAC1 – PAU1	
Souches	PARC398	PARC393	PARC393	IAF45	PARC398	IAF45
Threshold	0,045		0,045		0,045	
R²	0,98073	0,99365	0,99558	0,99211	0,99484	0,99374
Efficacité	1,01474	0,93614	0,93546	0,93841	1,12947	0,96488

2.7. Fonctionnement des sondes dans une qPCR triplex

Le test du fonctionnement des trois sondes dans une réaction triplex a été effectué en utilisant les mêmes souches ayant été choisies pour examiner l'efficacité des sondes en condition duplex, soit *I. macrodidyma* PARC398, *I. liriodendri* PARC393, et *C. pauciseptatum* IAF45.

L'efficacité de chacune des trois sondes a été calculée en condition triplex, et elle se situait dans le niveau acceptable (Figures 25, 26 et 27). Tel qu'espéré, celle de la sonde MAC1 a diminué pour qu'elle soit en-dessous de 1,10 (Figure 25). La réaction triplex a été lancée deux fois pour vérifier la reproductibilité du résultat, et les trois sondes étaient efficaces lors des deux essais. Parallèlement, les valeurs de cycle seuil en condition monoplex et triplex ont été comparées entre elles pour chacune des sondes (Figures 25, 26 et 27). En moyenne, dans la réaction triplex, l'ADN de *I. macrodidyma* PARC398, celui de *I. liriodendri* PARC393, et celui de *C. pauciseptatum* IAF45 ont été détectés environ 1,8, 0,7 et 1,6 cycles plus tard qu'en condition monoplex, respectivement.

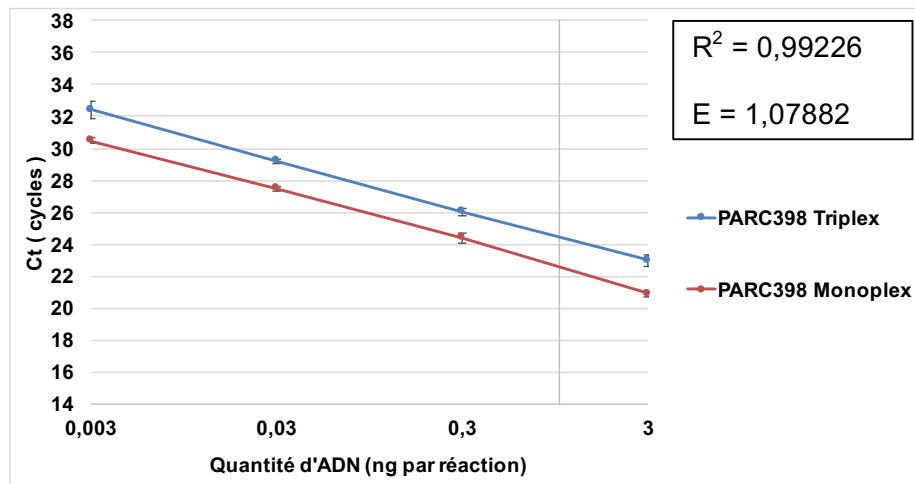


Figure 25 : Courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex dans lesquelles les dilutions d'ADN de *I. macrodidyma* sont détectées par la sonde MAC1

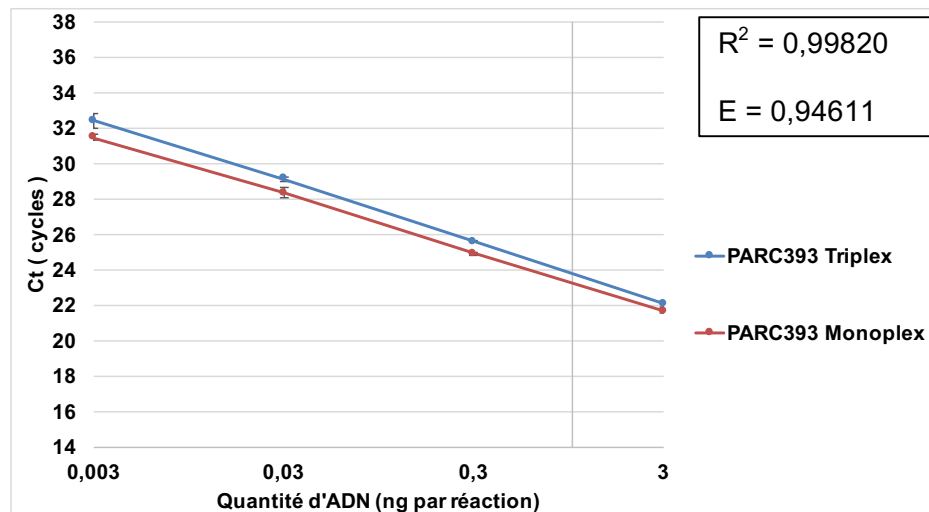


Figure 26 : Courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex dans lesquelles les dilutions d'ADN de *I. liriodendri* sont détectées par la sonde LIR1

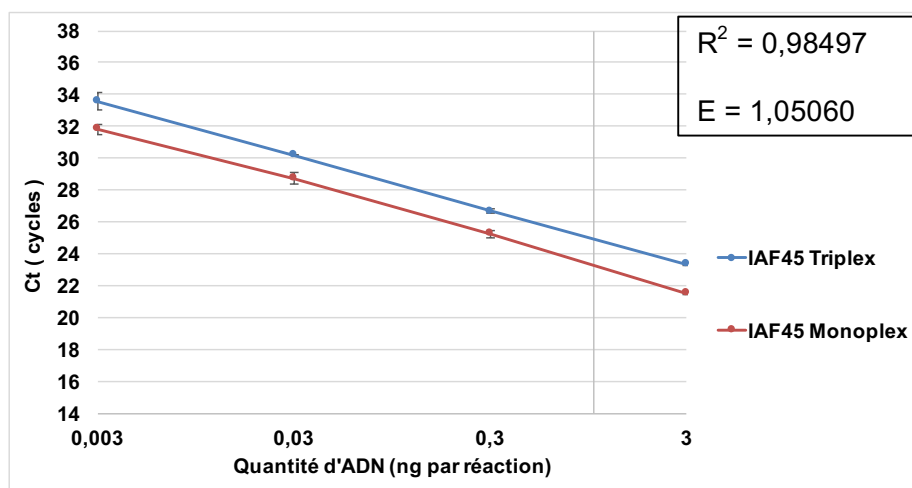


Figure 27 : Courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex dans lesquelles les dilutions d'ADN de *C. pauciseptatum* sont détectées par la sonde PAU1

2.8. Détermination de limite de détection

Deux souches de *I. macrodidyma*, trois souches de *I. liriodendri*, et trois souches de *C. pauciseptatum* ont été utilisées pour déterminer la limite de détection de chacune des sondes. La sonde MAC1 a pu détecter 3×10^{-5} ng d'ADN cible comme le montre la figure 28, mais les triplicatas n'ont pas donné un résultat stable ; seulement un ou deux réplicats sur trois se sont révélés positifs à cette concentration, ce qui démontre que cette quantité d'ADN est sur la limite de détection de la réaction. Concernant les sondes LIR1 et PAU1, il y a eu une grande variabilité dans la limite de détection dépendamment des souches (Figures 29 et 30). LIR1 a détecté au minimum 3×10^{-5} ng d'ADN de PARC60 et 3×10^{-6} ng d'ADN de PARC393. Quant à la souche PARC72, 3×10^{-4} ng de son ADN était nécessaire pour détecter la présence de ce champignon, mais on a observé également la détection, probablement par coïncidence, d'un réplicat sur trois de 3×10^{-6} ng d'ADN par LIR1. Sur la figure 30, on constate que PAU1 a pu dépister jusqu'à 3×10^{-3} , 3×10^{-4} , 3×10^{-5} ng d'ADN de IAF46, IAF44, et IAF 45, respectivement.

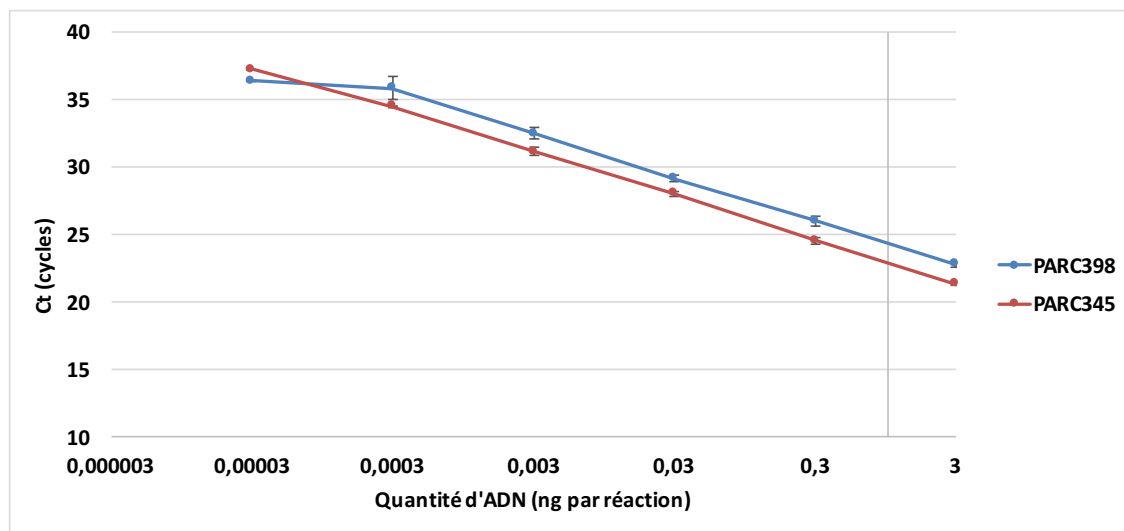


Figure 28 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des deux souches de *I. macrodidyma* PARC345 et PARC398, détectées par la sonde MAC1 dans la réaction triplex

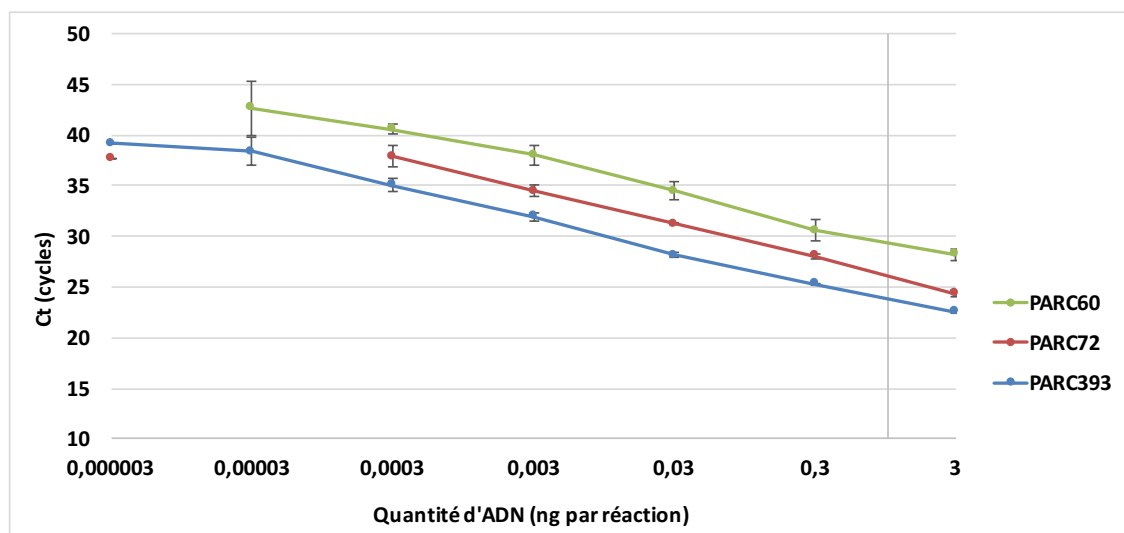


Figure 29 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de *I. liriodendri* PARC60, PARC72 et PARC393, détectées par la sonde LIR1 dans la réaction triplex

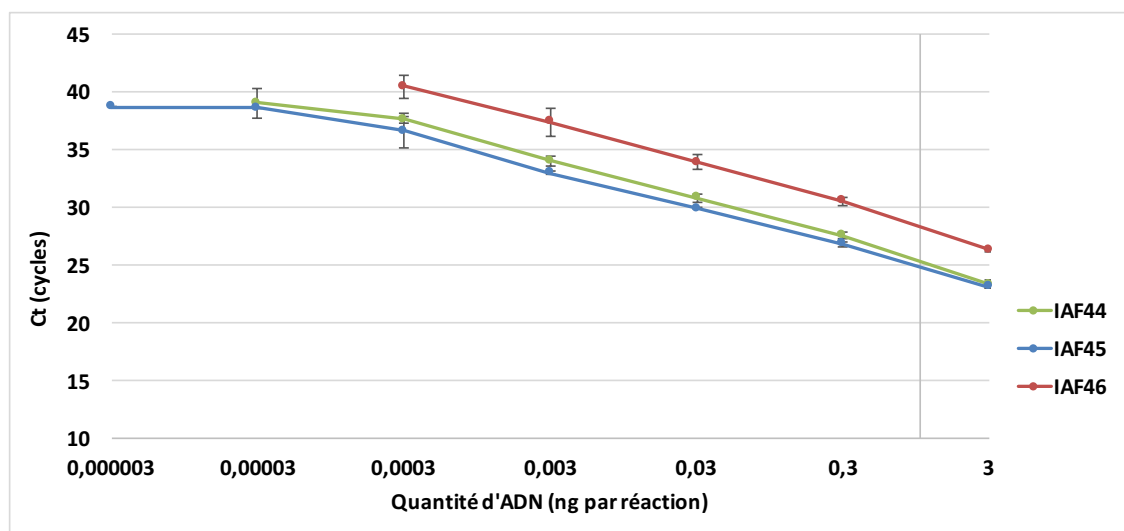


Figure 30 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de *C. pauciseptatum* IAF44, IAF45 et IAF46, détectées par la sonde PAU1 dans la réaction triplex

3. Développement du système triplex – *black dead arm*

Les trois espèces ciblées lors du développement du troisième système multiplex étaient *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*, et *Neofusicoccum parvum*.

3.1. Détermination de la région cible et conception des sondes

Les séquences de la région ITS1, de la région ITS2 et du gène codant pour la bêta-tubuline de dizaines de souches des trois espèces cibles retrouvées dans la banque de données GenBank ont été alignées par Clustal Omega. Selon le résultat de comparaison, les régions ITS1 et ITS2 contenaient plus de variations interspécifiques que le gène bêta-tubuline. Puisque les séquences hypervariables présentes dans la région ITS1 étaient extrêmement riches en guanine et en cytosine, la région ITS2 a été choisie pour être la région cible. La paire d'amorces universelles ITS3 et ITS4 a été sélectionnée pour amplifier la région ITS2 chez les trois espèces en question. Les sondes ont été dessinées comme d'habitude, en utilisant l'outil PrimerQuest®, et ces séquences ont été ensuite comparées avec les séquences de divers microorganismes par Blast. Tel qu'illustré dans la figure 31, les sondes spécifiques à *B. dothidea*, à *D. seriata*, et

à *N. parvum* ont été nommées BD1 (fluorochrome jaune HEX), DS1 (fluorochrome orange ROX) et NP1 (fluorochrome rouge Cy5), respectivement.

DS1	-----
D_seriate	-CATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCTCTCTGCGGACGCGCCTT
BD1	-----TCCTTTG--CGGGCGCGCCTC
B_dothidea	TCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTG--CGGGCGCGCCTC
NP2	-----TCCA--CGGACGCGCCTT
N_parvum	-----CAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCCGTCCTCCA--CGGACGCGCCTT

DS1	-----TGTTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAG-----
D_seriate	AAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAG
BD1	-----
B_dothidea	AAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAACATACATCTCGCTTTCGGAG
NP2	-----
N_parvum	AAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAAAAACA--CCTCGCTTTGGAG

Figure 31: Séquences des sondes DS1, BD1 et NP2 alignées à celles de la région ITS2 chez *D. seriata* PARC90, *B. dothidea* PARC78 et *N. parvum* PARC15

Les séquences de la région ITS2 chez les trois souches ont été obtenues en séquençant leur région ITS complète. La figure ci-haut montre une partie de la région ITS2 qui a été ciblée par les trois sondes DS1, BD1 et NP2.

3.2. PCR conventionnelle en gradient de température

Pour avoir une idée de la température d'hybridation/élongation qui peut être utilisée dans le premier essai de PCR en temps réel monoplex, l'ADN de toutes les souches des trois espèces responsables du *black dead arm* a été amplifié par les amorces ITS3 et ITS4 aux deux températures, soit 60°C et 64°C. Les épaisseurs des bandes de produits PCR amplifiés à 64°C, qui ont été migrés sur le gel d'agarose 1,5%, étaient variables dépendamment des souches, et les bandes d'amplification non-spécifique étaient clairement visibles (Figure 32). Toutefois, les produits amplifiés à 60°C étaient tous visiblement épais et intenses sur le même gel d'agarose. Pour cette raison, cette dernière a été choisie comme la première à être essayée pour l'hybridation/élongation dans la réaction en temps réel monoplex. Effectivement, on voit la

présence des bandes non-spécifiques même si l'amplification a été effectuée à 60°C (Figure 32), mais leur épaisseur est beaucoup moins intense que les produits PCR voulus.

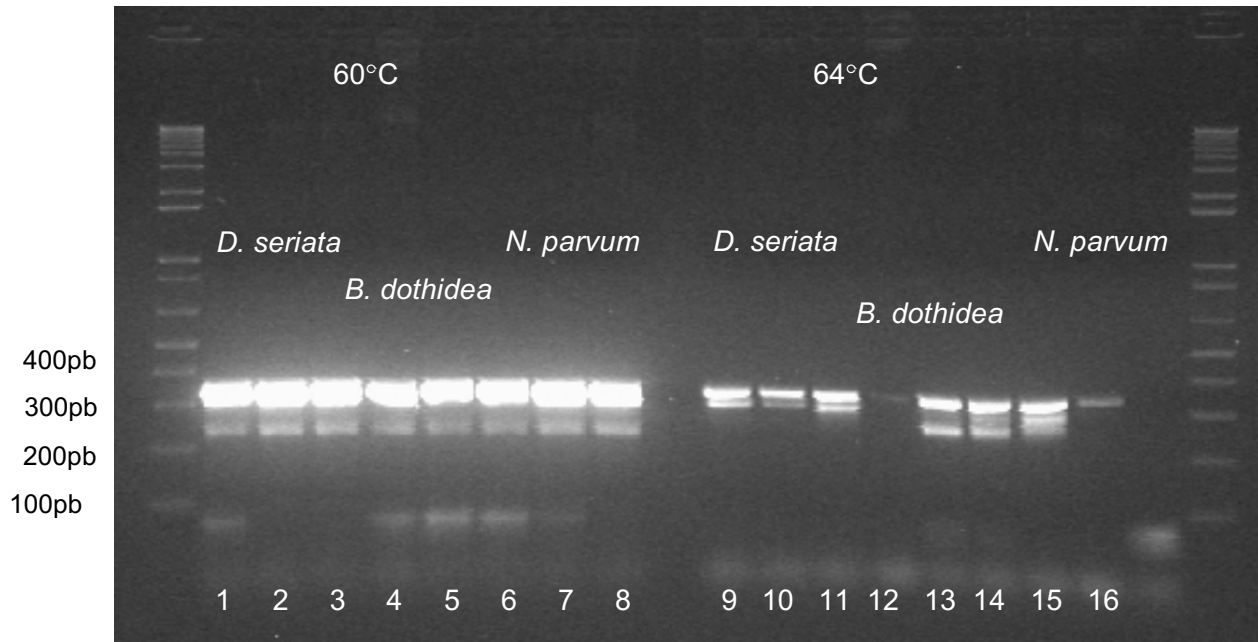


Figure 32 : Région ITS2 amplifiée chez les trois souches de *D. seriata*, les trois souches de *B. dothidea*, les deux souches de *N. parvum* aux deux températures d'hybridation par PCR en gradient de températures

- | | |
|----------|--|
| E | = 1Kb Plus DNA Ladder |
| #1 et 9 | = région ITS2 de <i>D. seriata</i> PARC84 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #2 et 10 | = région ITS2 de <i>D. seriata</i> PARC90 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #3 et 11 | = région ITS2 de <i>D. seriata</i> PARC91 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #4 et 12 | = région ITS2 de <i>B. dothidea</i> PARC32 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #5 et 13 | = région ITS2 de <i>B. dothidea</i> PARC78 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #6 et 14 | = région ITS2 de <i>B. dothidea</i> PARC201 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #7 et 15 | = région ITS2 de <i>N. parvum</i> PARC15 amplifiée à 60°C et 64°C |
| #8 et 16 | = région ITS2 de <i>N. parvum</i> PARC37 amplifiée à 60°C et 64°C |

3.3. Fonctionnement des amorces et des sondes dans des qPCR monoplexes

Tel que mentionné dans le paragraphe précédent, la température d'hybridation/élongation dans le premier test de qPCR monoplex a d'abord été fixée à 60°C, et le temps à 30 secondes. Le

mélange réactionnel de 20 μ l (référer au tableau 6 dans le chapitre « Matériel et Méthodes ») contenait 1,2 μ l de $MgCl_2$ (stock concentré à 25 mM).

Toutes les trois sondes dessinées détectaient bien leurs espèces cibles, et l'efficacité des réactions monoplex de chacune des sondes était située dans une zone acceptable sauf pour la sonde DS1 contre la souche *D. seriata* PARC91 (Tableau 15). Lorsque l'ADN de cette dernière a été ajouté dans une réaction, l'efficacité de la sonde DS1 était 1,18315, soit légèrement au-dessus de sa limite théorique supérieure. Selon ce qui a été observé pendant le développement des deux dernières réactions multiplex, il a été jugé qu'aucune optimisation de réaction n'était nécessaire, car l'efficacité de réaction descendrait probablement en condition multiplex.

Tableau 15 : Chiffres sur les huit réactions monoplex optimisées, ayant ciblé *B. dothidea*, *D. seriata* et *N. parvum*

Espèce	<i>B. dothidea</i>			<i>D. seriata</i>			<i>N. parvum</i>	
Souche	32	78	201	84	90	91	15	37
Seuil	0,060			0,060			0,080	
R ²	0,99912	0,99975	0,99896	0,99980	0,99879	0,99415	0,99831	0,99906
Efficacité	1,02358	0,98872	1,04281	0,95980	1,01215	1,18315	0,99814	1,06579

3.4. Spécificité des sondes

Le test de spécificité a été effectué en utilisant l'ADN de neuf espèces fongiques : une souche chacune de *D. seriata*, *B. dothidea* et *N. parvum* comme témoins positifs, et six autres espèces comme témoins négatifs (revoir le tableau 7 pour les noms des espèces). Dans la figure 33, aucune amplification non-spécifique n'a été observée lorsque les sondes DS1 et BD1 ont été ajoutées dans des réactions monoplex. Par contre, la sonde NP1 a pu détecter 3 ng d'ADN de *D. seriata* PARC90 dès le 15^{ème} cycle de PCR (Figure 34). Cette amplification a été détectée au début de PCR et les courbes d'amplifications ont atteint un niveau de fluorescence assez élevé, soit environ la moitié du témoin positif. Pour éliminer la possibilité de faux positif, la sonde NP1 a été redessinée en ciblant cette fois-ci un autre endroit dans la région ITS2 chez *N. parvum*.

La nouvelle sonde spécifique à l'ADN de *N. parvum*, nommée NP2, a montré une nette amélioration. Elle ne détectait aucune espèce fongique non-ciblée, sauf qu'il y a eu encore une légère amplification de *D. seriata* PARC90 qui est indiquée par une flèche sur la figure 34. Mais

l'ajustement du niveau seuil à 0,080 a fait en sorte que *D. seriata* n'est maintenant détecté qu'après 43 cycles. Or, la règle standard de PCR en temps réel en général est que le nombre maximal de cycles qu'on peut considérer est 40 (Caraguel et al., 2011). La détection de *D. seriata* PARC90 par la sonde NP2 peut donc être ignorée.

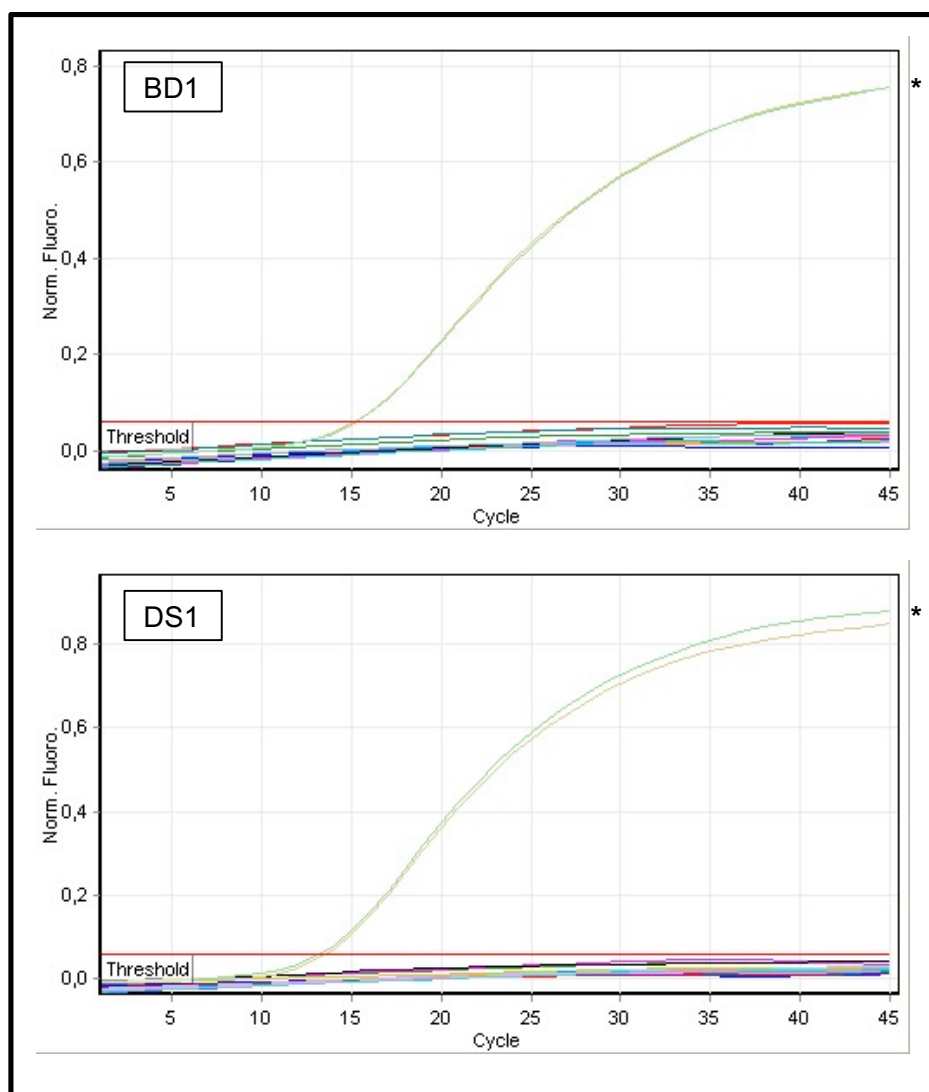


Figure 33 : Courbes d'amplification résultant du test de spécificité de la sonde BD1(haut) et DS1 (bas) contre l'espèce cible (*) et huit espèces non-ciblées

Le témoin positif (*) était 3 ng d'ADN génomique de *B. dothidea* et de *D. seriata* pour BD1 (haut) et DS1 (bas), respectivement. Les espèces de témoin négatif sont indiquées dans le tableau 7. Le seuil a été ajusté à 0,060 dans les deux expériences.

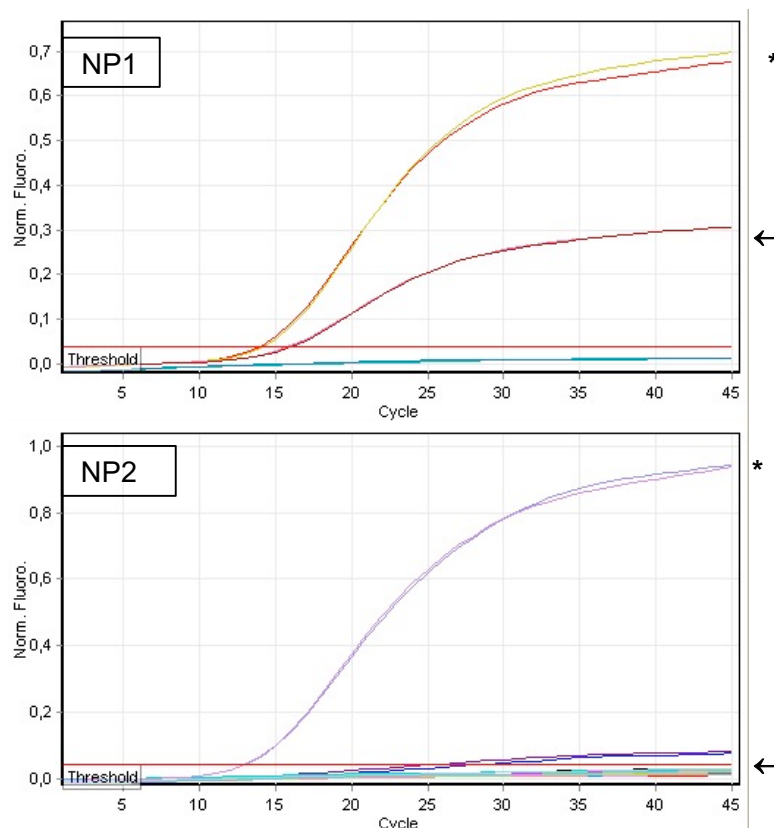


Figure 34 : Courbes d'amplification générées suivant le test de spécificité de la sonde NP1 (haut) et de la sonde NP2 (bas)

Les courbes d'amplifications dotées d'une étoile indiquent la présence de l'ADN de *N. parvum* dans une réaction. Celles qui sont pointées par une flèche représentent le résultat de l'hybridation de la sonde NP2 sur la région ITS2 chez *D. seriata*.

3.5. Fonctionnement des sondes dans des qPCR duplex

Le test des réactions duplex a été effectué individuellement pour chacune des trois paires de sondes. Les souches *B. dothidea* PARC201, *D. seriata* PARC90, et *N. parvum* PARC15 ont été utilisées dans cette étape. Toutes les paires de sondes fonctionnaient de façon efficace (Tableau 16). Toutes les valeurs d'efficacité de réactions duplex étaient comprises entre 0,90 et 1,10 sans nécessité d'optimisation.

Tableau 16 : Chiffres sur les trois réactions duplex effectuées avec les sondes BD1, DS1 et NP2

Paire des sondes	BD1 – DS1		BD1 – NP2		DS1 – NP2	
Souches	PARC201	PARC90	PARC201	PARC15	PARC90	PARC15
Seuil	0,060		0,060	0,080	0,060	0,080
R ²	0,98040	0,99836	0,99725	0,99422	0,99654	0,99772
Efficacité	0,94814	1,09909	0,97791	0,98038	1,06564	0,93215

3.6. Fonctionnement des sondes dans une qPCR triplex

Le premier essai de la réaction triplex a révélé qu'aucune des trois sondes n'était efficace lorsqu'elles étaient mises ensemble dans une seule réaction. Pour régler ce problème, plusieurs paramètres ont été modifiés, tels que la température de l'étape d'hybridation/élongation et la concentration des réactifs dans le mélange réactionnel afin d'identifier les facteurs affectant l'efficacité de cette réaction. Finalement, la réaction triplex a été optimisée en modifiant la concentration de la sonde NP2 et celle du MgCl₂ pour qu'elles soient 0,3 µM et 1,78 mM, respectivement. Plus précisément, le mélange réactionnel de 25 µl (voir le tableau 8 pour la recette de base) contenait maintenant 0,88 µl de MgCl₂ (stock concentré à 50mM), 0,1 µl de DS1 et BD1, ainsi que 0,15 µl de NP2 (stock concentré à 50 µM) pour une réaction. Le programme de qPCR comprenait une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 30 secondes. Dans ces conditions, l'efficacité de réaction triplex pour chacune des trois sondes était située dans une marge acceptable (Figures 35, 36 et 37). De plus, la réaction triplex a été effectuée une deuxième fois, confirmant que le résultat était reproductible (résultats non-montrés).

En parallèle, les valeurs de cycles seuil, auxquelles chacune des dilutions d'ADN cible a été détectée, dans des conditions monoplex et triplex ont été comparées pour chacune des trois sondes (Figures 35, 36 et 37). En moyenne, la différence des valeurs de Ct entre les deux conditions qu'on a mesurée pour BD1, DS1 et NP2 était 4,8, 2,2 et 6,7 cycles, respectivement. La sensibilité des sondes BD1 et NP2 était donc grandement diminuée en condition triplex comparativement à la condition monoplex.

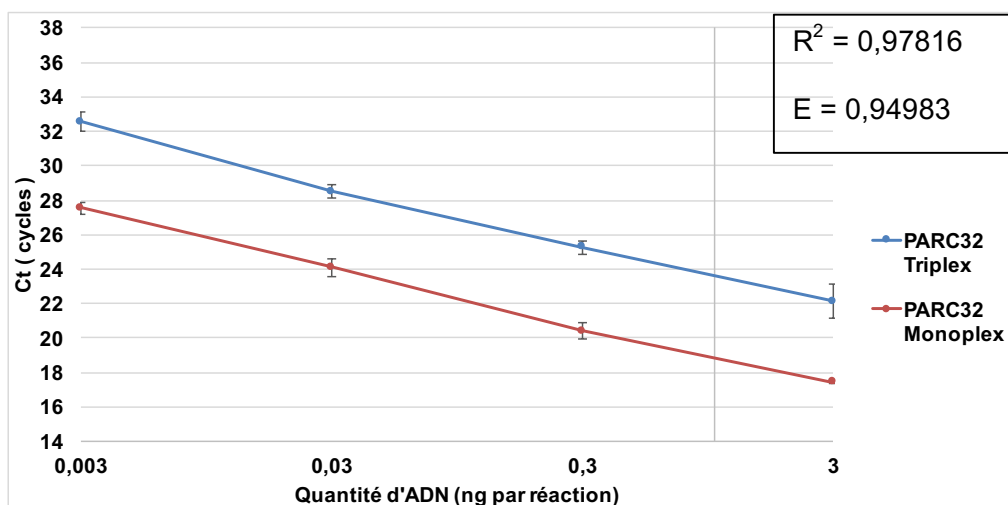


Figure 35 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde BD1 et de l'ADN de *B. dothidea* PARC32

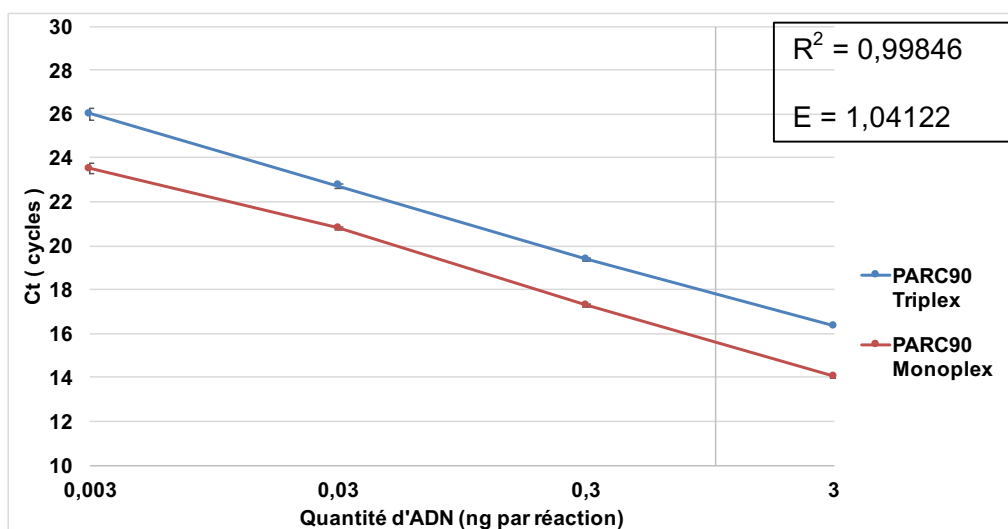


Figure 36 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde DS1 et de l'ADN de *D. seriata* PARC90

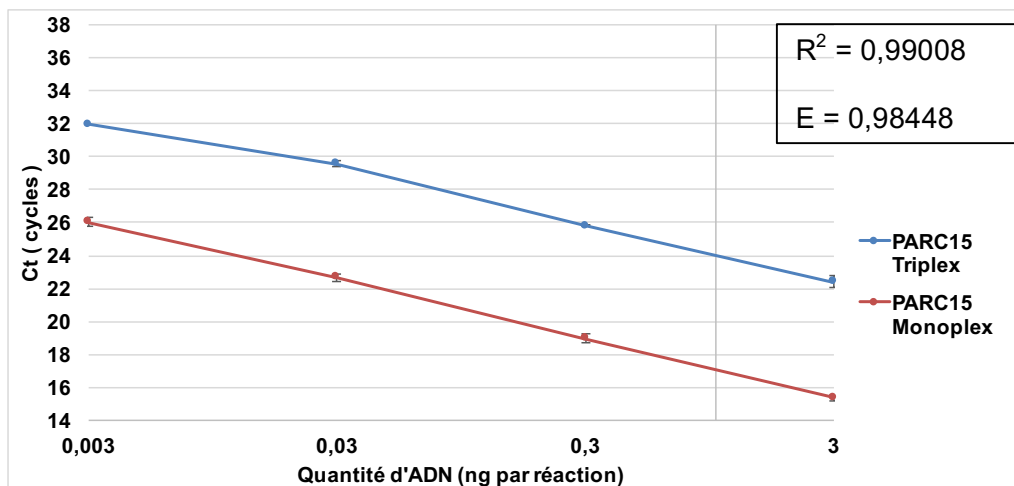


Figure 37 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction triplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde NP2 et de l'ADN de *N. parvum* PARC15

3.7. Détermination de limite de détection

Selon la figure 38, un minimum de 3×10^{-4} ng d'ADN de *D. seriata* PARC84 était détectable, tandis que DS1 a pu émettre des signaux positifs avec 10 fois moins d'ADN des deux autres souches. D'un autre côté, la quantité minimale d'ADN de *B. dothidea* et de *D. seriata* qui s'est révélée positive était 3×10^{-4} ng d'ADN par réaction. Cependant, comme indiqué par les barres d'erreur sur les figures 39 et 40, il y a eu une énorme variabilité dans les valeurs de Ct entre les triplicats. De plus, l'amplification d'ADN de *B. dothidea* PARC32 et PARC201, ainsi que celle des deux souches de *N. parvum* ont eu lieu après 40 cycles.

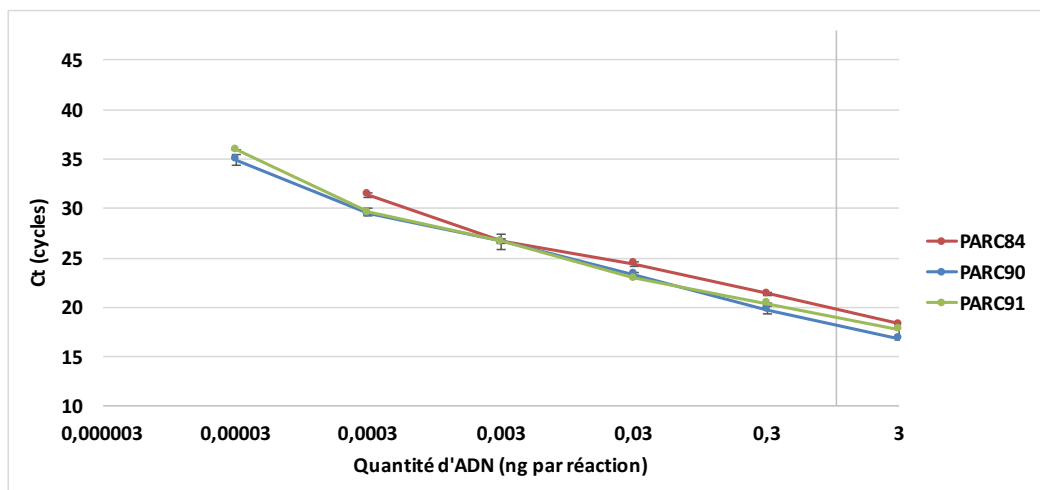


Figure 38 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de *D. seriata* PARC84, PARC90 et PARC91, détectées par la sonde DS1 dans la réaction triplex

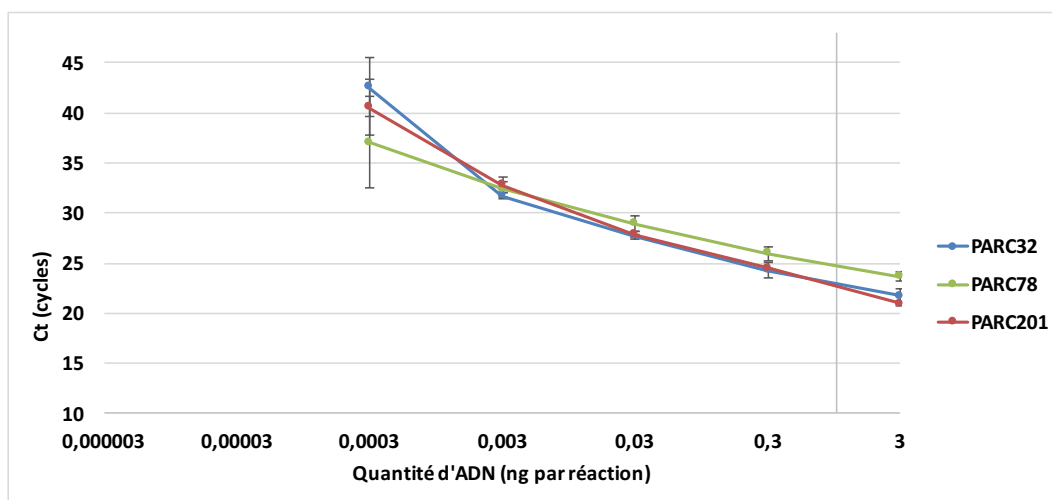


Figure 39 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches de *B. dothidea* PARC32, PARC78 et PARC201, détecté par la sonde BD1 dans la réaction triplex

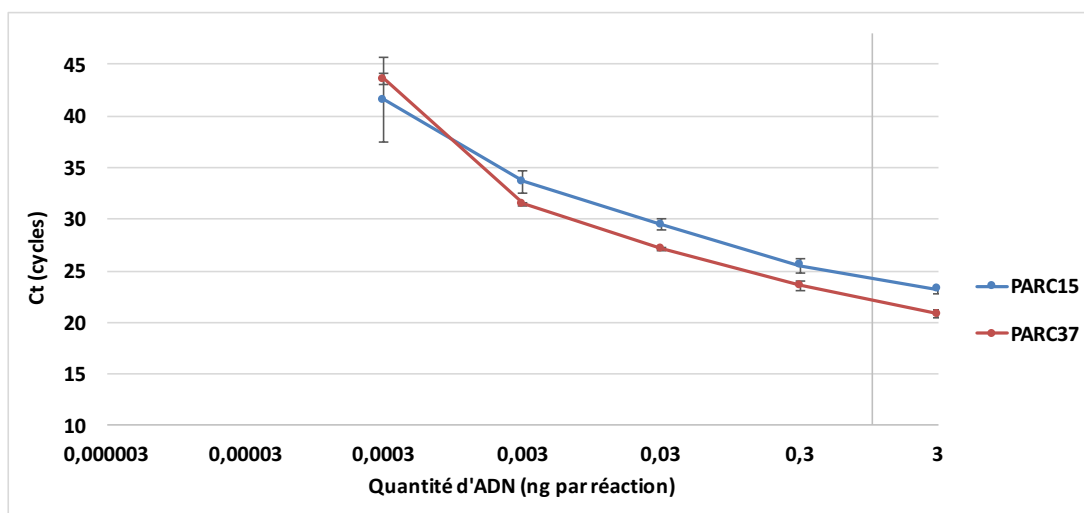


Figure 40 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des deux souches de *N. parvum* PARC15 et PARC37, détectées par la sonde NP2 dans la réaction triplex

4. Développement du système duplex – excoriose et eutypiose

Les deux espèces ciblées lors du développement du quatrième système multiplex étaient *Phomopsis viticola* et *Eutypa lata*, qui sont des pathogènes responsables de l'excoriose et de l'eutypiose, respectivement.

4.1. Détermination de la région cible et conception des sondes

Les trois souches de *E. lata* ont été fournies par le Dr Ûrbez-Torres, alors que la souche de *P. viticola* nous a été envoyée par le Dr Trouillas. Leur affiliation a été confirmée par séquençage de la région ITS et du gène de facteur d'élongation 1- α .

L'alignement de la région ITS à l'aide de Clustal Omega a permis de révéler la présence de régions variables entre les deux espèces dans la région ITS1. Deux sondes ont été dessinées dans ces régions en se servant de l'outil PrimerQuest® (Figure 41), et leurs séquences ont été comparées avec les bases de données publiques par Blast. Selon la comparaison, la séquence de la sonde PHO1 et celle de EUT1 n'étaient présentes que dans l'ADN de *P. viticola* et l'ADN de *E. lata*, respectivement. Le fluorochrome rouge, Cy5, a été attaché au PHO1, et le fluorophore jaune, HEX, à EUT1.

P_viticola	-CCCTTTGTGA	ACTCATACCTTACCGTTGCCTCGGCGCAGGCCG	-GCCCCCCTGGGGGG
PHO1	-----	ACTCATACCTTACCGTTGCCTCGG	-----
E_lata	GTTGCCTCGGCGGGGAAGCCT	ACCGGTACCTACCCTGTAGCTACCCGGGAGCGAGCTAC	
EUT1	-----	CCCGGTACCTACCCTGTAGCTACC	-----

Figure 41 : Séquences des sondes PHO1 et EUT1 alignées à celles de la région ITS1 partielle chez *P. viticola* et *E. lata*

Les séquences de la région cible présentées dans la figure ci-dessus ont été obtenues en séquençant la région ITS des souches de *P. viticola* et de *E. lata*. Les sondes PHO1 et EUT1 ont été dessinées en ciblant une partie de cette région ayant suffisamment de variation interspécifique.

4.2. PCR conventionnelle en gradient de température

Pour déterminer la température d'hybridation/élongation à utiliser dans le premier essai de qPCR monoplex, la région ITS1 chez toutes les quatre souches de *P. viticola* et de *E. lata* a été amplifiée par les amorces universelles ITS1 et ITS2 aux quatre températures d'hybridation, soit 60°C, 62°C, 64°C et 66°C. Ces dernières ont été choisies en considérant le fait que les températures optimales de l'étape d'hybridation/élongation dans les réactions multiplex permettant la détection des champignons de l'esca, du pied noir et du *black dead arm* étaient 66°C, 64°C et 60°C, respectivement.

La migration des produits PCR sur le gel d'agarose 1,5% a permis de voir que la région ITS1 chez les quatre souches a été mieux amplifiée à 60°C, 62°C et 64°C (Figure 42). De plus, chez les souches de *E. lata*, l'amplification à 64°C a généré moins de produits non-spécifiques comparativement aux amplifications à 60°C et à 62°C. Ainsi, 64°C a été choisie pour être utilisée comme température d'hybridation/élongation dans le premier essai de qPCR monoplex.

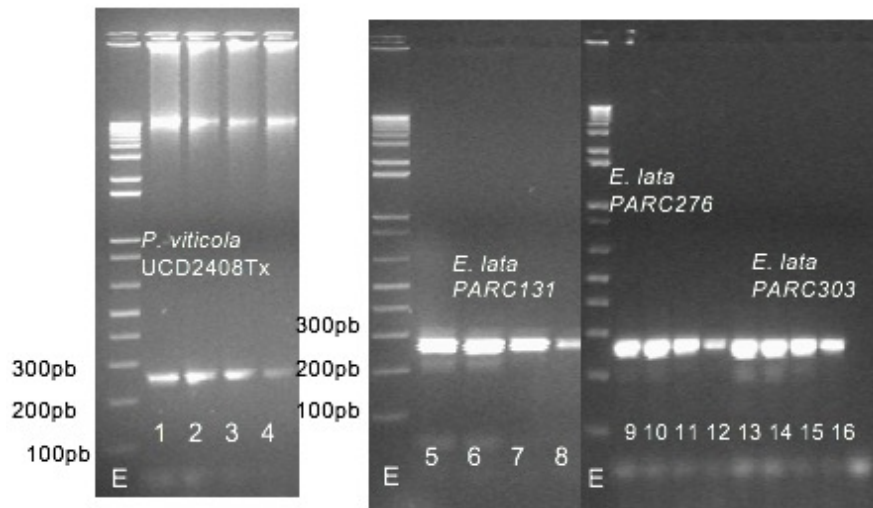


Figure 42: Région ITS1 amplifiée chez une souche de *P. viticola* et les trois souches de *E. lata* aux quatre températures d'hybridation par PCR en gradient de températures

Les quatre bandes de la même souche représentent les produits PCR amplifiés à 60°C, 62°C, 64°C et 66°C (du gauche à droite)

E = 1Kb Plus DNA Ladder

#1 à 4 = région ITS1 de *P. viticola* UCD2408Tx amplifiée à 60°C, 62°C, 64°C et 66°C

#5 à 8 = région ITS1 de *E. lata* PARC131 amplifiée à 60°C, 62°C, 64°C et 66°C

#9 et 12 = région ITS1 de *E. lata* PARC276 amplifiée à 60°C, 62°C, 64°C et 66°C

#13 à 16 = région ITS1 de *E. lata* PARC303 amplifiée à 60°C, 62°C, 64°C et 66°C

4.3. Fonctionnement des amorces et des sondes dans des qPCR monoplexes

Le premier essai de qPCR monoplex a été effectué en ajoutant, dans une réaction de base de 20 μ l (voir le tableau 6 dans le chapitre « Matériel et Méthodes »), 1,2 μ l de $MgCl_2$ (stock concentré à 25mM). Le programme comprenait une étape d'hybridation/élongation à 64°C pendant 30 secondes. Tandis que la réaction monoplex contenant l'ADN de *E. lata* PARC303 était efficace (Tableau 17), les valeurs de l'efficacité des réactions monoplex effectuées en présence de l'ADN de *P. viticola* UCD2408Tx, *E. lata* PARC131, et *E. lata* PARC276 étaient 1,23, 1,24 et 1,20, respectivement. Mais aucune modification n'a été apportée à ces réactions monoplex pour le moment, en espérant la chute de ces valeurs dans la réaction duplex, tel que vu précédemment.

Tableau 17 : Chiffres sur les quatre réactions monoplex optimisées, ayant ciblé *P. viticola* et *E. lata*

Espèce	<i>P. viticola</i>	<i>E. lata</i>		
Souche	UCD2408Tx	131	276	303
Threshold	0,030	0,024		
R ²	0,95035	0,93786	0,93960	0,98980
Efficacité	1,22972	1,23663	1,19536	0,95138

4.4. Spécificité des sondes

La spécificité des sondes PHO1 et EUT1 pour leurs cibles a été vérifiée en choisissant les espèces fongiques non-cibles comme témoins négatifs, puis *P. viticola* et *E. lata* comme témoins positifs (revoir le tableau 7 pour les noms des espèces témoins). Le seuil du canal rouge a été ajusté à 0,030, et celui du canal jaune à 0,024, pour que ceux-ci soient légèrement au-dessus des courbes d'amplification des témoins négatifs (Figure 43). Aucune espèce fongique non-ciblée n'a été détectée par les sondes PHO1 et EUT1 en condition monoplex.

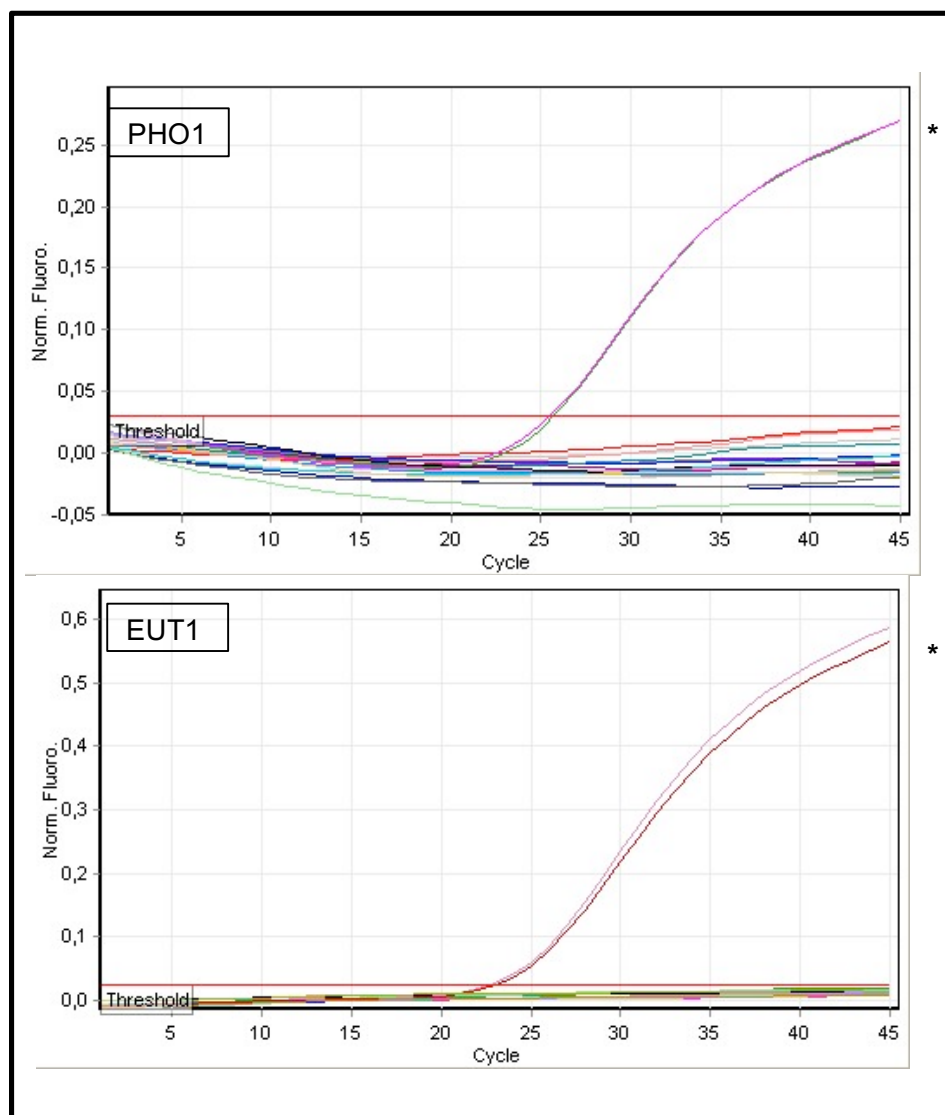


Figure 43 : Courbes d'amplification générées suite au test de spécificité de la sonde PHO1(haut) et EUT1 (bas) contre l'espèce cible (*) et neuf espèces non-ciblées

Le témoin positif (*) était 3 ng d'ADN de *P. viticola* et de *E. lata* pour PHO1 (haut) et EUT1 (bas), respectivement. Les espèces de témoin négatif sont indiquées au tableau 7. Le niveau seuil a été fixé à 0,030 dans l'expérience avec PHO1, et à 0,024 avec EUT1.

4.5. Fonctionnement des sondes en qPCR duplex

Le programme de qPCR monoplex décrit précédemment à l'étape 4.3 du chapitre « Résultats » a été appliqué au premier essai de réaction duplex, qui a été effectué en présence de l'ADN des deux souches, *P. viticola* UCD2408Tx et *E. lata* PARC303. Pour une réaction de 20µl, 1,2µl de MgCl₂ (stock concentré à 25mM) a été ajouté dans le mélange réactionnel de base (voir le tableau 7 pour les autres réactifs contenus dans le mélange réactionnel). L'efficacité de la réaction duplex mesurée pour la sonde PHO1 était 0,90. D'un autre côté, contrairement à ce qui a été espéré, l'efficacité de la sonde EUT1 a trop baissé en comparaison avec la réaction en monoplex jusqu'à 0,87. Pour régler ce problème, la concentration de MgCl₂ dans le mélange réactionnel a été augmentée. Parmi les deux concentrations de MgCl₂ testées, soit 1,65 mM et 2 mM, le meilleur résultat a été obtenu lorsque le mélange réactionnel contenait 2 mM (Tableau 18). Cette quantité exclut le MgCl₂ qui est déjà présent dans le 2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix. La réaction duplex a été effectuée deux fois pour montrer que le résultat était reproductible (résultats non-montrés).

Tableau 18 : Effet de modification de la concentration de MgCl₂ dans une réaction duplex contenant les sondes PHO1 et EUT1

Concentration de MgCl ₂	1,5mM		1,65mM		2,0mM	
Sonde	PHO1	EUT1	PHO1	EUT1	PHO1	EUT1
R ²	0,98794	0,99161	0,97979	0,98804	0,93323	0,98732
Efficacité	0,89962	0,86581	1,06513	1,10594	1,03824	1,01091

Une fois que la réaction duplex a été optimisée, les valeurs de Ct mesurées dans les réactions monoplex et duplex ont été comparées entre elles. Selon la figure 44, les courbes représentant la relation entre les cycles seuil et la quantité d'ADN de *P. viticola* UCD2408Tx, dans des réactions monoplex et duplex, se superposent, ce qui signifie que la sonde PHO1 en condition duplex est aussi sensible qu'en condition monoplex. Lorsque les Ct mesurés en utilisant la sonde EUT1 dans les deux conditions ont été comparées entre elles, il y a eu une différence de 1,8 cycles en moyenne. En fait, comme la figure 45 le montre, EUT1 est légèrement plus sensible dans la réaction duplex qu'en monoplex, alors que le même mélange réactionnel a été employé pour les deux réactions.

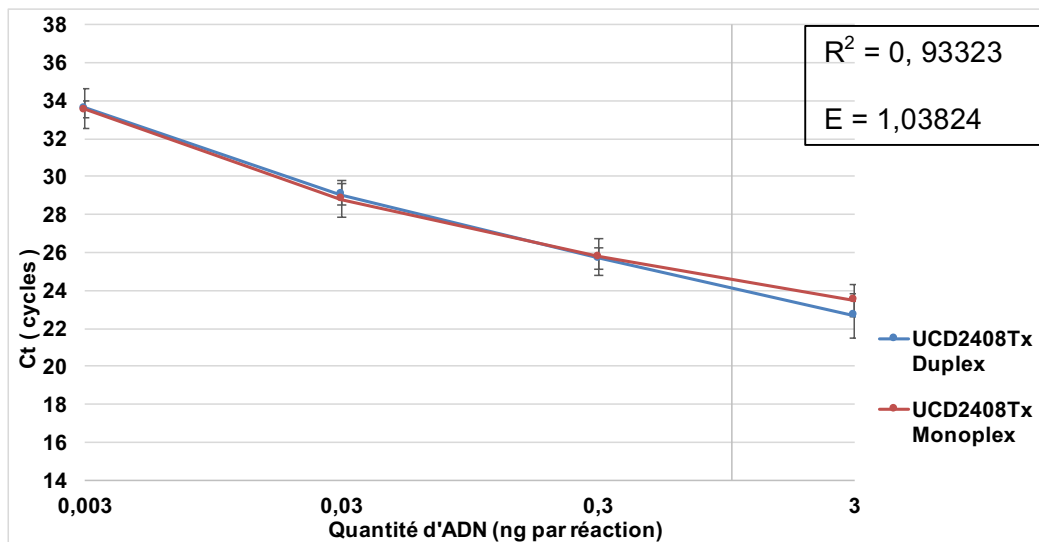


Figure 44 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction duplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde PHO1 et de l'ADN de *P. viticola* UCD2408Tx

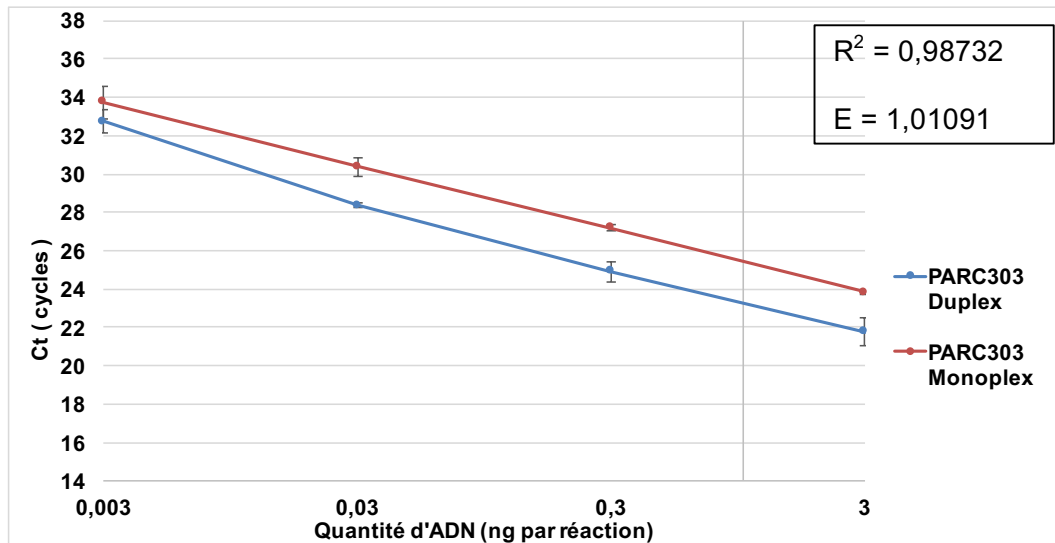


Figure 45 : Comparaison des courbes d'étalon générées suite à la réaction duplex et à la réaction monoplex en présence de la sonde EUT1 et de l'ADN de *E. lata* PARC303

4.6. Détermination de limite de détection

Puisqu'une seule souche de *P. viticola* a pu être obtenue dans le cadre de ce projet, la limite de détection de la sonde PHO1 a été déterminée en utilisant l'ADN de *P. viticola* UCD2408Tx seulement. Selon la figure 46, un minimum de 3×10^{-4} ng d'ADN de *P. viticola* était détectable, mais plus de 40 cycles de qPCR ont été nécessaires. D'un autre côté, le résultat de EUT1 variait d'une souche à l'autre. La figure 47 montre que la quantité minimale d'ADN détectée était 3×10^{-3} , 3×10^{-4} , et 3×10^{-5} ng pour *E. lata* PARC131, PARC303, et PARC276, respectivement.

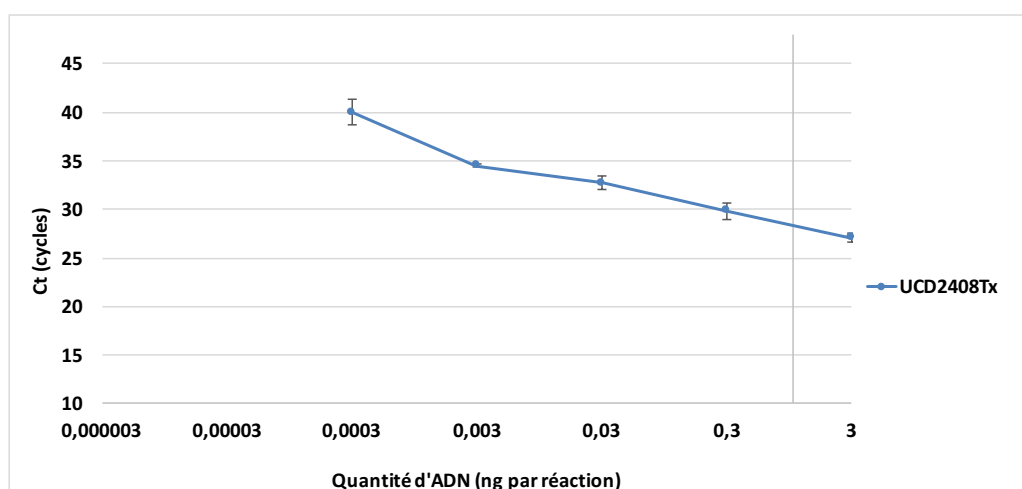


Figure 46 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN de la souche *P. viticola* UCD2408Tx, détectées par la sonde PHO1 dans la réaction duplex

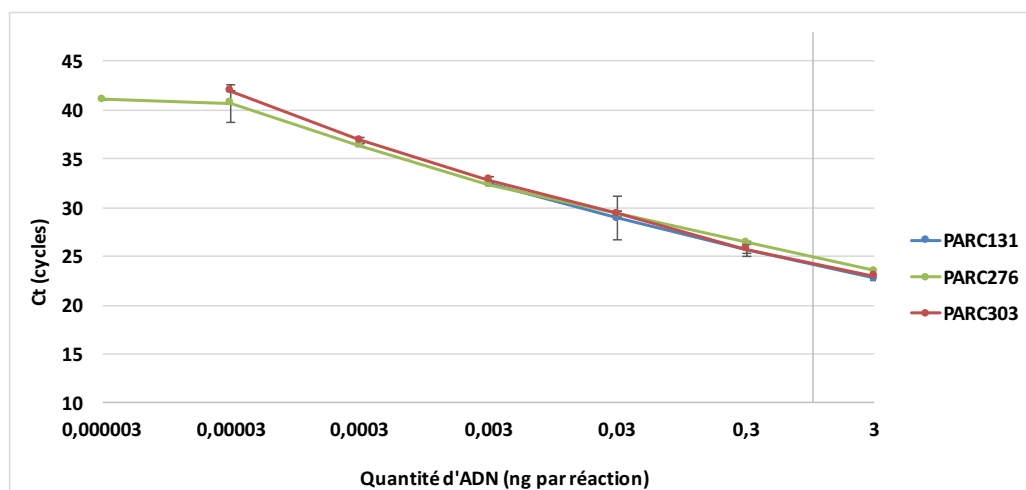


Figure 47 : Les valeurs de Ct en fonction de la quantité des dilutions d'ADN des trois souches *E. coli* PARC131, PARC276 et PARC303, détectées par la sonde EUT1 dans la réaction duplex

5. Résumé des quatre réactions multiplex développées

Les réactifs et le programme de qPCR utilisés et optimisés pour la détection des pathogènes responsables de l'esca, du pied noir, du BDA, de l'excoriose et l'eutypiose sont résumés aux tableaux 19 et 20.

Tableau 19 : Résumé des volumes de réactifs ajoutés, en μ l, dans chacun des mélanges réactionnels

Réactifs	1. esca	2. pied noir	3. BDA	4. excoriose/eutypiose
Master Mix (2X)	10	10	12,5	10
MgCl ₂ (concentration)	1,2 (25 mM)	1,2 (25 mM)	0,88 (50 mM)	1,6 (25 mM)
Amorce sens (10 μ M)	2	3	3,75	2
Amorce anti-sens (10 μ M)	2	3	3,75	2
Sonde 1 (concentration)	0,4 (10 μ M)	0,4 (10 μ M)	0,1 (DS1) (50 μ M)	0,4 (10 μ M)
Sonde 2 (concentration)	0,4 (10 μ M)	0,4 (10 μ M)	0,1 (BD1) (50 μ M)	0,4 (10 μ M)
Sonde 3 (concentration)	0	0,4 (10 μ M)	0,15 (NP2) (50 μ M)	0
Volume total	20	20	25	20

Le volume d'eau stérile a été omis puisqu'il dépend du volume d'ADN à ajouter.

Tableau 20 : Le temps et la température d'hybridation/élongation utilisés dans les quatre réactions multiplex développées

	1. esca	2. pied noir	3. <i>BDA</i>	4. excoriose/eutypiose
Temps (secondes)	30	20	30	30
Température (°C)	66	64	60	64
Nombre de cycles maximal recommandé*	38	38	40	40

Voir la section 6 du chapitre « Matériel et Méthodes » pour les autres étapes de qPCR.

*Défini dans le chapitre « Discussion ».

6. Validation avec les échantillons du terrain

La réaction triplex permettant de détecter la présence des champignons responsables du pied noir a été validée en utilisant les échantillons de racines des vignes atteintes du pied noir qui nous ont été fournies en 2016 par un vignoble situé à l'Île-d'Orléans. Le premier objectif de cette étape était de déterminer la meilleure trousse d'extraction d'ADN fongique qui sera recommandée aux futurs utilisateurs des méthodes développées dans ce projet. Le second objectif était de vérifier que la réaction triplex en question peut détecter la présence d'au moins une espèce fongique ciblée à partir de l'extrait d'ADN d'un échantillon réel.

Comme mentionné dans le chapitre « Matériel et Méthodes », un total de six trousse commerciales d'extraction d'ADN ont été testées. L'ADN a pu être extrait sans problème à partir de l'échantillon Baltica D23474 en utilisant cinq trousse. Malheureusement la migration sur gel 1% a montré qu'aucun ou très peu d'ADN a été extrait en utilisant la trousse E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini (Omega Biotek). Cinq aliquotes d'ADN ont alors été conservées à 4°C. Tel qu'illustré dans la figure 48, le résultat de la migration des aliquotes sur le gel d'agarose 1% suggère que la trousse FastDNA® SPIN for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals) et la trousse DNeasy PowerPlant Pro (Mo Bio) ont permis d'extraire le plus d'ADN.

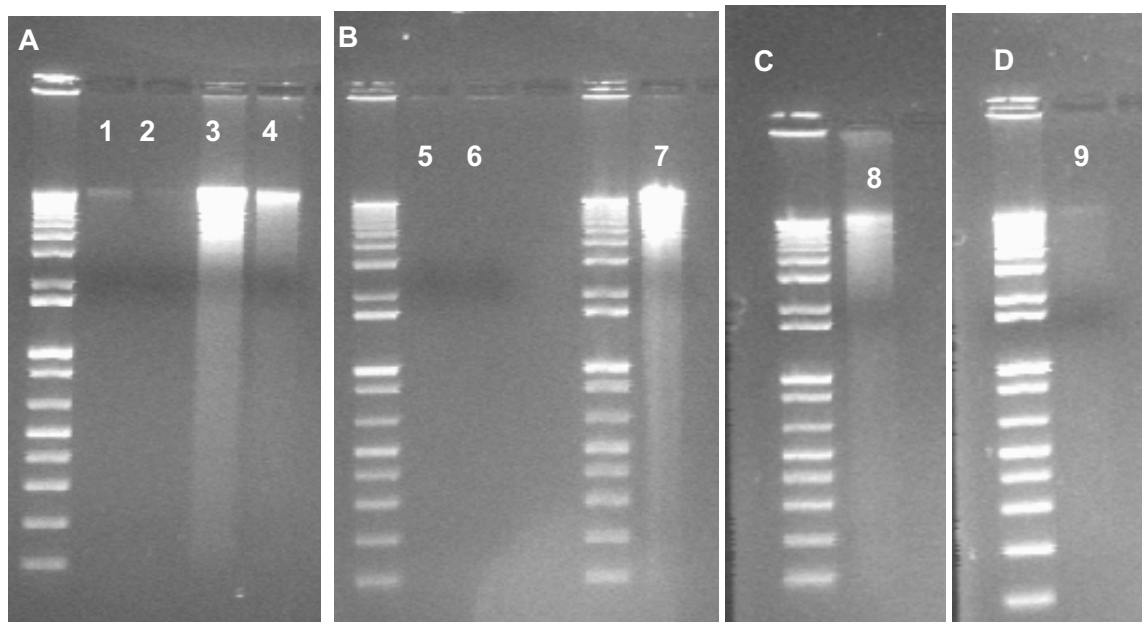


Figure 48 : L'ADN ayant été extrait des racines de vigne Baltica D23474 à l'aide des cinq trousse d'extraction

L'échelle utilisée dans tous les gels est 1kb plus DNA Ladder. L'ADN des puits 2, 4 et 6 est le résultat d'une seconde élution dans 30 µl d'eau stérile.

L'image A : trousse DNeasy PowerLyzer PowerSoil (1, 2) et FastDNA® SPIN for Soil (3, 4)

L'image B : trousse E.Z.N.A® Fungal DNA Mini (5, 6) et DNeasy PowerPlant Pro (7).

L'image C : trousse E.Z.N.A® Plant DNA Mini (8).

L'image D : trousse FavorPrep Soil DNA Isolation Mini (9).

La présence des champignons responsables du pied noir dans chacune des cinq aliquotes d'ADN extrait a été examinée à l'aide de la réaction triplex développée précédemment (section 4 du chapitre « Résultats »). Au moins une espèce fongique a pu être détectée dans toutes les aliquotes d'ADN.

Lorsque l'ADN extrait à l'aide de la trousse DNeasy PowerPlant Pro a été ajouté dans le mélange réactionnel, la présence des trois espèces a été confirmée selon la figure 49. En comparant les valeurs de Ct, auxquelles l'ADN de chacune des espèces a été détecté, avec les Ct de référence, il nous était possible d'estimer la quantité d'ADN des espèces cibles présentes dans l'échantillon de vigne Baltica D23474. Par exemple, la figure 49-MAC1 montre que 3 ng d'ADN de *I. macrodidyma* PARC345 a dépassé le seuil au 23-ème cycle, tandis que l'ADN extrait de la vigne s'est révélé positif au 30-ème cycle. Théoriquement, lorsque la quantité d'ADN cible diminue de dix fois, la valeur de Ct correspondante augmente de 3,3. La différence de Ct entre l'ADN extrait de Baltica D23474 et 3 ng d'ADN de *I. macrodidyma* PARC345 était environ 7 cycles. Ainsi, on peut estimer que la quantité d'ADN de *I. macrodidyma* présent dans cet échantillon était 3×10^{-2} ng. De façon similaire, selon la figure 35, on peut calculer que 3×10^{-1} ng et 3×10^{-3} ng d'ADN de *I. liriodendri* et *I. pauciseptatum* étaient détectable en utilisant la trousse DNeasy PowerPlant Pro, respectivement.

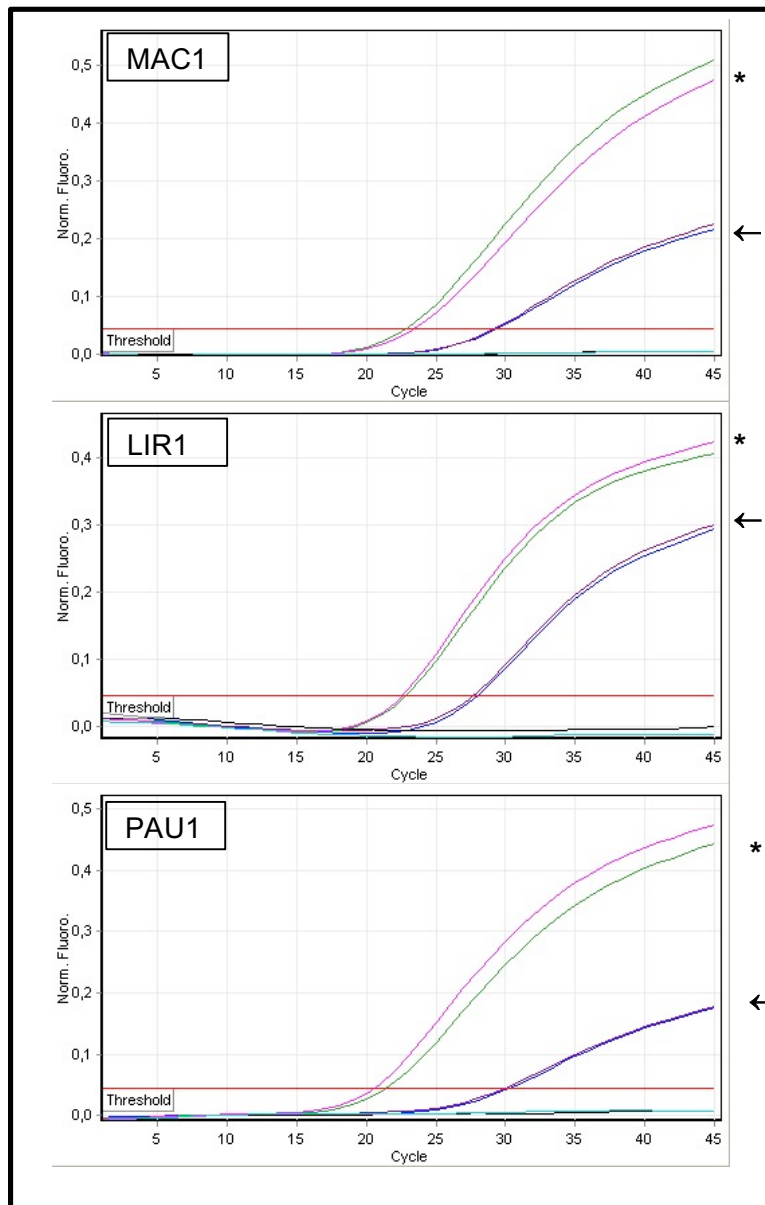


Figure 49 : Courbes d'amplification générées suite à la réaction triplex en ajoutant l'ADN extrait à partir du pied de la vigne Baltica D23474 à l'aide de la trousse DNeasy PowerPlant Pro

Les courbes d'amplification marquées d'une étoile (*) sont des témoins positifs : 3ng d'ADN de *I. macrodityma*, *I. liriodendri*, et *C. pauciseptatum* pour les sondes MAC1, LIR1 et PAU1, respectivement. Les courbes indiquées par une flèche sont l'ADN extrait à partir du pied de vigne Baltica D23474.

La réaction triplex a détecté la présence des trois espèces également dans l'ADN extrait à l'aide de la trousse E.Z.N.A® Plant DNA Mini, mais les valeurs de Ct associées étaient élevées, tel que résumé dans le tableau 21. D'un autre côté, on n'a malheureusement pu détecter que deux espèces seulement dans l'ADN extrait à l'aide des trousse FavorPrep Soil DNA Isolation Mini et FastDNA® SPIN for Soil. Quant à l'ADN extrait en utilisant la trousse DNeasy PowerLyzer PowerSoil, la présence de *I. liriodendri* seulement a été confirmée. Ces résultats sont montrés au tableau 21.

Tableau 21 : Valeurs de Ct associées à la détection des trois espèces dans les échantillons d'ADN extraits à l'aide des cinq trousse commerciales

Trousse d'extraction utilisée	Ct associée à la détection de <i>I. macrodidyma</i>	Ct associée à la détection de <i>I. liriodendri</i>	Ct associée à la détection de <i>C. pauciseptatum</i>
DNeasy PowerPlant Pro	29,30	27,80	30,18
E.Z.N.A® Plant DNA Mini	36,38	25,61	37,01
FastDNA® SPIN for Soil	27,78	27,92	ND
FavorPrep Soil DNA Isolation Mini	31,55	31,03	ND
DNeasy PowerLyzer PowerSoil	ND	31,86	ND

DISCUSSION

1. Développement du système duplex – esca

1.1. Conception des sondes TaqMan®

Les sondes PA1 et PA2 sont attachées au même fluorophore, sauf que leurs séquences ont été modifiées. Au contraire, les sondes PC1 et PC2 possèdent la même séquence nucléotidique, mais le fluorochrome lié est différent. Pendant l'étape de la conception de ces sondes, la région ITS1 a été ciblée parce que le séquençage de la région ITS chez *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* a permis de différencier clairement ces deux espèces, sans avoir eu besoin de séquencer d'autres gènes. Tandis que cette région ITS comprend deux régions, ITS1 et ITS2, cette dernière n'a pas été sélectionnée pour être utilisée dans la qPCR duplex puisque sa taille est plus élevée que la taille d'amplicon idéale pour une PCR en temps réel.

D'abord, la sonde PA2 a remplacé PA1, car la valeur de R^2 d'une réaction monoplexe avec la sonde PA1 et l'ADN de *P. aleophilum* PARC341 ne dépassait jamais 0,90, et il y avait un bruit de fond qui augmentait graduellement de niveau pendant la qPCR. Contrairement à PA1, PA2 ne montrait aucun bruit de fond, et le R^2 de toutes les courbes standard était supérieur à 0,98 dans une réaction duplex.

Les causes de cette différence de performance entre PA1 et PA2 peuvent être diverses. Par exemple, le contenu en guanine et en cytosine (GC) dans la séquence de PA2 est 70% alors que celui de PA1 est 50%. Théoriquement, le pourcentage de GC d'une séquence est proportionnel à sa thermostabilité et à sa T_m . Un haut contenu en GC de la sonde lui confère une T_m élevée, ce qui permet à la sonde de s'hybrider à l'ADN cible plus rapidement que les amorces, et donc d'augmenter l'efficacité d'amplification dans une PCR en temps réel. Or, la sonde PA1 contenait des nucléotides particuliers nommés LNA (*locked nucleic acid*, ou « acide nucléique bloqué » en français). Ce dernier est en fait un analogue synthétique d'acide nucléique dont la structure ressemble à celle de l'ARN, sauf qu'il existe une liaison entre 2'C et 4'C dans le ribose du monomère de LNA (Figure 50).

Cette conformation « bloquée » de LNA lui confère une meilleure affinité envers les monomères d'ADN, la thermostabilité et d'autres caractéristiques avantageuses. (You et al., 2006; Eichert et al., 2010; Astakhova, 2014) Ainsi, comme la séquence de PA1 contenait des monomères de LNA, elle devrait être théoriquement capable de s'attacher rapidement à sa cible même si son contenu en GC n'était que 50%. Mais finalement PA2, dont le contenu en GC était 70%, était plus efficace que PA1 pour détecter l'ADN de *P. aleophilum* PARC341.

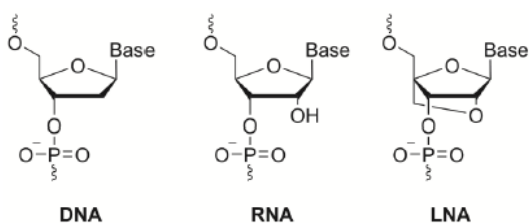


Figure 50 : Comparaison structurale des monomères d'ADN, d'ARN et de LNA

La comparaison des trois acides nucléiques montre que la structure de LNA est similaire à celle de l'ARN plutôt que de l'ADN. (Figure modifiée de (Astakhova, 2014))

Par la suite, la sonde PC1 a été remplacée par PC2 à cause de l'interférence de fluorescence. Le signal émis par le fluorochrome FAM, dont la longueur d'onde d'émission maximale est 520 nm, attaché à PC1 était détectable dans le canal jaune qui capte la fluorescence à 555 nm. En effet, HEX, qui est détecté par le canal jaune, émet sa fluorescence à 555 nm. (Corbett Life Science, 2006; Integrated DNA Technologies, s.d.) Au cours de mon projet, on a constaté que FAM émettait une fluorescence à la longueur d'onde de détection du canal jaune (555 nm) qui était utilisé pour HEX. En effet, la fluorescence de FAM est plus forte que la plupart des autres fluorochromes, et donc elle cause souvent un problème d'interférence. (Kuchta et al., 2007) On a donc remplacé FAM par Cy5, dont la longueur d'onde d'émission maximale est 668 nm. Sa fluorescence est captée par le canal rouge dont la longueur d'onde de détection est 660 nm. Le problème d'interférence de fluorescence a été ainsi résolu.

Une fois conçues, les séquences des sondes PC2 et PA2 ont été comparées avec les données dans les banques par BLAST. Celle de PC2 n'était présente que sur l'ADN de *P. chlamydospora*. Toutefois, celle de PA2 se retrouvait dans l'ADN des espèces appartenant au même genre, soit *Phaeoacremonium*. Il s'agit de *P. pseudopanacis* et *P. parasiticum*. Par contre, présentement il n'y a encore aucun cas d'infection de vignes par *P. pseudopanacis* dans le monde. Il a été révélé que *P. parasiticum* provoque la maladie de Pétri en Pérou (Romero-Rivas et al., 2009), mais cette observation n'a pas encore été rapportée au Canada.

1.2. Spécificité et sensibilité

Il n'y a eu aucune amplification non-spécifique par la sonde PA2 lorsque le seuil du canal jaune est à 0,030. Cependant, en fixant le niveau seuil du canal rouge à 0,080, la PC2 a détecté 3 ng d'ADN de *E. lata*, *D. seriata*, *B. dothidea*, *N. parvum*, et *I. macrodidyma* vers la fin de qPCR. Mais seulement un réplica sur trois de chacune de ces espèces non-ciblées s'est révélé positif, et donc ces amplifications aléatoires n'ont pas été considérées comme importantes. Par contre, les triplicas d'ADN de *P. aleophilum* ont été détectés par PC2 à partir de $40,33 \pm 1,78$ cycles. Il s'agit d'une amplification non-spécifique qui n'est pas aléatoire puisque tous les trois réplicas se sont révélés positifs. Mais heureusement *P. aleophilum* est la cible de PA2 et est l'un des deux pathogènes responsables de l'esca. Par conséquent, toute détection par la sonde PA2, qu'elle soit *P. chlamydospora* ou *P. aleophilum*, suggère que l'échantillon de vigne en question est (ou sera) affecté par la maladie de l'esca. Mais, par précaution, il est recommandé de ne considérer que les signaux qui se sont révélés positifs avant le 38^{ème} cycle de qPCR lorsque cette réaction duplex sera utilisée pour des tests diagnostiques de routine.

La sensibilité de la réaction duplex a été comparée à celle des deux réactions monoplex (une contenant PC2 et l'autre contenant PA2) en effectuant les trois réactions en parallèle et en comparant les valeurs de Ct auxquelles chacune des dilutions d'ADN cible a été détectée. Selon la figure 11, il n'y a pas de grande diminution dans la sensibilité de réaction duplex comparativement aux réactions monoplex, car les courbes se superposent. Ce résultat suggère que les dilutions d'ADN cible sont détectées approximativement aux mêmes moments par la sonde qui lui est spécifique, qu'elle soit seule ou multiplexée dans une réaction. La seule observation intrigante est que la sonde PC2 semble être légèrement plus sensible dans une réaction duplex qu'en condition monoplex. Habituellement cela devrait être le contraire, car une

compétition pour les mêmes réactifs a lieu dans une réaction duplex, ce qui retarde souvent la détection de cible. L'une des explications pour l'augmentation de sensibilité de PC2 en multiplex est que la dilution en série de l'ADN de *P. chlamydospora* PARC100 ajouté dans la réaction duplex a probablement été effectuée plus précisément que celui qui a été ajouté dans la réaction monoplex.

1.3. Limite de détection

La sonde PA2 a détecté, dans une réaction duplex, entre 3×10^{-3} ng et 3×10^{-5} ng d'ADN de *P. aleophilum*, en fonction des souches étudiées. Cette différence de sensibilité entre les souches a été observée dans les quatre réactions multiplex développées au cours de ce projet. Elle peut être due à plusieurs facteurs, tels que l'erreur technique (l'imprécision de la quantification et du pipetage, ainsi que la dégradation partielle de l'ADN pendant la procédure d'extraction). Aussi, elle peut être causée par la différence de séquence nucléotidique dans la région cible des souches, car parfois la taille exacte de la région cible variait d'une souche à l'autre à cause de la présence de quelques nucléotides additionnels. Donc, même si la séquence de la sonde est présente dans la région cible de toutes les souches, si la taille de cette région chez la souche A est plus grande que la souche B, il peut arriver que l'ADN de la souche A est plus difficile à amplifier que celui de la souche B.

Comme mentionné dans le paragraphe précédent sur la spécificité des sondes, le nombre maximal de cycles que les utilisateurs de cette réaction duplex sera 38. La valeur de Ct à laquelle PA2 détecte 3×10^{-4} ng d'ADN de la souche PARC369 est $38,42 \pm 0,93$, et elle dépasse le seuil supérieur du nombre de cycles. De plus, la quantité minimale d'ADN de la souche PARC341 est 3×10^{-3} ng. Ainsi, la limite de détection de PA2 est 3×10^{-3} ng d'ADN de *P. aleophilum* par réaction de 20 μ l. D'un autre côté, la sonde PC2 était capable de révéler la présence de *P. chlamydospora* lorsque 3×10^{-6} ng de son ADN était ajouté dans une réaction duplex. Mais, à cette concentration, l'ADN de *P. chlamydospora* PARC100 et celui de PARC326 ne se révèlent positifs qu'à partir de 40^{ème} cycle de qPCR. Ainsi, la limite de détection de PC2 est 3×10^{-5} ng d'ADN de *P. chlamydospora* par réaction de 20 μ l.

En 2012, Martin et al. ont publié leur travail qui constitue à détecter séparément la présence des deux espèces fongiques responsables de l'esca par la technologie TaqMan®. La limite de détection de cette méthode était 10^{-4} ng d'ADN de *P. chlamydospora* et 5×10^{-5} ng d'ADN de *P.*

aleophilum (Martin et al., 2012). Notre réaction est donc dix fois plus sensible pour révéler la présence de *P. chlamydospora*, mais leur méthode est plus robuste pour détecter l'ADN de *P. aleophilum* dans un échantillon environnemental. Mais notre méthode de qPCR duplex est moins laborieuse, car les deux réactions développées par Martin et al. peuvent être effectuées d'un seul coup lorsqu'on utilise notre réaction duplex. En 2013, Pouzoulet et al ont développé une qPCR duplex qui permettent de révéler la présence de ces deux champignons en utilisant la technologie Plexor™. Cette dernière consiste à mesurer la diminution de fluorescence contrairement à la technologie TaqMan®, car, à chaque fois que l'amorce sens fluorescent s'hybride à son ADN cible pour l'amplifier, sa fluorescence est inhibée par l'incorporation d'un nucléotide qui est lié par un *quencher*. Dans ce travail, le seuil de détection était $2,5 \times 10^{-4}$ ng d'ADN génomique pour les deux espèces. La méthode de Pouzoulet et al. est dix fois plus sensible que notre réaction duplex pour détecter l'ADN de *P. aleophilum*, mais notre méthode est plus sensible pour montrer la présence de *P. chlamydospora* dans une réaction (Pouzoulet et al., 2013; Navarro et al., 2015).

2. Développement du système triplex – pied noir

2.1. Identification des souches isolées

L'un des grands défis lors du développement de cette réaction triplex était la sélection des champignons cibles. En effet, comme mentionné dans l'introduction, il est connu depuis des décennies que les deux espèces principalement responsables du pied noir sont *I. liriodendri* et *I. macrodidyma* dans la majorité des pays. Ainsi, le développement de méthode permettant la détection de ces deux pathogènes seulement était probablement suffisante pour diagnostiquer le pied noir chez les vignes. Toutefois, le fait d'inclure une troisième espèce responsable peut augmenter les chances de détecter la maladie chez la vigne peu infectée. Pour cette raison, le développement d'une réaction triplex plutôt qu'une réaction duplex a été visé.

Or, de nombreuses publications montrent la présence de plusieurs espèces de champignons sur la vigne atteinte du pied noir, ainsi que leur implication dans le développement de cette maladie. Cependant, certains articles présentent seulement les champignons qu'ils ont isolés sans effectuer par la suite des tests de pathogénicité. De plus, très peu d'information est disponible sur les espèces qui sont prévalentes au Québec. La deuxième partie (la section «

pied noir ») du projet a donc débutée par la recherche et l'isolement des souches à partir des racines des vignes québécoises atteintes de la maladie. Comme montré dans le chapitre « Résultats », plusieurs souches ont été isolées dont la morphologie des colonies sur gélose était celle des genres *Cylindrocarpon* et *Ilyonectria*. La prochaine étape à effectuer était de révéler l'identité de ces souches. Tandis que l'affiliation des six souches de *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* qui ont été utilisées dans la section précédente du projet (section « esca ») ont été facilement confirmées en séquençant leur région ITS, cette méthode n'a pas fonctionné aussi bien chez les souches responsables du pied noir. Par exemple, le résultat de séquençage d'une des souches isolées suggérait qu'elle était soit *Nectria radicicola*, ou bien soit *Ilyonectria. robusta*. Ce problème peut être dû à l'une des deux raisons suivantes. Premièrement, les séquences d'ADN fongique dans la base de données de NCBI ne sont pas toujours attribuées aux bonnes espèces. Par exemple, même aujourd'hui, certaines séquences de *I. liriodendri* sont enregistrées sous le nom de *C. destructans* (José Ramon Urbez-Torres, communication personnelle, 2016). Deuxièmement, les espèces dont la séquence d'ADN génomique est très proche ne peuvent pas être distinguées en séquençant seulement un gène ou une région de leur ADN. À titre d'exemple, la comparaison des séquences de la région ITS et du gène codant pour la bêta-tubuline avec les données déposées sur Genbank a permis de prédire l'identité de l'une de nos souches, appelée IAF62, comme *I. macrodidyma* ou *I. torresensis*. Selon Cabral et al., ces derniers font partie du même complexe qui s'appelle « *I. macrodidyma complex* ». L'analyse de leurs séquences dans la région ITS ne permet pas de différencier ces deux espèces très proches, mais les séquences de leurs gènes de bêta-tubuline et de l'histone H3 peuvent être utiles pour les différencier (A. Cabral et al., 2012; Outram et al., 2014). Ainsi, dans mon projet, ces deux gènes ont été sélectionnés comme deux autres cibles de séquençage. Finalement, l'analyse des trois gènes a confirmé l'isolement d'un total de six espèces (revoir le tableau 11) à partir des racines de la vigne.

Parmi celles-ci, les souches de *C. pauciseptatum* ont pu être isolées abondamment. La recherche littéraire par la suite nous a permis de confirmer sa virulence envers la vigne et sa capacité de provoquer les symptômes du pied noir. De plus, certains articles affirment que les trois espèces les plus impliquées dans le développement des symptômes du pied noir sont *I. macrodidyma*, *I. liriodendri*, et *C. pauciseptatum* (A. Cabral et al., 2012). Toutes ces évidences montrent la raison pour laquelle *C. pauciseptatum* a été inclus dans la liste des cibles de la réaction triplex.

2.2. Conception des amorces et des sondes d'hybridation

Pour choisir la région cible qui sera amplifiée pendant la qPCR triplex, le choix évident se portait naturellement sur le gène de bêta-tubuline et le gène de l'histone H3. La région ITS n'a pas été considérée, car la comparaison de la région ITS de plusieurs souches de *I. macrodidyma*, de *I. liriodendri* et de *C. pauciseptatum* suggérait qu'elle ne contenait pas suffisamment de régions variables entre ces espèces. La même conclusion a été tirée en analysant une portion du gène de bêta-tubuline qui a été amplifiée avec les amorces Bt2a et Bt2b. Par conséquent, le gène de l'histone H3 a été sélectionné pour être la cible dans la qPCR multiplex. En effet, les séquences amplifiées par les amorces H3-1a et H3-1b chez les trois champignons ont été alignées avec Clustal Omega, et cette comparaison nous a montré la présence d'au moins trois régions variables entre les espèces. De plus, le gène de l'histone H3 est considéré comme étant plus fiable pour différencier les espèces proches du genre *Ilyonectria* que le gène de bêta-tubuline et le gène de facteur d'élongation 1- α (A. Cabral et al., 2012; Outram et al., 2014; Santos et al., 2014a). La conception des trois sondes s'est basée alors sur ces trois régions qui sont variables entre les espèces. Comme il a été fait pour les deux sondes permettant de diagnostiquer l'esca, les séquences des trois sondes dessinées dans la région du gène H3 ont été comparées avec les bases de données de NCBI pour s'assurer que les sondes ne détectent pas les champignons autres que leurs cibles. Selon les alignements effectués par BLAST, la séquence de LIR1 et celle de PAU1 n'étaient 100% identiques qu'aux séquences dans le gène de l'histone H3 chez *I. liriodendri* et *C. pauciseptatum*, respectivement. Concernant la sonde MAC1, sa séquence était présente dans le gène de l'histone H3 chez *I. torresensis* et *I. macrodidyma*. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il y a seulement 10 différences nucléotidiques sur 500 dans ce gène chez ces deux espèces (A. Cabral et al., 2012). Heureusement elles sont toutes les deux capables de provoquer le pied noir (A. Cabral et al., 2012), et elles ont été retrouvées sur les racines des vignes du Québec. Donc, même si MAC1 avait détecté l'ADN de *I. torresensis* au lieu de *I. macrodidyma* sur une vigne, ce résultat indiquerait que la plante est atteinte du pied noir.

Tandis que les paires d'amorces qui ont été utilisées dans les trois autres réactions multiplex sont universelles, il fallait dessiner une nouvelle paire d'amorces pour amplifier une partie du gène de l'histone H3 chez *I. macrodidyma*, *I. liriodendri*, et *C. pauciseptatum*. En effet, rappelons que, la taille de l'amplicon d'une PCR en temps-réel est considérée comme étant idéale lorsqu'elle est entre 50 pb et 150 pb (Applied Biosystems, 2005; Bio-Rad Laboratories, 2006; Qiagen, 2011). Toutefois, la portion amplifiée par les amorces H3-1a et H3-1b contient

approximativement 400 pb. Deux amorces, H3F_1 et H3R_2, ont donc été dessinées pour que la taille de l'amplicon soit environ 150 pb, et que celui-ci inclut les séquences des trois sondes qui ont été dessinées précédemment.

2.3. Spécificité et sensibilité

La réaction triplex permettant la détection de *I. macrodidyma*, de *I. liriodendri* et de *C. pauciseptatum* a été développée, et la reproductibilité de la bonne efficacité de chacune des sondes dans cette réaction a été vérifiée en effectuant la qPCR triplex deux fois. En ajustant le seuil à 0,045, il n'y a eu aucune amplification non-spécifique. Toutefois, la fluorescence orange émise par MAC1 lorsque celle-ci s'hybride sur l'ADN de *I. macrodidyma* a été détectable par le canal rouge. Cette détection a eu lieu au 39^{ème} cycle de qPCR, donc il nous est possible d'éliminer de tels faux-positifs en limitant le nombre de cycles de qPCR. Les futurs utilisateurs de cette réaction triplex seront alors recommandés de ne considérer que les signaux détectés avant le 38^{ème} cycle.

De plus, la sensibilité de la réaction duplex a été comparée à celle des trois réactions monoplex (contenant chacune MAC1, LIR1 et PAU1 séparément) en effectuant les quatre réactions en parallèle et en comparant les valeurs de Ct auxquelles chacune des dilutions d'ADN cible a été détectée. On constate d'abord que les valeurs d'efficacité de toutes les trois sondes sont situées autour de 1, et que les Ct augmentent de 3,3 cycles entre chaque dilution. Ces résultats prouvent que la région cible est doublée à chaque cycle de qPCR et que chacun de ces amplicons est lié par une sonde. Mais, contrairement aux résultats obtenus avec les sondes PC2 et PA2, les sondes spécifiques aux champignons du pied noir sont légèrement plus sensibles dans la réaction monoplex qu'en condition triplex. Particulièrement, dans la réaction triplex, l'ADN de *I. macrodidyma* et celui de *C. pauciseptatum* ont été détectés environ 1,8, et 1,6 cycles plus tard qu'en condition monoplexe, respectivement. Ce retard était prévisible parce que, comme expliqué précédemment, la compétition pour les mêmes réactifs dans une réaction multiplex peut décaler les Ct. Heureusement ces différences ne sont pas énormes (soit inférieures à 2 cycles) et que la limite de détection de toutes les trois sondes, qui sera discutée dans la prochaine page, est suffisamment basse.

2.4. Limite de détection

Avec la sonde MAC1, la plus petite quantité d'ADN détectable était 3×10^{-5} ng par réaction de 20 μ L. Cependant, la détection de 3×10^{-5} ng d'ADN n'était pas constante pour tous les échantillons de triplicata, car seulement un réplica sur trois a pu être détecté par la sonde. Ainsi, la limite de détection de la sonde MAC1 a été 3×10^{-4} ng d'ADN par réaction. Pour les deux sondes spécifiques à l'ADN de *I. liriodendri* et à l'ADN de *C. pauciseptatum*, puisque la plus petite quantité d'ADN détecté qui est commune pour toutes les souches testées était 3×10^{-4} ng pour les deux espèces, la limite de détection de LIR1 et de PAU1 a été 3×10^{-4} ng d'ADN par réaction de 20 μ L. Or, il faut porter une attention particulière à la sonde PAU1, car 3×10^{-4} ng d'ADN de la souche *C. pauciseptatum* IAF46 n'a pu être détecté avant 38 cycles. Comme cette détection a eu lieu après 40 cycles, il vaut mieux que les futurs utilisateurs de la réaction triplex concentrent leurs échantillons d'ADN pour maximiser la chance d'y détecter l'ADN de *C. pauciseptatum*.

En 2009, un travail sur la détection simultanée de ces trois espèces fongiques du pied noir de la vigne a déjà été publié par Alaniz et al. Ces auteurs ont rapporté une méthode de PCR conventionnelle triplex où trois paires d'amorces permettent d'indiquer la présence des trois champignons dans un échantillon environnemental. Le seuil de détection était 10^{-4} ng, 10^{-2} ng et 10^{-1} ng d'ADN de *I. macrodityma*, *I. liriodendri*, et *C. pauciseptatum*, respectivement. (Alaniz et al. 2009). Tandis que l'outil développé par Alaniz et al. est plus sensible pour détecter l'ADN de *I. macrodityma*, notre réaction triplex est plus appropriée pour indiquer la présence des deux autres espèces fongiques. La haute sensibilité de leur réaction contre *I. macrodityma* est surprenante, car la qPCR est considérée comme étant généralement plus sensible que la PCR conventionnelle à cause de, par exemple, la petite taille de l'amplicon utilisé lors de qPCR (Paiva-Cavalcanti et al., 2010). Mais évidemment ces techniques dépendent de plusieurs facteurs, tels que le type d'ADN polymérase, la concentration de $MgCl_2$, et la séquence nucléotidique de la région cible, ce qui peut probablement expliquer la haute sensibilité de PCR développée par Alaniz et al.

D'un autre côté, Tewoldemedhin et al. ont développé une méthode basée sur le SYBR Green I qui permet la détection simultanées des quatre champignons pathogènes qu'ils ont trouvés sur les racines du pommier en Afrique du Sud. Ces espèces incluent *I. macrodidyma*, *I. liriodendri* et *C. pauciseptatum*. Toutefois, comme cette méthode utilise une seule paire d'amorces qui amplifient spécifiquement l'ADN des quatre champignons, elle ne permet pas la différenciation entre les espèces qui sont présentes dans un échantillon environnemental. (Tewoldemedhin et al., 2010)

3. Développement du système triplex – *black dead arm*

3.1. Conception des sondes d'hybridation

Les trois espèces qui sont ciblées dans cette troisième partie du projet sont *B. dothidea*, *D. seriata*, et *N. parvum*, qui appartiennent tous à des genres différents, mais à la même famille *Botryosphaeriaceae*. Comparativement aux trois espèces responsables du pied noir, les trois champignons associés au BDA sont faciles à identifier. Le séquençage de la région ITS est suffisante pour bien les distinguer. Par conséquent, les séquences de la région ITS des souches de ces trois espèces ont été alignées pour y trouver trois séquences candidates de sondes TaqMan®. Cet alignement a montré que la région ITS2 contenait plus de régions variables entre les espèces que la région ITS1. De plus, les régions variables retrouvées dans la région ITS1 étaient riches en guanine et en cytosine que leur Tm était plus élevée que ce qui est recommandé normalement dans la littérature. Ainsi, la région ITS2 a été choisie comme la région cible à amplifier dans la qPCR triplex. Trois sondes TaqMan® ont été ensuite dessinées en se basant sur les séquences variables qui s'y sont trouvées.

Les séquences des trois sondes ainsi dessinées ont été comparées avec les banques de données par BLAST pour s'assurer qu'elles sont absentes dans l'ADN d'autres microorganismes. Celles de BD1 et NP2 n'étaient présentes que sur l'ADN de *B. dothidea* et de *N. parvum*, respectivement. Cependant, la séquence de la sonde DS1 se retrouvait dans l'ADN de *Lasiodiplodia theobromae*. Ce dernier fait partie de la famille *Botryosphaeriaceae* (Crous et al., 2006) et cause des lésions sur la vigne (van Niekerk et al., 2004; Luque et al., 2009). Mais sa présence n'est vérifiée que dans des régions tropicales ou sous-tropicales, et donc il y a peu de chance qu'on rencontre *L. theobromae* sur la vigne au Québec (Mohali et al., 2005). Par

conséquent, la probabilité que DS1 détecte *L. theobromae* dans des échantillons environnementaux envoyés au laboratoire de diagnostic en phytoprotection au MAPAQ devrait être faible.

3.2. Spécificité et sensibilité

Il n'y a eu aucune amplification non-spécifique par les sondes BD1 et DS1 qui sont spécifiques à l'ADN de *B. dothidea* et de *D. seriata*, respectivement. Mais le test de spécificité a révélé que la sonde NP2 détecte 3 ng d'ADN de *D. seriata* après 43 cycles de qPCR lorsqu'on ajuste le seuil à 0,080. Cette détection peut être ignorée parce que, lorsqu'on travaille avec la technologie TaqMan®, le nombre maximal de cycles accepté dans des publications ne dépasse normalement pas 40, ce qui signifie qu'un signal obtenu au 43^{ème} cycle est considéré comme un faux-positif (Koek et al., 2006; Bennett et al., 2015; Reich et al., 2016). Les trois sondes, BD1, DS1 et NP2 sont donc spécifiques à leurs espèces cibles. Et les futurs utilisateurs de cette réaction triplex sont conseillés de réaliser la qPCR triplex dont le nombre maximal de cycles est 40.

Concernant la sensibilité, il a été montré qu'il y a un large décalage des valeurs de Ct lorsqu'on utilise BD1 et NP2 dans une réaction triplex, comparativement à la condition monoplex. En moyenne, l'ADN de *B. dothidea* et celui de *N. parvum* ont été détectés environ 4,8, et 6,7 cycles plus tard qu'en condition monoplexe, respectivement. On peut émettre l'hypothèse qu'il y a peut-être une faible quantité de DS1 qui s'hybride sur l'ADN de *N. parvum* et aussi de *B. dothidea*, ce qui diminue la quantité d'ADN de ces deux espèces disponibles pour NP2 et BD1. De plus, il faut se rappeler que la taille de l'amplicon est environ 350 pb. Cela est considéré comme une taille acceptable, mais elle est assez élevée pour être la cible d'une qPCR. Si l'ADN de *B. dothidea* et celui de *N. parvum* sont dégradés en petits fragments au début de la réaction, il y aura moins de cibles disponibles pour BD1 et NP2, ce qui peut expliquer cette diminution de sensibilité. La conception de nouvelles amorces qui produisent un amplicon dont la taille est inférieure à 200 pb pourrait résoudre ce problème, mais une telle région risque de ne pas contenir suffisamment de variations interspécifiques pour différencier les trois espèces responsables du BDA.

3.3. Limite de détection

L'ADN de *D. seriata* PARC84 était détectable jusqu'à 3×10^{-4} ng par réaction, tandis que 3×10^{-5} ng d'ADN des deux autres souches de cette espèce a pu être révélé. L'expérience a été répétée en choisissant deux aliquotes d'ADN de la souche *D. seriata* PARC84 qui ont été extraits lors de deux jours différents ; cependant, le résultat dans les deux essais est resté identique. La limite de détection de la sonde DS1 en condition triplex est donc 3×10^{-4} ng d'ADN de *D. seriata* par réaction de 25 μ l. Quant aux sondes BD1 et NP2, elles étaient capables de révéler la présence de 3×10^{-4} ng d'ADN de *B. dothidea* et de *N. parvum*, respectivement. Toutefois, la détection des souches *B. dothidea* PARC32 et PARC201, ainsi que celle des deux souches de *N. parvum*, ont eu lieu après 40 cycles. Comme mentionné précédemment, on ne considère pas une telle amplification observée vers la fin d'une qPCR. De plus, normalement le Ct augmente de 3,3 cycles entre chaque courbe d'amplification lorsqu'on effectue une PCR sur une série de dilution. Par contre, on constate qu'il y a une différence de 7,7 cycles et 10,0 cycles entre les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} d'ADN de *B. dothidea* et *N. parvum*, respectivement. Ces valeurs indiquent que les sondes prennent beaucoup plus de temps que prévu pour détecter 3×10^{-4} ng d'ADN de ces espèces. Ces deux évidences suggèrent que la limite de détection effective des sondes BD1 et NP2 est 3×10^{-3} ng d'ADN cible par réaction de 25 μ L.

À notre connaissance, il n'y a encore aucun outil qui a été développé pour détecter simultanément les trois espèces fongiques responsables de BDA. Mais des méthodes qui permettent la détection individuelle de ces champignons par PCR ont récemment été publiées par certaines équipes (Spagnolo et al., 2010; Ridgway et al., 2011; Ni et al., 2012; Martin et al., 2014). Parmi celles-ci, la détection par PCR nichée semble être majoritaire. Spagnolo et al. (2010) ont développé deux PCR monoplexes. La première réaction contient une paire d'amorces qui sont spécifiques au complexe d'espèces *Neofusicoccum ribis* et *N. parvum*, et la deuxième réaction utilise une autre paire d'amorces qui permet de détecter dix-sept espèces de la famille *Botryosphaeriaceae* incluant *B. dothidea* et *D. seriata*. Mais la différenciation entre espèces n'est pas possible avec ces PCR. Or, Ni et al. ont réussi à optimiser une PCR nichée multiplex qui détecte simultanément la présence de *N. parvum* et celle des trois autres espèces de la même famille. La limite de détection de cet outil et celle de notre réaction triplex étaient la même, soit 10^{-3} ng par réaction (Ni et al., 2012). En tenant compte de la charge de travail, notre

qPCR triplex serait meilleure que les méthodes de Spagnolo et al. (2010) et Nie et al. (2012) comme outil de diagnostic.

4. Développement du système duplex – excoriose et eutypiose

4.1. Identification des souches et conception des sondes

Le séquençage de la région ITS est généralement suffisant pour identifier les souches de *P. viticola*, mais la fiabilité du résultat peut être renforcée en ciblant une autre région, comme le gène de facteur d'élongation 1- α (Baumgartner et al., 2013; Udayanga et al., 2014). Avant la réception de la souche *P. viticola* UCD2408Tx, plusieurs souches qui ont été préalablement identifiées comme *P. viticola* nous ont été envoyées. Toutefois, aucune d'entre elles n'étaient réellement l'espèce voulue. Aujourd'hui, plusieurs banques de collection fongique et laboratoires se fient encore aux résultats d'observation de morphologie macroscopique et microscopique pour identifier leurs champignons. Ce n'est pas rare qu'on commande un champignon et que l'espèce arrivée n'est pas ce qu'on espérait. Donc, pour s'assurer de l'affiliation, le gène de facteur d'élongation 1- α a été séquencé en plus de la région ITS pour confirmer l'identité de *P. viticola* UCD2408Tx.

La région ITS1 est la région cible amplifiée par qPCR duplex. En effet, les séquences permettant de distinguer *P. viticola* et *E. lata* sont présentes dans les régions ITS1 et ITS2. La région ITS1 a finalement été choisie, car cette dernière est plus courte que la région ITS2, et un amplicon court permet d'augmenter l'efficacité d'une PCR en temps réel (Debode et al., 2017). Une fois dessinées, les séquences des deux sondes PHO1 et EUT1 ont été comparées aux séquences d'autres microorganismes présentes dans les bases de données publiques par BLAST. Aucune des deux séquences n'était présente dans l'ADN des microorganismes non-ciblés.

4.2. Spécificité et sensibilité

Le niveau seuil du canal jaune qui mesure la fluorescence émise par le fluorochrome HEX a été ajusté à 0,024, et celui du canal rouge, qui capte le signal émis par Cy5, à 0,030. Ces valeurs de seuil permettent que toutes les amplifications non-spécifiques ainsi que les témoins négatifs

ne soient pas détectés. Il n'y a eu aucune amplification non-spécifique par PHO1 et EUT1 même après 45 cycles de qPCR. Les futurs utilisateurs pourraient considérer comme positif les signaux fluorescents détectés jusqu'au 40^{ème} cycle.

La diminution de sensibilité n'a pas été observée chez les deux sondes dans la réaction duplex comparativement aux réactions monoplex. La sensibilité de PHO1 est similaire dans les deux réactions. Quant à EUT1, elle semble être plus sensible en condition duplex qu'en monoplex. Ce résultat peut être dû à la quantité insuffisante d'ADN ajoutée dans les réactions monoplex. Sinon, la présence de 2 mM de MgCl₂ est peut-être optimale pour effectuer la réaction duplex efficace, mais pas pour une réaction monoplex.

4.3. Limite de détection

Le test de limite de détection a été répété jusqu'à ce que toutes les souches étudiées de l'espèce en question soient examinées. Puisqu'on n'a pu obtenir qu'une seule souche de *P. viticola*, il se peut que la limite de détection de la PHO1 ne soit pas aussi fiable que celle des autres sondes. Cette sonde peut détecter 3×10^{-4} ng d'ADN de *P. viticola* dans une réaction duplex. La valeur de Ct qui y est associée est $40,01 \pm 1,31$. Pour être strict, la limite de détection de la sonde PHO1 est 3×10^{-3} ng d'ADN par réaction de 20 µl. Mais une quantité plus faible d'ADN de *P. viticola* pourrait être détectée dépendamment des souches. Aujourd'hui, des trousses pouvant détecter la présence de *P. viticola* dans un échantillon environnemental sont vendus par certaines compagnies. Par exemple, Bio-Synthesis et Norgen Biotek fournissent chacun une trousse qui indique la présence ou l'absence de ce champignon à l'aide d'une amplification par PCR conventionnelle où les amorces spécifiques se lient à l'ADN de *P. viticola* (Bio-Synthesis, s.d.; Norgen Biotek, s.d.-a). Norgen vend aussi une trousse qui repère l'ADN de cette espèce fongique par la technologie TaqMan®. Malheureusement, la limite de détection de cette réaction n'a pas été discutée dans le manuel d'instruction. Mais cette trousse ne permet pas une détection simultanée de deux espèces (Norgen Biotek, s.d.-b), ce qui est possible lorsqu'on utilise la réaction multiplex développé dans le présent projet.

E. lata PARC276 et PARC303 ont été détectées par EUT1, lorsque leur quantité était 3×10^{-5} ng dans une réaction duplex, vers 41^{ème} et 42^{ème} cycle, respectivement. Par contre, la plus faible quantité d'ADN de *E. lata* PARC131 détectable par EUT1 était 3×10^{-3} ng. Cette variation peut être due à la dégradation d'ADN de PARC131, ou sinon à la différence dans la séquence nucléotidique du génome chez *E. lata* PARC131 et les deux autres souches. Pour faire la

balance entre les résultats obtenus en utilisant les trois souches, la limite de détection de la sonde EUT1 a été fixée à 3×10^{-4} ng d'ADN par réaction de 20 μ l. Il y a certaines publications qui ont développé des méthodes de détection de ce champignon. Puisque ce dernier sécrète des métabolites secondaires pour provoquer des lésions dans les parties herbacées de la vigne, Octave et al. ont développé un test de détection des protéines produites par le champignon à l'aide de la technique de *dot blot* (Octave et al., 2009). Mais la méthode de *dot blot* nécessite plusieurs étapes (l'incubation avec des anticorps, le séchage et le lavage, par exemple) en plus de plusieurs solutions à préparer. D'autres études ont travaillé sur la détection de *E. lata* par PCR. Notamment la PCR conventionnelle, la PCR-RFLP et la PCR nichée multiplex étaient chacune capable de révéler la présence de cette espèce fongique (Lecomte et al., 2000; Rolshausen et al., 2004; Catal et al., 2007). La limite de détection n'a été discutée que par Catal et al., et leur méthode par PCR nichée duplex était capable d'indiquer 3×10^{-7} ng d'ADN de *E. lata* par réaction de 25 μ l (Catal et al., 2007). Cet outil est donc 10^3 fois plus sensible que notre méthode de qPCR duplex. Toutefois, il nécessite beaucoup plus de temps que la méthode par qPCR multiplex, car il inclut deux PCR suivies par la migration des amplicons sur un gel d'agarose, ce qui n'est pas appropriée pour les procédures diagnostiques de routine. En plus, la méthode de Catal et al. n'est pas capable de détecter *P. viticola* en même temps que *E. lata*.

5. Validation avec les échantillons du terrain

La troisième réaction multiplex développée, permettant de détecter la présence des trois champignons responsables du pied noir, a été validée avec l'ADN ayant été extrait à partir du pied de vigne du cépage Baltica 24072 à l'aide d'une trousse commerciale. MAC1, LIR1 et PAU1 ont détecté leurs espèces cibles après environ 32, 27 et 30 cycles, respectivement. On peut supposer que la réaction contenait approximativement 10^{-2} ng de *I. macrodidyma*, 3×10^{-1} ng de *I. liriodendri*, et 10^{-3} ng de *C. pauciseptatum*. Ce résultat confirme la conclusion tirée par le laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ, qui a annoncé que cet échantillon de vigne est atteint du pied noir, après avoir effectué des tests d'isolement des souches du genre *Cylindrocarpon* sur cet échantillon de vigne.

De plus, une réaction triplex en ajoutant ce même ADN dans un mélange réactionnel contenant les sondes BD1, DS1 et NP2 a été effectuée pour s'assurer que ce qui a été détecté ne réagit pas avec n'importe quelle sonde. Ces trois sondes sont spécifiques aux champignons qui provoquent le *black dead arm*, qui est caractérisé par le développement des symptômes foliaires.

La probabilité qu'on retrouve ces espèces fongiques dans le pied d'une vigne est faible, et donc il devrait y avoir aucune émission de fluorescence pendant cette réaction triplex. Comme prévu, l'ADN extrait à partir des racines de Baltica 24072 ne s'est pas révélé positif, mais l'ADN de *B. dothidea*, celui de *D. seriata*, et celui de *N. parvum*, qui étaient des témoins positifs du test, ont réagi avec leurs sondes correspondantes.

Finalement, une dernière qPCR dans laquelle on a ajouté MAC1, LIR1 et PAU1, ainsi que l'ADN extrait du bois d'une vigne qui ne manifeste pas de symptômes du pied noir, a été effectuée pour démontrer que les trois sondes réagissent à leurs cibles fongiques, mais pas à l'ADN de vigne ou à d'autre champignons indigènes. Aucun signal positif n'a été observée suite à cette réaction, ce qui signifie que les trois sondes examinées ne s'hybrident pas sur l'ADN de la plante et présentent un excellent potentiel pour le diagnostic de maladies. En résumé, les trois tests de qPCR effectuées dans ce volet du projet ont permis de valider la capacité de la réaction triplex qui emploie MAC1, LIR1 et PAU1 à détecter la présence de *I. macrodityma*, *I. liriodendri*, et *C. pauciseptatum*, dans un échantillon environnemental.

CONCLUSION

En conclusion, un total de quatre réactions multiplex ont été développées et optimisées au cours de ce projet. Bien que la spécificité de chacune des dix sondes *in silico* devrait être démontrée en utilisant des bases de données de référence plus fiable, il a été vérifié expérimentalement qu'elles étaient toutes spécifiques à leurs espèces ciblées. La première réaction duplex permet de détecter la présence des champignons provoquant les premiers symptômes de l'esca. Une détection d'au moins 3×10^{-3} ng d'ADN de *P. aleophilum* et 3×10^{-5} ng d'ADN de *P. chlamydospora* était possible. La seconde réaction développée peut révéler la présence de 3×10^{-4} ng *I. macrodzyma*, *I. liriodendri* et *C. pauciseptatum*, et elle a été validée avec l'ADN extrait à partir du pied d'une vigne atteinte du pied noir. Effectivement, pour démontrer la spécificité de ces trois sondes, on aurait pu vérifier par une autre méthode si cette vigne était vraiment infectée par ces trois espèces fongiques, en effectuant un séquençage de cet ADN extrait, par exemple. La troisième réaction multiplex permet de dépister 3×10^{-4} ng d'ADN de *D. seriata*, ainsi que 3×10^{-3} ng d'ADN de *B. dothidea* et de *N. parvum*, responsable du *black dead arm*. Il a été démontré expérimentalement que ces sondes ne s'hybrident pas sur l'ADN extrait de vignes saines. Finalement, la réaction duplex contenant PHO1 et EUT1 est capable de détecter jusqu'à 3×10^{-3} ng de *P. viticola* et 3×10^{-4} ng de *E. lata*, deux champignons associés à l'excoriose et à l'eutypiose, respectivement.

Une fois que les quatre réactions seront validées avec les échantillons de vignes, idéalement provenant des vignobles québécois, les protocoles seront prêts à être utilisés par le laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ, qui pourra les utiliser comme outil de diagnostic de routine. En effet, les vignerons et les agronomes qui s'inquiètent de l'infection de leurs vignes par l'un des champignons étudiés dans ce projet pourront fournir les échantillons au laboratoire. Ce dernier effectuerait ensuite la réaction appropriée avec l'ADN extrait du matériel. Si le test exécuté se révèle positif, des mesures pourront être prises rapidement. L'emploi généralisé de cette procédure de diagnostic pourrait donc protéger et maintenir la santé globale des vignobles au Québec.

BIBLIOGRAPHIE

- E. Abreo, S. Martinez, L. Bettucci et S. Lupo (2010) A morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Aust. Plant Pathol.* 39: 446-452.
- ADVQ (Août 2007) Mémoire de l'Association pour le Développement de la Vini-Viticulture au Québec. in, Édité (Association pour le Développement de la Vini-Viticulture au Québec,), p.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (2006) Profil de la culture de la vigne au Canada - Août 2006. in, Édité (Programme de réduction des risques liés aux pesticides, AAC.), p.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (2013) Crop Profile for Grape in Canada. in, Édité Pest Management Centre), p.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (2016) Canada's Wine Industry.), <http://www.agr.gc.ca/eng/industry-markets-and-trade/statistics-and-market-information/by-product-sector/processed-food-and-beverages-sector/profiles-of-processed-food-and-beverages-industries/canada-s-wine-industry/?id=1449859691976> (Consulté le Mai)
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (Octobre 2016) Analyse sectorielle - Le marché du vin en Chine. in, Édité), p.
- C. Agusti-Brisach, D. Gramaje, M. Leon, J. García-Jiménez et J. Armengol (2011) Evaluation of Vineyard Weeds as Potential Hosts of Black-Foot and Petri Disease Pathogens. *Plant Dis.* 95: 803-810.
- S. Alaniz, J. Armengol, J. García-Jiménez, P. Abad-Campos et L. Maela (2009) A Multiplex PCR System for the Specific Detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from Grapevine. *Plant Dis.* 93: 821-825.
- S. Alaniz, M. Léon, A. Vicent, J. García-Jiménez, P. Abad-Campos et J. Armengol (2007) Characterization of *Cylindrocarpon* Species Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Spain. *Plant Dis.* 91: 1187-1193.
- G. Alleweldt, P. Spiegel-Roy et B. I. Reisch (1991) Grapes (*Vitis*). Genetic resources of temperate fruit and nut crops, J. N. Moore et J. R. Ballington (Édit.) *Acta Hort.*, Ed Vol 290. p 291-337.
- B. E. Amborabe, P. Fleurat-Lessard, J. Bonmort, J.-P. Roustan et G. Roblin (2001) Effects of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, on plant cell plasma membrane: Possible subsequent implication in disease development. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 51-58.
- Applied Biosystems (2005) Real-Time PCR systems. Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems.), http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041440.pdf (Consulté le Mai)
- G. Armijo, R. Schlechter, M. Agurto, D. Munoz, C. Nunez et P. Arce-Johnson (2016) Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. *Frontiers in plant science* 7: 382.
- Association des vignerons du Québec (2016) Vins du Québec - Encépagement des membres de l'Association des vignerons du Québec - Édition 2016.), <http://vinsduquebec.com/wp-content/uploads/2017/03/Statistiques-cépages-2016-2017-03-14.pdf> (Consulté le Mai)
- K. Astakhova (2014) Toward Non-Enzymatic Ultrasensitive Identification of Single Nucleotide Polymorphisms by Optical Methods. *Chemosensors* 2: 193-206.
- S. D. Atkins et I. M. Clark (2004) Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.* 45: 3-15.
- J. Auger, M. Esterio, G. Ricke et I. Terez (2004) Black Dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Dis.* 88: 1286.

- K. Baumgartner, P. T. Fujiyoshi, R. Travaon, L. A. Castlebury, F. W. Wilcox et P. E. Rolshausen (2013) Characterization of species of *Diaporthe* from wood cankers of grape in eastern North American vineyards. *Plant Dis.* 97: 912-920.
- H. Becker (1985) White grape varieties for cool climate. in *International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology.*, Édité B. A. Heatherbell, P. B. Lombard et F. W. Bodyfelt (OSU Agric. Exp. Stn. Tech. Publ. , Oregon State Univ.), p 46-62.
- E. Bellemain, T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet et H. Kauserud (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 10: 189-197.
- A. Bennett, N. Bar-Zeev, K. C. Jere, J. E. Tate, U. D. Parashar, O. Nakagomi, R. S. Heyderman, N. French, M. Iturriza-Gomara et N. A. Cunliffe (2015) Determination of a Viral Load Threshold To Distinguish Symptomatic versus Asymptomatic Rotavirus Infection in a High-Disease-Burden African Population. *Journal of clinical microbiology* 53: 1951-1954.
- L. Bernal-Martinez, M. J. Buitrago, M. V. Castelli, L. Rodriguez-Tudela et M. Cuenca-Estrella (2013) Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant *Mucormycetes* species. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19: E1-7.
- F. Berrysmith (1962) "Dead arm" disease of grapevines. *New Zeal J Agr.* 105: 309-313.
- C. Bertsch, M. Ramirez-Suero, M. Magnin-Robert, P. Larignon, J. Chong, E. Abou-Mansour, A. Spagnolo, C. Clément et F. Fontaine (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol.* 62: 243-265.
- Bio-Rad Laboratories (2006) Real-Time PCR applications guide.), <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf> (Consulté le Mai)
- Bio-Synthesis (s.d.) *Phomopsis viticola* PCR Detection Kit.), <http://www.biosyn.com/sample-preparation-kit/product/phomopsis-viticola-pcr-detection-kit.aspx> (Consulté le Mai)
- L. F. Bisson, A. L. Waterhouse, S. E. Ebeler, M. A. Walker et J. T. Lapsley (2002) The present and future of the international wine industry. *Nature* 418: 696-699.
- BMO Capital Markets Economic Research (2012) Special Report - The Canadian Wine Industry: Shiraz Grown. in, Édité (BMO Financial Group.), p.
- J. Branas (1967) Sur l'excoriose, sa cause et ses traitements. *Progrès Agricole et Viticole*, 84:295-309.
- E. Bruez, J. Vallance, J. Gerbore, P. Lecomte, J. P. Da Costa, L. Guerin-Dubrana et P. Rey (2014) Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PloS one* 9: e95928.
- Y. Bugaret (1987) Comment lutter efficacement contre l'excoriose de la vigne. *Le Progrès agricole et viticole*, 104:121-126.
- S. A. Bustin (2000) Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25: 169-193.
- A. Cabral, J. Z. Groenewald, C. Rego, H. Oliveira et P. W. Crous (2011) *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress* 11: 655-688.
- A. Cabral, C. Rego, T. Nascimento, H. Oliveira, J. Z. Groenewald et P. W. Crous (2012) Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal biology* 116: 62-80.
- L. Cadle-Davidson, D. R. Chicoine et N. H. Consolie (2011) Variation within and among *Vitis* spp. for foliar resistance to the powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*. *Plant Dis.* 95: 202-211.

- C. Camps (2008) Etude transcriptomique de la réponse de la Vigne (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) au champignon ascomycète vasculaire *Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose. Ph. D. (Université de Poitiers, France). 141 p.
- C. G. B. Caraguel, H. Stryhn, N. Gagné, I. R. Dohoo et K. L. Hammell (2011) Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest.* 23: 2-15.
- I. Carbone, J. B. Anderson et L. M. Kohn (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91: 553-556.
- M. V. Carter (1957) *Eutypa armeniacae* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Aust. J. Bot.* 5: 21-35.
- M. V. Carter (1988) *Eutypa dieback*. Compendium of Grape Diseases, R. C. Pearson et A. C. Goheen (Édit.) APS Press, , St Paul, MN, USA, Ed Vol. p 32-34.
- M. Catal, S. A. Jordan, S. C. Butterworth et A. M. C. Schilder (2007) Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in Grapevine by Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology.* 97: 737-747.
- P. Chaverri, C. Salgado, Y. Hirooka, A. Y. Rossman et G. J. Samuels (2011) Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Stud Mycol.* 68: 57-78.
- O. Clark et M. Rand (2007) *Oz Clarke's Grapes and Wines: The Definitive Guide to the World's Great Grapes and the Wines They Make*. Houghton Mifflin Harcourt, Orlando. p.
- L. C. Coleman (1928) The dead arm disease of grapes in Ontario. A preliminary study. *Scientific Agriculture* 8: 281-315.
- B. G. Coombe (1987) Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta hort.* 206: 23-36.
- Corbett Life Science (2006) Rotor-Gene6000 Operator Manual. in, Édit Corbett Research), p.
- P. Cortesi et M. G. Milgroom (2001) Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Austras. Plant Pathol.* 83: 79-86.
- C. Cragolini, G. J. March, A. I. Viglianco, R. J. Novo, R. Bugiani et D. Barreto (2009) Presencia de *Phomopsis viticola* (Saccardo) Saccardo, agente causal de excoriosis, en vinedos de Córdoba, Argentina. *Agriscientia.* XXVI: 35-41.
- G. Cristinzio (1978) Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia de Isernia. *Informatore fitopatologico.* 28: 21-23.
- P. W. Crous, B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Reeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Phillips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber et J. Z. Groenewald (2006) Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud Mycol.* 55: 235-253.
- U. Damm et P. Fourie (2005) A cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil. *S Afr J Sci.* 101.
- F. Debode, A. Marien, É. Janssen, C. Bragard et G. Berben (2017) The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 21: 3-11.
- C. Deswarte, P. Rouquier, J.-P. Roustan, R. Dargent et J. Fallot (1994) Ultrastructural changes produced in plantlet leaves and protoplasts of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Vitis.* 33: 185-188.
- G. A. Diaz et B. A. Latorre (2013) Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection.* 46: 106-112.

- V. D. Didenko (2001) DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques*. 31: 1106-1120.
- A. Drenth, G. Wagals, B. Smith, B. Sendall, C. O'Dwyer, G. Irvine et J. A. G. Irwin (2006) Development of a DNA-based method for the detection and identification of *Phytophthora* species. *Aust Plant Pathol*. 35: 147-159.
- G. Dubé et I. Turcotte (2011) Guide d'identification des cépages cultivés en climat froid : cépages de cuve. Québec. 215 p.
- J. M. Dubois et L. Deshaies (1997) Guide des vignobles du Québec. Presses de l'Université Laval, Québec. 297 p.
- J. A. Duthie, G. P. Munkvold, J. J. Marois, S. Grant et D. O. Chellemi (1991) Relationship between age of vineyard and incidence of *Eutypa dieback*. *Phytopathology* 81: 1183.
- V. Edel, C. Steinberg, N. Gautheron et C. Alabouvette (2000) Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycol Res*. 104: 518-526.
- J. Edwards, F. Constable, T. Wiechel et S. Salib (2007) Comparison of the molecular tests – single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR®Green and TaqMan®) - for detection of *Phaeomoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathol. Mediterr*. 46: 58-72.
- A. Eichert, K. Behling, C. Betzel, V. A. Erdmann, J. P. Furste et C. Forster (2010) The crystal structure of an 'All Locked' nucleic acid duplex. *Nucleic acids research* 38: 6729-6736.
- A. Eskalen, A. J. Feliciano et W. D. Gubler (2007) Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Dis*. 91: 1100-1104.
- E. Fabre et F. Dunal (1853) Observations sur les maladies régnantes de la vigne. Imprimerie de P. Grollier, Montpellier, France. 48 p.
- J. Fallot, C. Deswarte, S. Dalmayrac, S. Colrat et J. P. Roustau (1997) L'eutypiose de la vigne : isolement d'une molécule synthétisée par *Eutypa lata* et toxique pour la vigne. *C. R. Acad. Sci*. 320: 149-158.
- M. Fischer (2002) A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycol. Prog*. 1: 315-324.
- M. Fischer et H. H. Kassemeyer (2003) Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*. 42: 109-116.
- P. Galet (1977) Les maladies et les parasites de la vigne. Imprimerie du Paysan du Midi, Montpellier. 871 p.
- N. L. Glass et G. C. Donaldson (1995) Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1323-1330.
- A. Graniti, G. Surico et L. Mugnai (2000) Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathol. Mediterr*. 39: 16-20.
- W. D. Gubler, K. Baumgartner, G. T. Browne, A. Eskalen, S. R. Latham, E. Petit et L. A. Bayramian (2004) Root diseases of grapevines in California and their control. *Aust. Plant Pathol*. 33: 157-165.
- F. Halleen, P. H. Fourie et P. W. Crous (2006a) A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathol. Mediterr*. 45: S55-S67.
- F. Halleen, H. J. Schroers, J. Z. Groenewald et P. W. Crous (2004) Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Stud Mycol*. 50: 431-455.
- F. Halleen, H. J. Schroers, J. Z. Groenewald, C. Rego, H. Oliveira et P. W. Crous (2006b) *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Stud. Mycol*. 55: 227-234.
- S. M. Hays, J. Swanson et E. U. Selker (2002) Identification and characterization of the genes encoding the core histones and histone variants of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 160: 961-973.

- C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak et P. M. Williams (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
- V. Hofstetter, B. Buyck, D. Croll, O. Viret, A. Couleux et K. Gindro (2012) What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Divers.* 4: 51-67.
- P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson et D. H. Gelfand (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280.
- J. G. Horsfall et A. E. Dimond (1960) *Plant Pathology: an advance treatise, volume II.* Academic Press, New York, USA. p.
- Integrated DNA Technologies (2013) Designing PCR primers and probes.), <https://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes> (Consulté le Mai)
- Integrated DNA Technologies (s.d.) Dyes.), <https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Dyes> (Consulté le Mai)
- S. D. Irina, A. G. Kopchinskiy, M. Komon, J. Bissett, G. Szakacs et C. P. Kubicek (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol.* 42: 813-828.
- R. S. Jackson (2008) *Wine Science : Principles and Applications.* Academic Press, San Diego, CA. . 776 p.
- J. Karvonen (2016) *Northern Viticulture: Reviews and Studies.* Books on Demand, Finland. 144 p.
- A. G. Koek, S. M. Bruisten, M. Dierdorp, A. P. van Dam et K. Templeton (2006) Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12: 1233-1236.
- U. Koljalg, R. H. Nilsson, K. Abarenkov et et al (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol.* 22: 5271-5277.
- T. Kuchta, K. Krascenicsova et G. Banreti (2007) Optimization of fluorescence measurement in duplex real-time PCR with TaqMan® probes labeled with VIC and quenched by TAMRA. *BioTechniques.* 42: 147, 149.
- G. H. Laplante (2006) La tache des feuilles et de la tige causée par le *Phomopsis* sur les plants de vigne. in *Bulletin d'information - Réseau d'avertissements phytosanitaires*, Édité (Le groupe d'experts en protection de la vigne, MAPAQ, Québec), p.
- P. Larignon (2012) Maladies cryptogamiques du bois de la vigne : symptomatologie et agents pathogènes. in *Institut Français de la Vigne et du Vin*, Édité), p.
- P. Larignon (2016) Maladies cryptogamiques du bois de la vigne : symptomatologie et agents pathogènes. *Institut Français de la Vigne et du Vin*), <http://www.vignevin.com/>, (Consulté le
- P. Larignon, G. Darné, E. Ménard, F. Desaché et B. Dubos (2008) Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? *Le Progrès agricole et viticole* 125(23):642-651.
- P. Larignon, F. Fontaine, S. Farine, C. Clement et C. Bertsch (2009) Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. *Comptes rendus biologies* 332: 765-783.
- P. Larignon, R. Fulchic, L. Cere et B. Dubos (2001) Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 40, Supplement: S336-S342.
- P. Larignon, P. Lecomte et B. Dubos (2000) Comment évaluer l'importance des maladies du bois dans le vignoble? *Union Girondine* 956:36-38.

- J. Lasnier, R. Lauzier et M. Trudeau (2002) La viticulture au Québec: perspectives économiques sur la production de raisins. . Viticulture au Québec. (Saint-Rémi, Québec. , C. Vincent, J. Lasnier et N. J. Bostanian (Édit.) Centre de recherche et de développement en horticulture. , p.
- P. Lecomte, G. Darrieutort, A. Defives, G. Louvet, J. M. Liminana et D. Blancard (2006) Observations of Black DeadArm symptoms in Bordeaux vineyards: Evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal necroses, questions, hypotheses. in, Édit (Integrated Protection in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin 29), p 93-94.
- P. Lecomte, J. P. Peros, D. Blancard, N. Bastien et D. C. (2000) PCR Assays That Identify the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Appl Environ Microbiol.* 66: 4475-4480.
- L. G. Lee, C. R. Connell et W. Bloch (1993) Allelic discrimination by nick-tranlation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-3766.
- J. Lehoczy (1974a) Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9: 319-327.
- J. Lehoczy (1974b) Necrosis of nurseried grapevine grafts of *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9:329-331.
- J. Liang (2015) WINE COMPANY ANALYSIS IN “THE NEW WORLD” AND “THE OLD WORLD” M. Sc. (University of Kentucky Lexington, Kentucky). 68 p.
- J. Luque, S. Martos, A. Aroca, R. Raposo et F. Garcia-Fihueres (2009) Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Plant Pathol.* 91: 381-390.
- I. M. Mackay, K. E. Arden et A. Nitsche (2002) Real time PCR in virology. *Nucleic acids research* 30: 1292-1305.
- N. E. Mahoney, R. J. Molyneux, R. J. Smith, T. K. Schock, P. E. Rolshausen et W. D. Gubler (2005) Dying-arm disease in grapevines: Diagnosis of infection with *Eutypa lata* by metabolite analysis. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8148-8155.
- D. Majumder, T. Rajesh, E. G. Suting et A. Debbarma (2013) Detection of seed borne pathogens in wheat: recent trends. *Aust J Crop Sci.* 7: 500-507.
- A. Mariani, E. Pomarici et V. Boatto (2012) The international wine trade: Recent trends and critical issues. *Wine Economics and Policy* 1: 24-40.
- M. T. Martin, R. Cobos, L. Martin et L. Lopez-Enriquez (2012) Real-time PCR detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and environmental microbiology* 78: 3985-3991.
- M. T. Martin, M. J. Cuesta et L. Martin (2014) Development of SCAR Primers for PCR Assay to Detect *Diplodia seriata*. *International scholarly research notices* 2014: 824 106.
- M. T. Martin, L. Martin, M. J. Cuesta et P. García-Benavides (2011) First report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with grapevine decline from Castilla y Le on, Spain. *Plant Dis.* 95: 361.
- D. G. McDowell, N. A. Burns et H. C. Parkes (1998) Localized sequence regions possessing high melting temperature prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* 26: 3340-3347.
- S. M. Mirmajlessi, E. Loit, M. Mänd et S. M. Mansouripour (2015) Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis – a Review. *Plant Protection Science* 51: 177-190.
- S. Mohali, T. I. Burgess et M. J. Windfield (2005) Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasioidiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathol.* 35: 385-396.
- W. J. Moller, A. J. Braun, J. K. Uyemoto et A. N. Kasimatis (1977) *Eutypa armeniacae* inoculum associated with dead arm-affected grapevines in New York and Ontario. *Plant Disease Reporter* 61: 422-423.

- W. J. Moller et M. V. Carter (1965) Production and dispersal of ascospores in *Eutypa armeniacae*. *Aust. J. Biol. Sci.* 53: 828-829.
- W. J. Moller et A. N. Kasimatis (1978) Dieback of grapevine caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant Dis Rep.* 62: 254-258.
- W. J. Moller et A. N. Kasimatis (1981) Further Evidence that *Eutypa armeniacae* - not *Phomopsis viticola* - Incites Dead Arm Symptoms on Grape. *Plant Dis.* 65: 429-431.
- A. Morales-Cruz, K. C. Amrine, B. Blanco-Ulate, D. P. Lawrence, R. Travadon, P. E. Rolshausen, K. Baumgartner et D. Cantu (2015) Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. *BMC genomics* 16: 469.
- L. Mostert, F. Halleen, P. Fourie et P. W. Crous (2006) A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 45: S12-S29.
- L. Mugnai, A. Graniti et G. Surico (1999) Esca (Black Measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Dis.* 83: 404-417.
- M. G. Mullins, A. Bouquet et L. E. Williams (1992) *Biology of the Grapevine*. Cambrid University Press,, Cambridge, UK. p.
- H. Myburg, M. Gryzenhout, B. D. Wingfield et M. J. Windfield (2002) β -Tubulin and histone H3 gene sequences distinguish *Cryphonectria cubensis* from South Africa, Asia, and South America. *Can. J. Bot.* 80: 590-596.
- E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castano et J. Solera (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 439: 231-250.
- H.-F. Ni, H.-R. Yang, R.-S. Chen, T.-H. Hung et R.-F. Liou (2012) A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of *Botryosphaeriaceae* species on mango. *European Journal of Plant Pathology* 133: 819-828.
- Norgen Biotek (s.d.-a) *Phomopsis viticola* End-Point PCR Kit - Product Insert.), <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/P-viticola-End-Point-PCR-Kit-Insert-PIEP34900-1.pdf> (Consulté le Mai)
- Norgen Biotek (s.d.-b) *Phomopsis viticola* TaqMan PCR Kit - Product Insert.), <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/P-viticola-TaqMan-PCR-Kit-Insert-PITM34900-1.pdf> (Consulté le Mai)
- D. T. O'Gorman, P. Haag et P. L. Sholberg (2009) New diseases causing decline of wine grapes in the Okanagan valley. *Can. Plant Dis. Survey.* 90: 140-143.
- S. Octave, P. Fleurat-Lessard et G. Roblin (2009) Diagnosis of *Eutypa lata* Infection in Grapevines by Serological Detection of Secreted Polypeptides. *Plant Pathol.* 91: 321-330.
- OIV (2016) *Grapevine Trunk Diseases. A review.* . in, Édité (Organisation internationale de la Vigne et du Vin, Paris, France), p.
- OIV (Avril 2016) *State of the Viticulture World Market.* in, Édité (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), p.
- OIV (Avril 2017) *Global state of conditions report: developments and trends.* in, Édité (Organisation internationale de la Vigne et du Vin.), p.
- P. A. Okubara, K. L. Schroeder et T. C. Paulitz (2005) Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. . *Can. J. Plant Pathol.* 27: 300-313.
- W. C. Olien (1990) The muscadine grape: Botany, viticulture, history, and current industry. *HortScience.* 25: 732-739.

- H. Oliveira, M. C. Rego et T. Nascimento (2004) Decline of young grapevines caused by fungi. *Acta Horticulturae*, (Édit.), Ed Vol 652. p 295-304.
- M. A. Outram, E. E. Jones, M. V. Jaspers et H. J. Ridgway (2014) Development of a PCR-RFLP method to distinguish species within the *Ilyonectria macrodidyma* complex New Zealand PI Protec. 67: 151-156.
- M. Paiva-Cavalcanti, C. G. Regis-da-Silva et Y. M. Gomes (2010) Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection: a mini-review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 16: 537-542.
- E. Petit, E. Barriault, K. Baumgartner, W. F. Wilcox et P. E. Rolshausen (2011) *Cylindrocarpon* Species Associated with Black-Foot of Grapevine in Northeastern United States and Southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 177-183.
- E. Petit et W. D. Gubler (2005) Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Dis*. 89: 1051-1059.
- E. Petit et W. D. Gubler (2007) First report of *Cylindrocarpon liriodendri* causing black foot disease of grapevines in California. *Plant Dis*. 91: 1060.
- C. H. Petzoldt, M. A. Sall et W. J. Moller (1983) Factors determining the relative number of ascospores released by *Eutypa armeniacae* in California. *Plant Dis*. 67: 857-860.
- A. J. L. Phillips (2000) Excoriose, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. *Phytopathol. Mediterr*. 39: 341-356.
- A. J. L. Phillips et M. T. Lucas (1997) The taxonomic status of *Macrophoma flaccida* and *Macrophoma reniformis* and their relationship to *Botryosphaeria dothidea*. *Sydowia*, 49: 150-159.
- T. S. Pine (1958) Etiology of the dead-arm disease of grapevines. *Phytopathology*. 48: 192-197.
- O. H. Piontkivska (2003) EVOLUTION OF MULTIGENE FAMILIES: HISTONE AND MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENES. Ph. D (The Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA). 141 p.
- E. Poitras et A. Houde (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotechnol*. 2: 2-11.
- J. Pouzoulet (2012) Développement d'une méthodologie PCR en temps réel pour la détection et la quantification in planta des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne. Ph.D. (Université de Toulouse, France). 177 p.
- J. Pouzoulet, N. Mailhac, C. Couderc, X. Besson, J. Dayde, M. Lummerzheim et A. Jacques (2013) A method to detect and quantify *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied microbiology and biotechnology* 97: 10163-10175.
- PREMIER Biosoft (s.d.) TaqMan® Probes.), http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html (Consulté le Mai)
- C. M. Probst (2011) *Cylindrocarpon* Black Foot Disease in Grapevines Identification and Epidemiology. Ph. D. (Lincoln University, New Zealand). p.
- J. W. Pscheidt et R. C. Pearson (1989) Effect of grapevine training and pruning practices on occurrence of *Phomopsis* cane and leaf spot. *Plant Dis*. 73: 825-828.
- Qiagen (2011) *QuantiFast® probe PCR handbook*,.), <http://www.qiagen.com/literature/handbooks/int/pcrlit.aspx - QuantiFast1>, (Consulté le Mai)
- W. Qiu, A. Feechan et I. Dry (2015) Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture research* 2: 15020.
- R. Rappaz (1984) Les espèces sanctionnées du genre *Eutypa* (Diatrypacea: ascomycètes): études taxonomiques et nomenclature. *Mycotaxon*. 20: 567-586.
- L. Ravaz (1909) Sur l'apoplexie de la vigne. *Progrès Agricole et Viticole* 52:574.

- L. Ravaz et G. Verge (1928) Sur une maladie de la vigne, l'Excoriose. Comptes rendus des Séances de l'Académie des Sciences., (Édit.) Paris, France, Ed Vol. p 313-315.
- C. Rego, H. Oliveira, A. Carvalho et A. Phillips (2000) Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* 39: 76-79.
- C. Rego, A. Vaz, T. Nascimento, A. Cabral et H. Oliveira (2009) Diseases incited by *Botryosphaeriaceae* fungi in Portuguese vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 181.
- J. D. Reich, T. W. Alexander et S. Chatterton (2016) A multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Letters in applied microbiology* 62: 379-385.
- H. J. Ridgway, N. T. Amponsah, D. S. Brown, J. Baskarathevan, E. E. Jones et M. V. Jaspers (2011) Detection of *botryosphaeriaceous* species in environmental samples using a multi-species primer pair. *Plant Pathol.* 60: 1118-1127.
- G. Rolland (1873) Considérations physiologiques sur l'apoplexie de la vigne. *Bulletin de la Société d'Agriculture de France* 5:539-545.
- P. E. Rolshausen, N. E. Mahoney, R. J. Molyneux et W. D. Gubler (2006) A Reassessment of the Species Concept in *Eutypa lata*, the Causal Agent of *Eutypa* Dieback of Grapevine. *Phytopathology* 96: 369-377.
- P. E. Rolshausen, F. P. Trouillas et W. D. Gubler (2004) Identification of *Eutypa lata* by PCR-RFLP. *Plant Dis.* 88: 925-929.
- P. E. Rolshausen, J. R. Urbez-Torres, S. Rooney-Latham, A. Eskalen, R. J. Smith et W. D. Gubler (2010) Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *Am. J. Enol. Vit.* 61: 113-119.
- L. C. Romero-Rivas, L. A. Alvarez, D. Gramaje, J. Armengol et C. Cadenas-Giraldo (2009) First Report of *Phaeoacremonium parasiticum* Causing Petri Disease of Grapevine in Peru. *Plant Dis.* 93: 200.
- S. Rooney-Latham, A. Eskalen et W. D. Gubler (2005) Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. *Plant Dis.* 89: 867-871.
- J. J. Rubio et E. Garzon (2011) Las enfermedades de madera de vid como amenaza del sector vitícola. *Revista Winetech.* 2 18-21.
- C. Rusin, I. C. R. Oliari, C. D. Leite, C. M. D. R. Faria, R. V. Botelho et M. A. K. Almança (2016) Antifungal activity of plant extracts on *Phaeomoniella chlamydospora*. *BIO Web of Conferences* 7: 01044.
- S. Safodien (2007) The molecular identification and characterisation of *Eutypa dieback* and a PCR-based assay for the detection of *Eutypa* and *Botryosphaeriaceae* species from grapevine in South Africa. M. Sc. (University of Stellenbosch, The Netherlands). p.
- R. F. D. Santos, E. Blume, M. F. B. Muniz, R. Harakawa, L. D. R. Garrido et C. Rego (2014a) Characterization of *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot of grapevine in southern Brazil. *Phytopathol. Mediterr.* 53: 406-415.
- R. F. D. Santos, E. Blume, M. F. B. Muniz, S. M. Steckling, G. W. Burtet, R. Harakawa, L. R. Garrido et L. R. S. Reiniger (2014b) First Report of "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Brazil. *Plant Dis.* 98: 567.
- C. Sass, D. P. Little, D. W. Stevenson et C. D. Specht (2007) DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PloS one* 2: e1154.
- S. Savocchia, C. C. Steel, B. J. Stodard et A. Somers (2007) Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in subtropical regions of Eastern Australia. *Vitis.* 46: 27-32.
- N. W. Schaad et R. D. Frederick (2002) Real-Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.* 24: 250-258.
- H. J. Scheck, S. J. Vasquez, W. D. Gubler et D. Fogle (1998) First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. *Plant Dis.* 82: 448.

- C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen et F. B. Consortium. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6241-6246.
- H. J. Schroers, M. Zerjav, A. Munda, F. Halleen et P. W. Crous (2008) *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycol. Res.* 112: 82-92.
- H. R. Schultz (2010) Climate change and viticulture: research needs for facing the future. *J Wine Res.* 21: 113-116.
- A. Shaw (1999) The emerging cool climate wine regions of Eastern Canada. *J Wine Res.* 10: 79-94.
- A. Shaw (2001) Pelee Island and Lake Erie north shore, Ontario: A climate analysis of Canada's warmest wine region. *J Wine Res.* 12: 19-37.
- A. Shaw (2002) A climate assessment of the Niagara Peninsula viticulture area of Ontario for the application of wine machines. *J Wine Res.* 13: 143-164.
- M. Sosnowski et T. Wicks (2010) Eutypa dieback of grapevines – identification and management. in, *Édit Grape and Wine Research and Development Corporation Australia*, p.
- M. Sosnowski, T. Wicks et E. S. Scott (2010) Controlling Eutypa dieback by remedial surgery. *Phytopathol. Mediterr.* 49: 125.
- M. R. Sosnowski, M. L. Creaser, T. J. Wicks, R. Lardner et E. S. Scott (2008) Protection of grapevine pruning wounds from infection by Eutypa lata. *Aust J Grape Wine Res.* 14: 134-142.
- M. R. Sosnowski, D. Shtienberg, M. L. Creaser, T. J. Wicks, R. Lardner et E. S. Scott (2007) The Influence of Climate on Foliar Symptoms of Eutypa Dieback in Grapevines. *Phytopathology*. 97: 1284-1289.
- A. Spagnolo, G. Marchi, F. Peduto, A. J. L. Phillips et G. Surico (2010) Detection of Botryosphaeriaceae species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the Neofusicoccum parvum/N. ribis complex. *European Journal of Plant Pathology* 129: 485-500.
- G. Surico (2009) Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 5-10.
- Y. T. Tewoldemedhin, M. Mazzola, L. Mostert et A. McLeod (2010) Cylindrocarpon species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 129: 637-651.
- P. Tey-Rulh, I. Philippe, J. M. Renaud, G. Tsoupras, P. De Angelis, J. Fallot et R. Tabacchi (1991) Eutypine, a phytotoxin produced by Eutypa lata the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry*. 30: 471-473.
- F. P. Trouillas et W. D. Gubler (2010) Pathogenicity of Diatrypaceae species in grapevines in California. *Plant Dis.* 94: 867-872.
- F. P. Trouillas, J. R. Úrbez-Torres et W. D. Gubler (2010) Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia*. 102: 319-336.
- B. Tsedaley (2015) A Review on Disease Detection, Pathogen Identification and Population Genetics in Fungi. *J Biol Agric Healthc.* 5.
- C. K. Tsui, J. Woodhall, W. Chen, C. A. Levesque, A. Lau, C. D. Schoen, C. Baschien, M. J. Najafzadeh et G. S. de Hoog (2011) Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus* 2: 177-189.
- D. Udayanga, L. A. Castlebury, A. Y. Rossman et K. D. Hyde (2014) Species limits in Diaporthe: molecular re-assessment of D. citri, D. cytospora, D. foeniculina and D. rudis. *Persoonia* 32: 83-101.
- F. A. Uecker (1988) A world list of Phomopsis names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir.* 13.

- J. R. Úrbez-Torres (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 50: S5-S45.
- J. R. Úrbez-Torres et W. D. Gubler (2009a) Double pruning, a potential method to control Bot canker disease of grapes, and susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by Botryosphaeriaceae. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 185.
- J. R. Úrbez-Torres et W. D. Gubler (2009b) Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Dis.* 93.
- J. R. Úrbez-Torres, P. Haag, P. Bowen et D. T. O'Gorman (2014) Grapevine Trunk Diseases in British Columbia: Incidence and Characterization of the Fungal Pathogens Associated with Black Foot Disease of Grapevine *Plant Dis.* 98: 456-468.
- J. R. Úrbez-Torres, G. M. Leavitt, J. C. Guerrero, J. Guevara et W. D. Gubler (2008) Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* 92: 519-529.
- J. R. Úrbez-Torres, G. M. Leavitt, T. M. Voegel et W. D. Gubler (2006) Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease* 90: 1490-1503.
- J. R. Úrbez-Torres, F. Peduto et W. D. Gubler (2010a) First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassispora* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant Dis.* 94: 785.
- J. R. Úrbez-Torres, F. Peduto, S. Rooney-Latham et W. D. Gubler (2010b) First report of *Diplodia corticola* causing grapevine (*Vitis vinifera*) cankers and trunk cankers and dieback of canyon live oak (*Quercus chrysolepis*) in California. *Plant Dis.* 94: 785.
- J. R. Úrbez-Torres, F. Peduto, R. J. Smith et W. D. Gubler (2013) Phomopsis Dieback : A Grapevine Trunk Disease Caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Dis.* 97: 1571-1579.
- J. M. van Niekerk, P. W. Crous, J. Z. Groenewald, P. Fourie et F. Halleen (2004) DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycology.* 96: 781-798.
- P. Viala (1922) L'apoplexie. *Bulletin de la Société de Patologie Végétale de France IX P.V. des Sciences de janvier-mars.*
- P. Viala et L. Ravaz (1886) Sur de nouvelles espèces du genre *Phoma* se développant sur les fruits de la vigne. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 33: 61-70.
- C. Vincent (2002) Bref historique de la viticulture au Québec. . *Viticulture au Québec*. (Saint-Rémi, Québec. , C. Vincent, J. Lasnier et N. J. Bostanian (Édit.) Centre de recherche et de développement en horticulture. , p.
- E. Vinet (1909) L'apoplexie de la vigne en Anjou. *Revue de Viticulture* 32:676-681.
- O. Viret, W. Siegfried, P. H. Dubuis et K. Gindro (2017a) Eutypiose. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* 49(2):101-102.
- O. Viret, W. Siegfried, P. H. Dubuis et K. Gindro (2017b) Excoriose. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* 49(2):103-104.
- O. Viret, W. Siegfried, P. H. Dubuis et K. Gindro (2017c) Syndrome de l'esca. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* 49(2):99-100.
- X. C. Wang, C. Liu, L. Huang, J. Bengtsson-Palme, H. Chen, J. H. Zhang, D. Cai et J. Q. Li (2015) ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Mol Ecol Resour* 15: 573-586.
- L. I. Ward, P. A. Beales, A. V. Barnes et C. R. Lane (2004) A Real-Time PCR Assay Based Method for Routine Diagnosis of *Spongopora subterranea* on Potato Tubers. *J. Phytopathology.* 152: 633-638.
- J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski et S. V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res.* 18: 6531-6535.
- A. Winkler, J. Cook, W. Kliewer et L. Lider (1974) *General Viticulture*. University of California Press, Berkeley. 710 p.

X. Xia (2010) The Effect of Probe Length and GC% on Microarray. Signal Intensity: Characterizing the Functional Relationship. *Int J Syst Synth Biol.* 1: 171-183.

Y. You, B. G. Moreira, M. A. Behlke et R. Owczarzy (2006) Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic acids research* 34: e60.

F. Zhang, F. Luo et D. Gu (1990) Studies on germplasm resources of wild grape species (*Vitis* spp). in *Proc. 5th Intl. Symp. Grape Breeding*, Édité G. Alleweldt St. Martin/Pfalz, Germany.), p 50-57.

ANNEXE

Tableau A-1 : Recette du tampon d'extraction

Solution à ajouter	Volume à ajouter (dans 100ml)	Concentration finale dans le tampon
Tris-HCl (pH8 ; à 1 M)	5 ml	50 mM
EDTA-2Na (pH8 ; 0,5 M)	1 ml	5 mM
SDS (10 %)	30 ml	3 %
Eau distillée stérile	64 ml	-

Tableau A-2 : Recette des milieux utilisés dans ce projet

Milieu	Quantité de poudres à ajouter (dans 1L d'eau distillée)	Concentration finale d'antibiotiques dans le milieu
PDA	39 g de PDA (Alpha Biosciences)	-
PDA + CaCO₃	39 g de PDA 15g de CaCO ₃	-
PDA + 3	39 g de PDA	Streptomycine 0,1 % Pénicilline 0,05 % Chloramphénicol 0,005 %
MEA + 3	33,6 g de Difco™ MEA	Streptomycine 0,1 % Pénicilline 0,05 % Chloramphénicol 0,005 %
SNA + 2	1 g de KH ₂ PO ₄ 1 g de KNO ₃ 0,5 g de MgSO ₄ •7H ₂ O 0,5 g de KCl 0,2 g de glucose 0,2 g de sucrose 15 g d'agar	Tétracycline 0,5 % Streptomycine 1 %