

# Le piégeage des spores du chancre coloré du platane : une expérience unique réalisée dans le canton de Genève

**Dr François Lefort**, professeur HES

Responsable du groupe de recherche Plantes et pathogènes, Institut terre nature et paysage

Professeur en filière Agronomie

hepia, HES-SO//Genève, 150 route de Presinge, 1254 Jussy

## Résumé

Pour répondre à la question de savoir si *Ceratocystis platani*, un champignon ascomycète, agent du chancre coloré, est encore présent à Genève, en absence d'arbres symptomatiques, nous avons développé une méthode de capture de spores fongiques par disposition de 20 pièges à spores sur des sites anciennement contaminés, ou à proximité de sites anciennement contaminés. Les pièges ont été relevés sur deux périodes, en 2005 et en 2006. Les filtres piégeant les spores des champignons ont été soumis à une extraction de l'ADN total, puis utilisés ensuite pour en amplifier une séquence cible localisée sur le gène de la toxine cérato-platanine, spécifique de *Ceratocystis platani*. La méthode d'amplification développée est celle de l'amplification quantitative en temps réel, nous permettant d'estimer le nombre de spores présentes sur un filtre.

Le travail a été poursuivi sur 2 périodes consécutives, de 2005 à 2007, et continue de 2007 à 2009. Depuis 2007, les piégeages et les tests ont été étendus à plusieurs communes du territoire genevois, puis sont maintenant recentrés sur les zones détectées comme étant les plus positives sur le territoire pour une prochaine campagne de suivi de 2009 à 2011.

## Introduction

### L'espèce ou le complexe d'espèces *Ceratocystis fimbriata*

*Ceratocystis fimbriata* Ellis and Halsted (Phylum des Ascomycota, sous-phylum des Pezizomycotina, classe des Sordariomycetes; sous-classe des Hypocreomycetidae, ordre des Microascales, Famille des Ceratocystidaceae, genre *Ceratocystis*) est une espèce complexe composée de nombreuses formes spéciales pathogènes affectant des spectres d'hôtes distincts. Certaines de ces formes spéciales causent des dégâts économiques considérables sur des cultures subtropicales et tropicales (cocotier, caféier, cacaoyer, hévéa, etc.).

Ces formes spéciales ou sous espèces de *C. fimbriata* ont des caractéristiques communes. Ces ascomycètes pratiquent deux formes de reproduction : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée.

Lors de la reproduction sexuée, les spores sexuées, que l'on appelle des ascospores, sont formées au nombre de 8 dans des sacs que l'on appelle des asques eux-mêmes contenus dans de petites structures ovoïdes appelées des périthèces. Les périthèces sont produits par le mycélium. La fructification est rapide, il suffit d'une semaine pour que le mycélium en produise.

Bien que la fécondation croisée (hétérothallisme) entre souches de type sexuel différent soit le cas général, certaines souches sont auto fertiles (homothaliques).

La reproduction asexuée, la plus importante au cours du cycle de vie du champignon, est effectuée par la production de conidies et d'aleuroconidies, les spores de reproduction asexuée.

Le champignon est dispersé en tant que fragments de mycélium, conidies, aleuroconidies ou d'ascospores. Les aleuroconidies ont probablement le meilleur pouvoir de survie grâce à leurs parois épaisses, ce qui faciliterait leur survie dans les sols et dans les rostrés et tubes digestifs des insectes. Le champignon peut survivre dans des fragments de bois dans le sol et dans des eaux de rivières durant les mois d'hiver. Les plaies sur les végétaux sains, qu'elles soient naturelles ou d'origine humaine, sont une source importante d'infection pour toutes les formes spéciales de *Ceratocystis fimbriata*.

Les différentes formes spéciales de *Ceratocystis fimbriata* se développent dans une gamme de température entre 18 et 28°C et sont capables de produire des ascospores en l'espace d'une semaine.

Par contre ces champignons ne sont pas des pathogènes obligatoires puisqu'ils sont cultivables sur des milieux de culture synthétique; ils doivent pouvoir vivre comme saprophytes sur des tissus morts, survivre sous forme de mycélium dans des plantes hôtes autres que celles connues ou sous forme d'aleuroconidies dans le sol ou dans des débris végétaux.

La dispersion de ces pathogènes est facilitée par les méthodes de multiplication des végétaux. Les arbres peuvent être aussi infectés par des inocula présents dans le sol; la dispersion par des insectes et les rongeurs est aussi possible. La dispersion par les cours d'eau est avérée. Les ascospores et conidies sont probablement dispersées naturellement par des insectes et par le vent.

De nombreuses espèces de *Ceratocystis* produisent des fructifications, ainsi que des odeurs caractéristiques qui permettent une meilleure dispersion par les insectes; ceci est sûrement dû à une adaptation du champignon. La dispersion par les insectes xylophages est connue, tels les *Xyleborus* et les *Hypocryphalus*. La survie du champignon dans le tube digestif des insectes a été mise en évidence. Les sciures produites par les insectes xylophages semblent être contaminées par les spores du champignon et dispersées par le vent, et contribuent à sa dissémination (ITON, 1960).

*Ceratocystis fimbriata* est un champignon qui attaque les vaisseaux conducteurs de la sève, principalement les vaisseaux du xylème. Sur les arbres, le champignon pénètre par une plaie existante au niveau du bois, des racines ou de la feuille. Ces plaies peuvent être dues à un accident, à l'entretien de l'arbre ou être des « plaies naturelles » telles que les stomates. Les infections de *Ceratocystis fimbriata* sont souvent suivies d'infections par des pathogènes secondaires, en général des champignons lignivores. Sur les plantes herbacées, *Ceratocystis fimbriata* pénètrent par des blessures au niveau des racines, provoquant un affaiblissement de la plante; le pathogène infecte ensuite toute la plante. Les symptômes, chloroses et flétrissement, sont rapidement visibles et suivis de la mort de la plante.

### **L'agent du chancre coloré du platane : *Ceratocystis platani***

Cet organisme a été considéré, jusqu'en 2005, comme une sous-espèce de l'espèce *Ceratocystis fimbriata*, sous le nom *Ceratocystis fimbriata forma specialis platani*.

Nom : *Ceratocystis platani* Engelbrecht CJB, Harrington TC (ENGELBRECHT et al., 2005)

Synonyme : *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted f. sp. *platani* Walter

Synonyme : *Endoconidiophora fimbriata* Ellis et Halsted f. sp. *platani* Walter

Anamorphe : *Chalara* sp.

Noms communs : chancre coloré du platane, tache chancreuse, canker stain of plane

Le champignon, *Ceratocystis platani*, responsable du chancre du platane a été pour la première fois isolé par des chercheurs aux Etats-Unis, en 1926 (WALTER et al., 1952).

C'est un parasite de blessure et non de faiblesse, ce qui rend obligatoire la présence d'une blessure pour qu'il y ait infection. La pénétration du champignon n'est pas possible au travers de tissus sains (EPPO, 1986).

Il possède les caractéristiques générales des formes spéciales de *Ceratocystis fimbriata* vues ci-dessus. En outre, le champignon peut se transmettre par contact racinaire entre deux individus différents, ce qui permet au pathogène d'infecter un arbre sain. Ce cas de figure est couramment observé lors d'un alignement de platanes. De plus, il est certainement transmis par des outils, lors des élagages fréquents que subissent les arbres, et par des machines de terrassement qui provoquent des blessures racinaires. Le pathogène peut survivre entre 7 et 15 jours à la surface d'une plaie. La contamination est réalisée autant par les conidies que par les ascospores. Ce sont les spores du pathogène qui, en entrant en contact avec une blessure aussi petite soit-elle, vont germer. Le résultat de cette infection est un mycélium qui va coloniser les tissus du platane et émettre de nouvelles fructifications. Le mycélium progresse dans l'écorce, le cambium et par les rayons médullaires, et il envahit l'aubier et le bois. Puis il progresse rapidement (50 à 100 cm par an) par les vaisseaux du xylème (EPPO, 1986).

*Ceratocystis platani* peut survivre de nombreuses années à une température de -17 degrés Celsius; par contre sa température de développement se situe entre 10 et 45 °C. La température optimale étant 25°C. La capacité de survie du pathogène dans le sol est de 105 jours au minimum (EPPO, 1986).

En culture, le mycélium est plus ou moins dense, mais la partie la plus dense se situe au milieu. Le mycélium est brun verdâtre et émet une forte odeur caractéristique de banane. Le développement est rapide 0.5 cm en 24h à la température de 24°C (sur un milieu PDA, potato dextrose agar). Les périthèces sont noirâtres, à très long col (200 µm à la base et 400 à 800 µm au col), se terminant par un ostiole en forme de balai. Les parois des asques se gélifient rapidement et l'intérieur du périthèce est rempli d'ascospores libres. Certaines souches ne produisent pas de périthèces ou seulement des périthèces avortés. A maturité, les ascospores s'échappent par le bec du périthèce et s'agglutinent en une masse compacte laiteuse autour de l'ostiole. Les ascospores sont en forme de chapeau melon (4 à 8 µm), ceci est le cycle sexué du champignon (EPPO, 1986) (Figures 1 et 2).

*Ceratocystis platani* forme des spores asexuées de trois types (Figures 1 et 2) :

- Endoconidies cylindro-tronquées hyalines de 5 à 40 x 3 à 6 µm, produites en longues files raides et arquées par des endoconidiophores de 60 à 90 µm.
- Endoconidies doliformes 7 à 12 x 6 à 9 µm, en chaînes courtes. Cette forme est plus rare que la précédente.
- Chlamydospores ou spores de résistances (endoconidies à parois épaisses), ovoïdes ou ampoulées, isolées ou en chaînes de 2 à 5 spores, brun-vert, 11 à 19 x 9 à 15 µm. Cette forme est très fortement retrouvée dans les parties de bois ou de sciures infectées (EPPO, 1986, PAULIN-MAHADY et al., 2002).

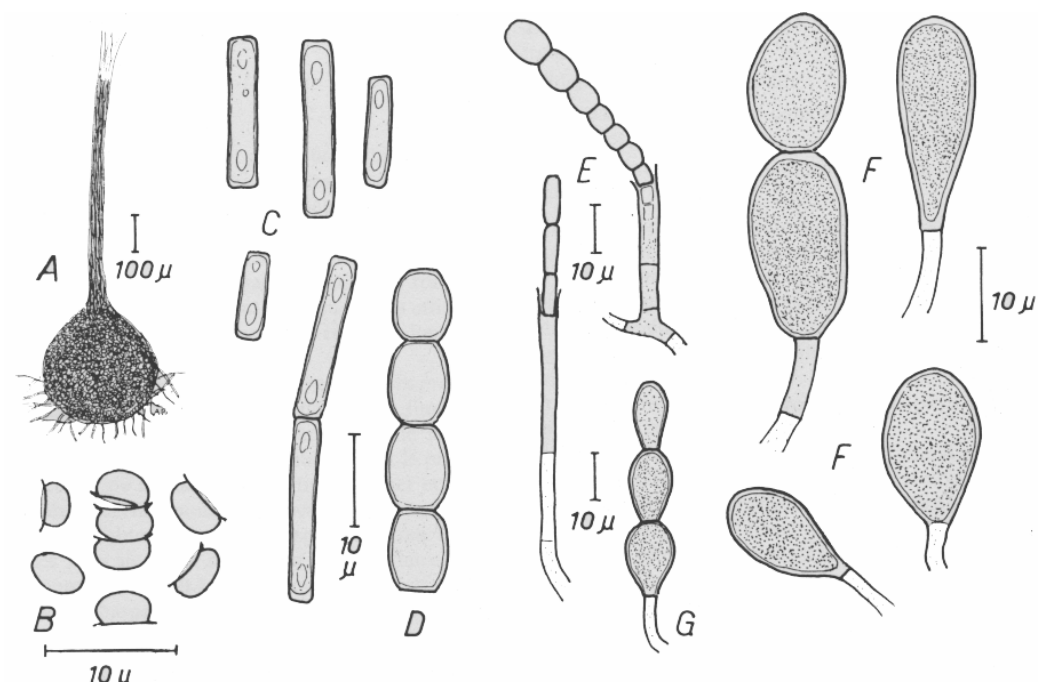


Figure 1 : Les diverses fructifications du champignon *Ceratocystis platani*. A : Périthèce; B : Ascospores; C : Endoconidies allongées; D : Endoconidies de forme « Oidium »; E : Conidiophores ; F : Chlamydospores ; G : Chlamydospores en chaîne (extrait de BOLAY et al., 1988).

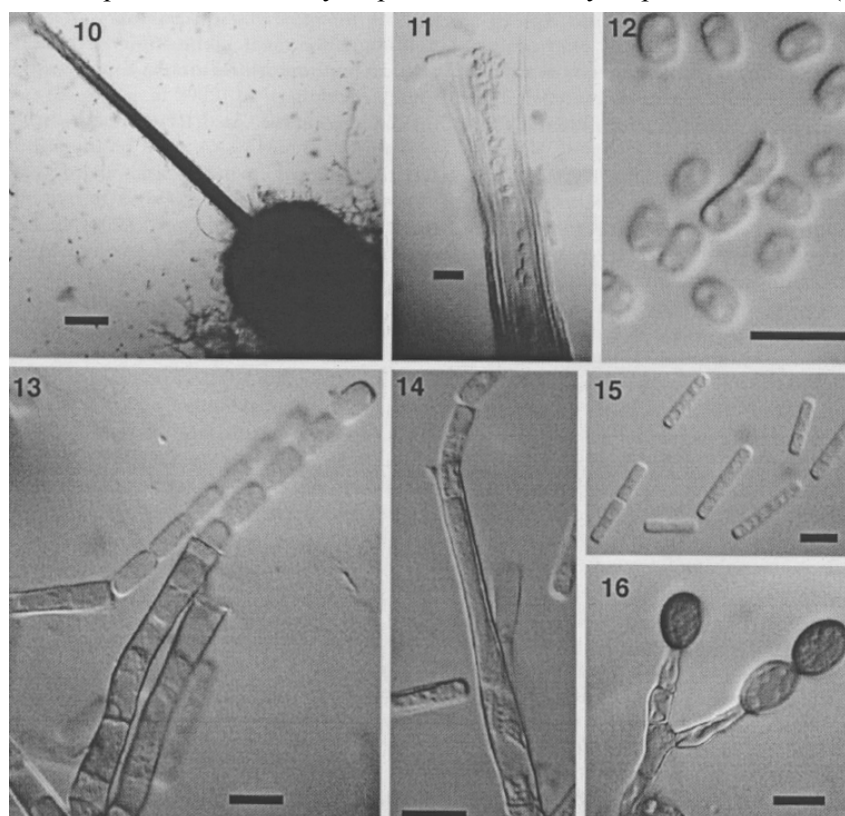


Figure 2 : Formes sexuelles diverses : 10 : Périthèce, 11 : Hyphes, 12 : Ascospores, 13 : Endoconidiophores, 14 : Endoconidiophores avec des conidies cylindriques, 15 : Endoconidies cylindrique, 16 : Aleuroconidiophores et aleuroconidies ; échelle de la barre noire 10=100μm ; 11-16=10μm (extrait de ENGELBRECHT et al., 2005).

### Plantes hôtes

Les platanes sont les seules plantes hôtes, spécialement *Platanus x acerifolia*, ainsi que ses parents (*Platanus occidentalis* et *Platanus orientalis*) (EPPO, 1986).

Mais des travaux non publiés, réalisés par notre équipe, montrent que le champignon est capable de se lancer en reproduction sexuée, c'est-à-dire de construire des périthèces et d'émettre des ascospores, sur d'autres essences, pourvu que les feuilles de ces essences soient blessées.

## Distribution géographique

La maladie du chancre coloré du platane a été identifiée pour la première fois en 1929, à Gloucester dans l'état du New Jersey aux Etats-Unis. La cause de la maladie serait due à un émondage effectué en 1926 (WALTER et al., 1952). En 1949, 87% des platanes de cette ville furent détruits. D'autres villes furent contaminées pour ne citer que Washington (1935), Philadelphie (1938), Baltimore, Pittsburgh, Portsmouth (1940) (BOLAY et al., 1988).

Il semblerait que *Ceratocystis platani* a été introduit en 1945 à Marseille par les forces militaires américaines lors du transport de munition dans des boîtes en platane atteint par la maladie. Le champignon se répandit assez rapidement en Italie et un peu plus lentement en France. La vitesse de propagation de la maladie semble s'accélérer ces dernières années.

Les zones où la présence du champignon a été détectée sont multiples :

- En Europe : France, Grèce, Italie, Suisse
- Asie : Arménie
- Amérique du Nord : Arkansas, Californie, New Jersey

En Suisse, on observa le pathogène pour la première fois en 1983 au Tessin dans le Mendrisiotto et sur les rives du lac de Lugano, D'Agno à Ponte-Tresa et dans le Malcantone. La maladie n'a été isolée et identifiée avec certitude qu'en 1986 en la comparant à la souche française. Dans la majorité des cas, les arbres atteints étaient ceux qui avaient subi de fortes agressions, tailles, accidents. Mais dès lors, on observa des platanes non taillés et non blessés qui furent attaqués par le pathogène. En 1988, on estime déjà à plus de mille le nombre de platanes tué par *Ceratocystis platani* (BOLAY et al, 1988) et la maladie est toujours présente dans le canton du Tessin. Il apparaît ensuite à Genève sur trois sites en 2001, 2002 et 2003.

## Autres maladies fongiques du platane

Enfin il faut noter que *Ceratocystis platani*, l'agent du chancre coloré n'est pas le seul champignon affectant le platane. De nombreuses autres espèces de champignons, ainsi qu'une espèce de *Phytophthora* causent des dégâts sur platane, beaucoup se manifestent sous forme d'oïdium sur feuilles, d'autres sont des champignons lignivores qui à terme fragilisent la structure de l'arbre, sans entraîner toutefois la mort rapide de l'arbre comme c'est le cas avec le chancre coloré. Ils peuvent agir comme pathogènes secondaires sur des arbres déjà fragilisés par le chancre coloré.

Liste des champignons et oomycètes pathogènes du platane :

*Armillaria mellea*  
*Botryodiplodia theobromae*  
*Calonectria pyrochroa*  
*Isospora platani*  
*Ceratocystis platani*  
*Cristulariella pyramidalis*  
*Daedalea confragosa*  
*Fomes applanatus*  
*Gnomonia veneta*  
*Hypoxylon tinctor*  
*Hydnum erinaceus*  
*Massaria platani*  
*Microsphaera alni*  
*Mycosphaerella stigmata platani*  
*Oidium obductum*  
*Phleospora multimaculans*  
*Phomopsis scabra*  
*Phyllactinia corylea*  
*Phyllosticta platani*  
*Phymatotrichum omnivorum*  
*Phytophthora cinnamomi*  
*Polyporus sulfureus*  
*Polyporus vesicolor*  
*Septoria platanifolia*  
*Stereum bicolor*  
*Stigmella platani*  
*Stigmata platani*  
*Xanthochrous hispidus*

**Détection par expression de *Ceratocystis platani***

Il est possible de détecter le champignon en laboratoire par test simple permettant le développement du champignon. Ceci est réalisé en laboratoire sur des bûchettes de bois de platane, écorcées et placées dans une atmosphère humide, à température ambiante. Le bois ou la sciure à tester sont immergés dans le bocal où on a préalablement placé la bûchette piège. *Ceratocystis platani*, s'il est présent dans le bois à tester, il apparaît au bout d'une semaine sous forme de mycélium et de périthèces. Avec cette méthode, on peut aussi rechercher la présence du parasite dans un échantillon de sol ou d'eau (GROSCLAUDE et al., 1988).

C'est une méthode qui permet de confirmer des soupçons d'infection d'un arbre sur la base de symptômes que cet arbre présenterait, mais elle n'est pas applicable comme méthode de suivi environnemental.

## Piégeage aérien et détection par biologie moléculaire : une expérience unique permettant un suivi environnemental du chanvre coloré

### Les pièges

Nous avons donc développé une méthode simple de piégeage des spores pour tester la présence du champignon sur trois sites du Canton de Genève, afin de vérifier si on pouvait détecter le champignon en absence d'arbres symptomatiques.

Un piège à spores est constitué de 2 boîtes de Pétri contenant un milieu Potato Dextrose Agar (PDA) additionné d'ampicilline, un antibiotique antibactérien, et recouvertes d'un filtre en papier. Les deux boîtes sont placées dans une cage à oiseaux (type Vario) fixée à au moins 4 m de hauteur dans la couronne de l'arbre (Fig. 3, Fig. 4 et Fig. 5). L'objectif est de démontrer que la capture de spores aériennes de *Ceratocystis platani* est possible avec un filtre posé sur un milieu spécifique.



Figure 3 : Type de cage utilisée avec deux boîtes de Pétri avec un milieu PDA + Filtre (Photo Calmin G.).



Figure 4 : Cage mise en place dans un platane à Pré-Bois (Photo Calmin G).

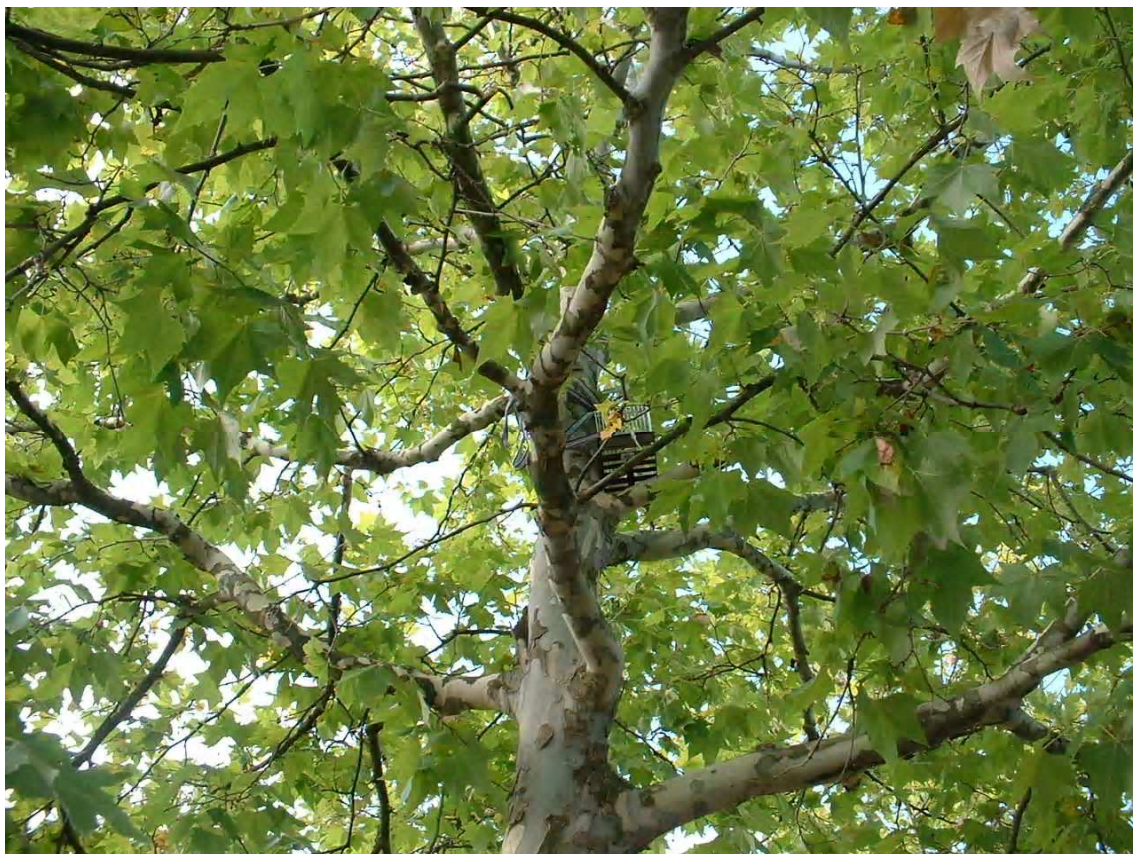


Figure 5 : Cage en place dans un platane (Photo Calmin G).



## Détection par biologie moléculaire

La deuxième étape a été le développement d'une méthode de détection du champignon à partir du filtre.

Les filtres exposés à l'air environnant collectent, bien sûr, toutes sortes de bactéries et spores fongiques. Si les bactéries ne peuvent se développer, les spores fongiques de toutes espèces peuvent, elles, germer et développer des colonies sur ces filtres.

A partir de 2008, un autre type de piège a été développé. Il s'agit d'un Rotorod, modifié pour être programmable.

Le Rotorod est constitué d'un bloc contenant un moteur électrique sur lequel tourne un axe à la vitesse de 2 600 tours/min. L'axe porte une barre perpendiculaire sur laquelle sont installées des barrettes rétractables en plastique. Ces barrettes, enduites de silicone, permettent de collecter les spores dans l'environnement. Ces nouveaux pièges sont actuellement utilisés en milieu fermé dans la halle de réception et transformation des bois de taille de platane, chez Serbeco, à Genève, et par le Service des espaces verts de la Ville de Lausanne pour un suivi du chancre sur le territoire de Lausanne.



Figure 6 : Le Rotorod et sa batterie (à gauche). Vue de détail d'une baguette en rotation (à droite). Photos S. Ingold.

### Développement d'un test moléculaire :

Il faut pouvoir discriminer ce qui est *Ceratocystis platani* de ce qui ne l'est pas. A cette fin, une technique de biologie moléculaire a été développée. Elle consiste en l'amplification par la réaction de la polymérase en chaîne (RCP) spécifique d'une partie d'un gène de *Ceratocystis platani*, le gène de la cérato-platanine, une toxine protéique impliquée dans la pathogénèse du champignon.

La méthode d'amplification développée est une méthode d'amplification quantitative en temps réel, qui permet une quantification du champignon détecté par rapport à un étalonnage réalisé en laboratoire. La méthode a d'abord été testée sur des concentrations connues d'ADN pur de *Ceratocystis platani* extrait de souches de références.

Les souches de référence utilisées ont été fournies par Dr Panaghiotis Tsopeles, Institut des Ecosystèmes Méditerranéens, Fondation Nationale de la Recherche Agronomique, Athènes, Grèce (souches C3 et C15) et Dr Santini, Institut de Pathologie Forestière, Centre National de la Recherche, Florence, Italie (souche IT).

L'étalonnage avait consisté à pratiquer des dépôts de spores en nombre connu sur des filtres identiques à ceux des pièges, à extraire l'ADN des filtres et à amplifier spécifiquement le gène de la cérato-platanine, à partir des extraits d'ADN de concentration connue.

Des amorces d'amplification spécifiques ont été développées à partir de la séquence ADN du gène de la cérato-platanine, spécifique à *Ceratocystis platani*.

>gi|38453647|emb|AJ311644.2|CFI311644 *Ceratocystis platani* gene for cerato-platanin, exon

5'

atgaagtctctatcctacccatgattgccagcggccatggccgtctcgatctcttatgaccctatctacg**cgctgacctg agcatgggacg**ctgtgcctgctccaacggcgatcatggccttatggcgagctaccctacactgggtgaagtccctggc tttcccaatgttggcgggtattcctgacatcgccggctgggactctccgagctgtggacttgctggaaggtcagattccc aacggaaacagcatctttatca**gggggtgtgacagtgagg**tgattcaacgtgaatcctactgccttactaaact gggtggcagcactgaagctggccgtgctgacaacgtcaattacgtgaggtcgcatttccaactgcattaacggcgct aattag

3'

Amorces d'amplification sens et antissens

CFP-1 : 5'-cgctgacctgagcatgggcagcg-3'

Tm 64.2

CFP-2 : 5'-ccacctctgccactgtcaacacccc-3'

Tm 64.2

La longueur du fragment amplifié est de 216 paires de bases.

Outre ces amorces d'amplification, deux sondes d'hybridation fluorescentes (Fig.6), reconnaissant une zone interne du gène de la cérato-platanine ont été développées. Ces sondes d'hybridation supplémentaires garantissent la résolution du résultat et suppriment toute possibilité de faux positifs; elles permettent, par conséquent, une quantification précise du pathogène.

927744	my <i>Ceratocystis fimbriata</i> f. sp. <i>platani</i> , gene for cerato-platanin		AJ311644	Tm
CFP-1	CgCTgACCTgAgCATgggCAgCg	S	72-94	72,9°C
CFP F	ACCTgAgCATgggCAgCg	S	77-94	62,6°C
CFP S	AACggCgATCATggCCTT	S	106-123	60,0°C
CFP-2	CCACCTCTgCCACTgTCAACACCCC	A	287-263	70,1°C
CFP R	TCTgCCACTgTCAACACCCC	A	282-263	60,9°C
CFP_FL	gggACTCTCCgAgCTgTggTACTTgCTgg-FL	S	197-225	71,6°C
CFP_LC	LC-ggTCACgATTCCCAACggAAACAgCATC-p	S	228-255	71,4°C

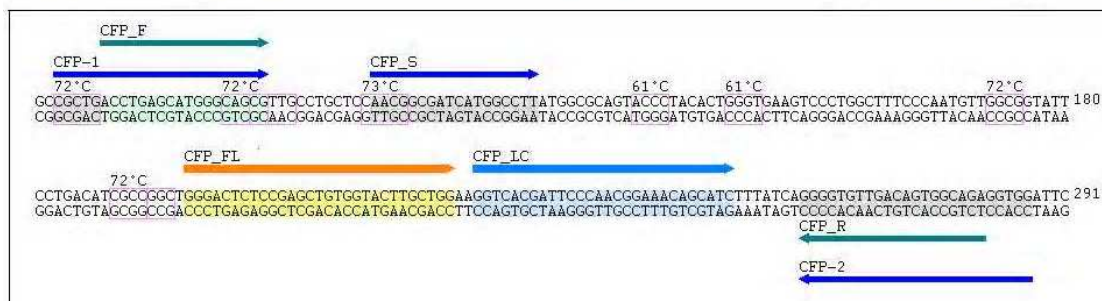


Figure 6 : Design des sondes d'hybridation

Cette méthode permet donc de détecter avec précision la présence de *Ceratocystis platani*, de quantifier ensuite ce qui est détecté en quantité d'ADN (Fig 7) et par inférence à partir de la courbe d'étalonnage en nombres de spores présentes sur le filtre.

La limite de détection de l'ADN par la RCP en temps réel a été atteinte pour une concentration de 6 pg, ce qui correspond à une limite de détection d'environ 15 noyaux haploïdes, donc 15 spores de type conidie.

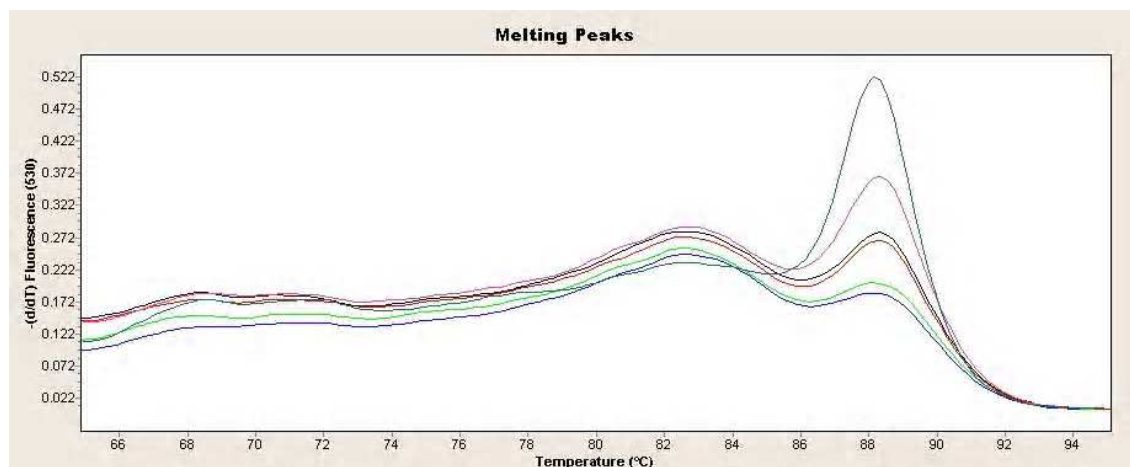


Figure 7 : Pics de température de fusion des produits RCP en fonction de la concentration d'ADN (de 1.8 pg à 40 pg)

Lors de la première campagne 2005-2006, les pièges ont été collectés tous les 15 jours, ce qui rend bien sûr toute inférence en terme nombre de spores impossible, car si quelques spores ont germé sur le milieu de culture, le mycélium s'est alors développé et la charge en *C. platani* peut alors apparaître importante du fait de cette croissance mycélienne.

- Cette méthode a d'abord été utilisée sur trois sites du Canton de Genève :
- Parking P +R à Pré-Bois (Vernier), site historiquement contaminé
  - Quai du pont du Mont Blanc (Genève)
  - Place Eglise Anglaise (Genève)

Ce sont des sites où l'abattage de platanes infectés a été effectué récemment (parking P +R à Pré-Bois) ou proche de sites infectés sur lesquels n'existent plus de platanes (place des Alpes).

Le site de Pré-Bois est un site historiquement infecté par *Ceratocystis platani*. Certains platanes de ce site ont été abattus le 24 juillet 2003 après la découverte des symptômes de la maladie sur l'un des arbres. Les sites de l'Eglise Anglaise et du quai du Mont Blanc, se situent à proximité de la place des Alpes où 14 platanes ont été abattus entre le 7 et le 11 février 2005, alors que la maladie avait été découverte en 2002.

Les pièges ont été placés dès la fin août 2005. Un prélèvement régulier des boîtes de Pétri a été effectué toutes les deux semaines, pendant une première période, du 23 août 2005 au 28 novembre 2005, ce qui a produit 6 récoltes de filtres. En 2006, 6 récoltes ont été réalisées entre le 2 juillet 2006 et le 27 septembre 2006. Une fois récoltés, les filtres ont été conservés à basse température (-80°C) en attendant leur utilisation pour l'extraction d'ADN.

Date de mise en place	Remarques
23/08/05	1 <sup>ère</sup> mise en place des pièges 2005
19/09/05	Disparition du piège sur le quai n°3
5/10/05	Disparition du piège sur le quai n°11
17/10/05	
31/10/05	
15/11/05	
28/11/05	Dernière collecte 2005
2/07/06	1 <sup>ère</sup> mise n place des pièges 2006
17/07/06	
27/07/06	
14/08/06	Disparition de l'échelle de Pré-bois
28/08/06	Impossibilité récolte et mise en place à PB (échelle)
11/09/06	Récolte de PB du 14/08/06, disparition piège PB 4
27/09/06	Dernière collecte 2006

Tableau 1 : Date de mise en place des boîtes de Pétri dans les cages

Nom du piège	Emplacement Positionnement GPS	Hauteur du piège par rapport au sol en cm
Eglise 1	500272.37/118207.79m	530
Eglise 2	500267.95/118203.37m	500
Eglise 3	500254.69/118222.38m	540
Quai 1	500568.69/118329.91m	430
Quai 2	500587.91/118355.43m	430
Quai 3	500608.80/118381.62m	440
Quai 4	500634.5/118413.34m	380
Quai 5	500646.88/118428.37m	470
Quai 6	500660.14/118444.28m	380
Quai 7	500665.44/118451.79m	420
Quai 8	500678.26/118467.7m	470
Quai 9	500697.82/118490.68m	440
Quai 10	500715.38/11851.32m	450
Quai 11	500728.20/118530.59m	440
Pré Bois 1	496455.95/119914.22m	500
Pré Bois 2	496444.79/119900.41m	500
Pré Bois 3	496457.01/119888.72m	360
Pré Bois 4	496469.22/119903.06m	360
Pré Bois 5	496366.70/119954.59m	370
Pré Bois 6	496333.24/119936.00m	400

Tableau 2 : Descriptif des pièges (positionnement GPS, hauteur par rapport au sol)

### Résumé des étapes du protocole utilisé :

- Réalisation des pièges (milieu PDA + ampicilline)
- Mise en place des pièges à spores dans les platanes

- Collecte des pièges tous les 15 jours
- Stockage des filtres récupérés sur les pièges au congélateur
- Lavage des filtres
- Extraction d'ADN des concentrés de lavage
- Dosage de l'ADN obtenu après extraction
- Amplification en temps réel
- Analyse des résultats

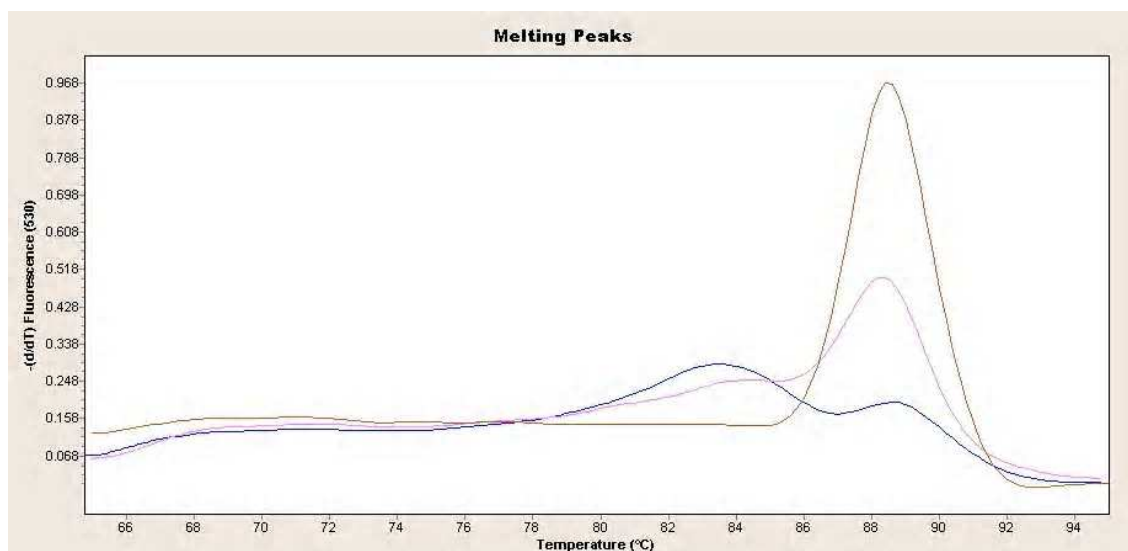


Fig. 8 : Exemple de résultat positif : Piège No9 quai du Mont-Blanc, pour la période 5 octobre au 16 octobre. On observe un pic intermédiaire entre le témoin positif et la ligne de base du témoin négatif. Ce pic correspond à une détection positive du champignon.

Les résultats obtenus sur 2 campagnes, en 2005 et 2006, ont montré que cette méthode permettait la détection de *Ceratocystis platani* sur les pièges aériens déposés dans les platanes.

Si de nombreux pièges se sont révélés au moins une fois positifs sur les sites de Pré-Bois et du quai du Mont-Blanc, aucun des 3 pièges de l'Eglise Anglaise n'a jamais été positif. En 2005, sur 6 récoltes totalisant 111 pièges, 34 pièges se sont révélés positifs avec un pic de 11 pièges sur un total de 20 pièges, pour la période 18 septembre au 3 octobre 2005, et 9 pièges sur 20 pièges, pour la période du 4 octobre 2005 au 16 octobre 2005.

Totalement il y a eu au moins un piège positif lors de 7 récoltes sur 12 récoltes au total. Cinq récoltes étaient positives en 2005.

En 2006, seuls 4 pièges sur 108 se sont révélés positifs lors de 2 récoltes sur 6 récoltes au total.

Nous avons pu détecter, en 2005, une forte présence de spores entre le 18 septembre et le 16 octobre, alors qu'en 2006, la présence du chancre coloré dans les pièges est très mineure.

Date Nom du piège	23/8/5 au 17/9/5	18/9/5 au 03/10/05	04/10/5 au 16/10/5	17/10/5 au 30/10/5	31/10/5 au 14/11/5	15/11/5 au 28/11/5	02/07/6 au 16/07/6	17/07/6 au 26/07/6	27/07/6 au 13/08/6	14/08/6 au 27/08/6	28/08/6 au 10/09/6	11/09/6 au 26/09/6	Nombre d'échantillons positifs
Eglise 1													0
Eglise 2													0
Eglise 3													0
Quai 1													0
Quai 2		+	+	+		+							4
Quai 3		+	volé										1
Quai 4		+	+			+							3
Quai 5		+	+			+							3
Quai 6		+	+										2
Quai 7		+			+								2
Quai 8			+							+			2
Quai 9		+	+			+				+			4
Quai 10						+				+			2
Quai 11		volé											0
Pré Bois 1			+	+			+						3
Pré Bois 2			+	+									2
Pré Bois 3		+		+	+								3
Pré Bois 4		+		+	+								3
Pré Bois 5		+	+										2
Pré Bois 6		+				+							2
<b>Total</b>		<b>11</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>1</b>			<b>3</b>			<b>38</b>

Tableau 3 : Résultats pour les 2 campagnes de collecte de pièges en 2005 et 2006

Si l'on rapporte ces dates aux données climatologiques locales, enregistrées par la station météorologique la plus proche, c'est-à-dire celle de l'aéroport, on s'aperçoit qu'en général ces détections positives correspondent à des températures supérieures à 11 degrés sauf, pour 2 d'entre elles, et à des taux d'humidité moyenne supérieurs à 69%.

Les deux exceptions sont :

- période du 31/10/05 au 14/11/05 avec 3 pièges positifs (1 au quai du Mont-Blanc, 2 à Pré bois),
- période du 15/11/5 au 27/11/05 avec 6 pièges positifs (5 au quai du Mont-Blanc, 1 à Pré bois),

Date	température moyenne	humidité moyenne	précipitation moyenne
18/9/5 au 3/10/05	13.2	74.31	1.49
4/10/05 au 16/10/05	11.55	81.46	0.09
17/10/05 au 30/10/05	12.021	83.43	2.93
31/10/05 au 14/11/05	8.86	84.27	1.77
15/11/5 au 27/11/05	1.5	69.46	0.12
2/07/06 au 16/07/06	22.22	69.4	2.413
14/08/06 au 27/08/06	17.257	72.1	3.714
Moyenne	12.3	76.3	1.7

Bien sûr, les enregistrements de la station de l'aéroport donnent une idée du climat à ces différentes époques, mais pas une idée précise du microclimat sur les sites et dans les couronnes des platanes; ce sont aussi des moyennes sur 14 ou 15 jours et les pics de températures compatibles avec la germination des spores n'apparaissent donc pas.

### Suites données à ces premiers travaux pour la campagne de piégeage 2007-2009 et la campagne 2009-2011

Le test moléculaire a été modifié pour en augmenter la spécificité. Il s'agit maintenant d'une double amplification, la première, vérifiant la présence d'ADN fongique et la deuxième, amplifiant spécifiquement le chancre coloré s'il est présent.

De nouveaux pièges ont été installés sur un territoire plus vaste (Genève, Carouge, Plan-les-Ouates, Vernier, Meyrin et Jussy), de 2007 à 2009. Les pièges ont été recentrés sur une zone plus restreinte, pour 2009-2011, afin de chercher à identifier de possibles arbres malades.

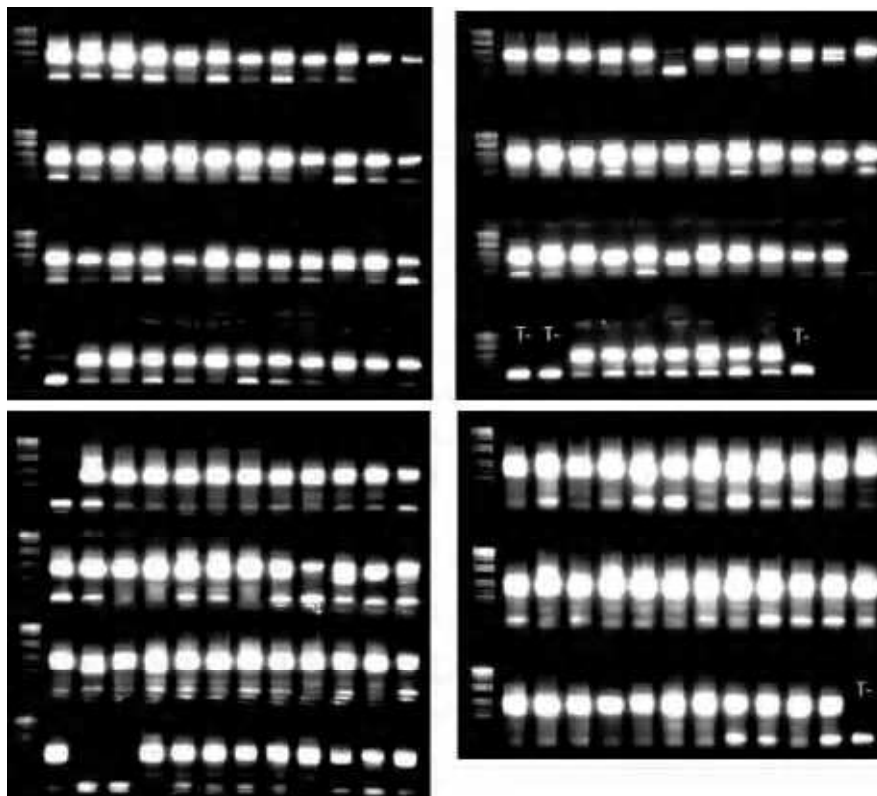
Un équipement complémentaire a été installé sur le toit de la buvette des Pâquis pour collecter les spores dans l'air; il s'agit d'un cyclone (Fig.9), aspirant les spores en continu.



**Fig.9 : Cyclone**

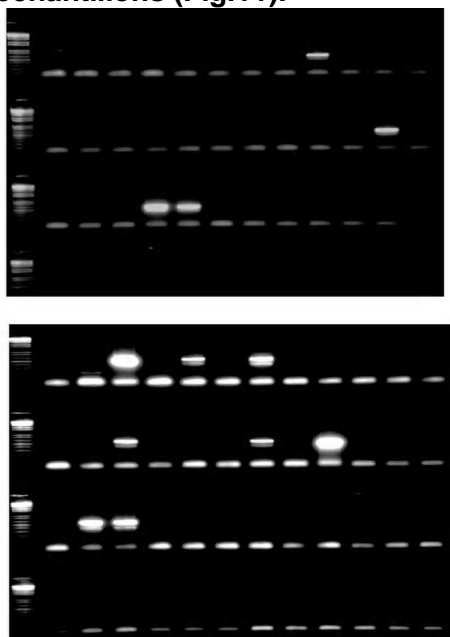
La nouvelle méthode visant l'espaceur transcrit interne de l'ARN ribosomal du champignon se passe en 2 étapes.

La première est la vérification de la présence d'ADN dans les échantillons collectés (Fig 10.) :



**Fig. 10. Vérification de la présence d'ADN fongique amplifiable dans les échantillons**

La deuxième vise la recherche spécifique du chancre coloré dans ces mêmes échantillons (Fig.11).



**Fig. 11. Mise en évidence d'échantillons positifs au chancre coloré**



Ce suivi a donné les résultats suivants, depuis 2007 jusqu'à fin avril 2009, compilés dans la figure 12. Sur cette période, 41 pièges sur 1038 pièges ont été détectés positifs et certains pièges l'ont été jusqu'à six fois comme le piège PLO15.

Pièges	2007	2008	2009	Total
SEVE1	1	1		2
SEVE2	3	1		4
SEVE3				
SEVE4		2		2
SEVE5	1	2		3
SEVE6		1		1
SEVE7	2	2		4
DNP_8		2	1	3
DNP_9		3		3
DNP_16				
Mey10	2			2
Mey11	2	1		3
L	2			2
PLO14	1	1		2
PLO15	2	4		6
Ca12			1	1
Ca13				
Vernier		1		1
Cyclone		1		1

Fig.12. Compilation des résultats positifs d'août 2005 à avril 2009

## Conclusion

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé une méthode de suivi environnemental pour le champignon responsable de la maladie du chancre coloré, pour en faire, après quelques années d'expérience, une méthode validée de suivi environnemental du chancre coloré. Si une technique similaire de piégeage avait déjà été utilisée pour un champignon pathogène d'arbres forestiers (SCHWEIGKOFER et al., 2004), c'est la première fois qu'une telle méthode est appliquée sur de longues périodes pour un réel suivi, en espaces verts urbains.

Nous avons développé également un test diagnostique spécifique de *Ceratocystis platani* basé sur la méthode de l'amplification par la réaction en chaîne de la polymérase dans sa version quantitative en temps réel. Ce test nous a permis de valider notre méthode de piégeage, mais il est naturellement utilisable à partir de toute source de matériel suspecté d'être contaminé (bois, feuille, eau, sol ou insecte). Des tests préliminaires ont d'ailleurs été effectués sur du bois infecté et sur des tiges du platane.

Le test moléculaire est aussi bien adapté au piégeage sur boîte de Péri qu'au piégeage par baguettes rotatives ou aux échantillons du cyclone.

En conclusion on peut dire que *Ceratocystis platani* a été présent lors de plusieurs périodes au cours des printemps, étés et des cinq dernières années, et qu'il est donc présent en permanence sur le territoire du canton, mais aucun arbre malade n'a été découvert sur ces sites pendant ces mêmes périodes.

A la date du 31 octobre 2009, aucun arbre malade n'a été détecté sur le territoire du Canton de Genève. Pour ce qui est des cas les plus proches et les plus récents, un cas d'arbres infectés a été décrit entre Annecy et Chambéry en 2007 et un arbre mort a été détecté positif sur la commune de Gex en 2009. Dans ce dernier cas, l'arbre mort et aussi deux sujets apparemment sains à proximité du premier ont été abattus en septembre 2009. Les arbres abattus ne présentaient pas les symptômes internes typiques du chancre.

Le fait de détecter des pièges positifs en l'absence d'arbres symptomatiques, comme celui de détecter des pièges positifs à des températures plus basses que celle considérée minimale pour une croissance du champignon, posent plusieurs nouvelles questions.

Les spores proviennent-elles d'arbres asymptomatiques présents sur les sites de piégeage ?

Proviennent-elles d'arbres asymptomatiques ou d'arbres malades non repérés proches des sites de piégeage ou situés dans le couloir des vents dominants ?

Sont-elles amenées par les vents du sud lors d'événements climatiques ? Si c'était le cas, comment expliquer que les pièges de l'Eglise Anglaise soient restés négatifs tout au long des périodes de prélèvement ?

Le champignon survit-il seulement en saprophytes sur des débris végétaux ou alors infecte-t-il d'autres plantes hôtes qui ne sont pas connues et sur lesquelles l'infection passerait inaperçue ??

La disponibilité en un nouvel outil performant permet maintenant de répondre à ces questions et une nouvelle campagne d'expérimentations sur 2 ans (2009-2011) vient d'être lancée avec l'installation d'une vingtaine de pièges et d'un cyclone aspirateur d'air, sur un territoire plus réduit, recentré dans les zones ayant donné le plus grand nombre de tests positifs.

Remerciements : Ce travail a été effectué depuis 2005 avec l'aide des personnes suivantes : Didier Weyland, Gautier Calmin, Lassaad Belbahri, Patricia Zryd, Romain Chablais, Romain Gilodi, Cynthia Vouant, Jérôme Weber et Julien Crovadore. Il a été rendu possible grâce au soutien du Service de la conservation du patrimoine arboré, Direction générale de la nature et du paysage, Département du territoire, Canton et République de Genève et à l'aide des Service des espaces verts des villes de Carouge, Genève, Meyrin, Plan les Ouates et Vernier.

### **Quelques références :**

BOLAY A, GIOVANNI M, La maladie du chancre coloré du platane en Suisse, Revue Horticole Suisse 61(3), (1988), 77-86.

ENGELBRECHT C-J-B, HARRINGTON J, Intersterility and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore, Mycologia 97, (2005), 57-59.

EPPO, EPPO Data sheets on quarantine organisms, Bulletin 16, (1986), 21-24.

GROSCLAUDE C, OLIVIER R, PIZZUTO J-C, ROMITI C, MADEC S, Détection par piégeage du *Ceratocystis fimbriata f.sp.platani*. Application à l'étude de la persistance du parasite dans du bois infecté, *European journal of Forest Pathology* 18, (1988), 385-390.

ITON E.F, Studies on a wilt disease of cacao at River Estate, Some aspects of wind transmission, *Annual Report on Cacao Research*, (1960), 47-48.

PAULIN-MAHADY A-E, HARRINGTON T-C, McNEW D, Phylogenetic and taxonomic evaluation of Chalara, Chalaropsis, and Thielaviopsis anamorphs associated with Ceratocystis, *Mycologia* 94 (1), (2002), 62-72.

SCHWEIGKOFER W, O'DONNELL K, GARBELOTTO M, Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time approach combined with a simple spore trapping method, *Applied and Environmental Microbiology*, (2004), 3512-3520.

WALTER J, REX E, SCHREIBER R, The rate of progress and destructiveness of canker stain of plane trees, *Phytopathology* 42, (1952), 236-239.