

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université ABDERRAHMANE MIRA de Bejaia**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Microbiologie**

## MÉMOIRE DE FIN DE CYCLE

*En vue de l'obtention de diplôme d'ingénieur d'état en génie biologique*

### THÈME

**Etude de la résistance aux fongicides et de l'agressivité  
des souches de *Botrytis cinerea* sur tomate**

**Réalisé par :**

**HIDJA Lynda**  
**IRID Soraya**

**Jury:**

**President: Mr BELHADI. D**

**Examineur: Mr BEN SAID. A/K**

**Promoteur: Mr AISSAT. K**

**Co-Promoteur: Mr ADJEBLI. A**

**Promotion: 2011 / 2012**

# Remerciements

*« Tout d'abord on remercie le Bon Dieu pour sa  
Bienveillance »*

*Notre profonde gratitude va :*

*A notre promoteur Mr. Aissat. K pour avoir accepté de nous encadrer, ses efforts pour nous aider nous orienter, nous conseiller et pour son entière disponibilité. Ses qualités personnelles et professionnelles resteront pour nous une immense source d'enrichissement à tous les points de vue. Qu'il trouve ici le témoignage de notre entière admiration et notre reconnaissance.*

*A notre co-promoteur Mr Adjebli. A pour avoir accepté d'initier à ce travail, pour son orientation, sa confiance, ses conseils et son aide précieux en mettant tous les moyens nécessaires à notre disposition et dont on gardera le souvenir de ses grandes qualités humaines.*

*A Mlle Benfedala. S pour son suivi, ses précieux conseils et pour la confiance placée en nous.*

*Nos remerciements s'adressent également à Mr Belhadi d'avoir accepté de présider le jury et Mr Ben said pour avoir accepté d'examiner cet humble travail.*

*Un grand merci à toute personne ayant contribué à l'accomplissement de ce modeste travail.*

*Merci*

# *D*édicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents que je remercie infiniment pour leur encouragement, leur soutien, leurs précieux conseils et leurs efforts pour mon éducation et ma réussite.*

*Cher Azedine pour ses encouragements, son soutien et ses précieux conseils.*

*Ma très chère grand- mère Fatima.*

*Mes chères sœurs : Sonia, Samira et Nawal.*

*Mes frères : Omar, ouahab et mon petit mimih.*

*Mon très cher neveu Ryad.*

*A ma copine, binôme Soraya et à toute sa famille.*

*A toute ma famille et à tous mes amis (es).*

*Lynda*

# *D*edicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents que je remercie infiniment pour leur encouragement, leur soutien, leur précieux conseils et leur efforts pour mon éducation et ma réussite, merci pour vous, que dieu vous garde.*

*A la mémoire de mon oncle Mustapha et grand père Hadi.*

*Mes grands parents.*

*Ma chère sœur: Sara.*

*Mes frères : Lyes et Jugurtha.*

*Mes oncles et tantes surtout Ahlem , Naima et Hanifa.*

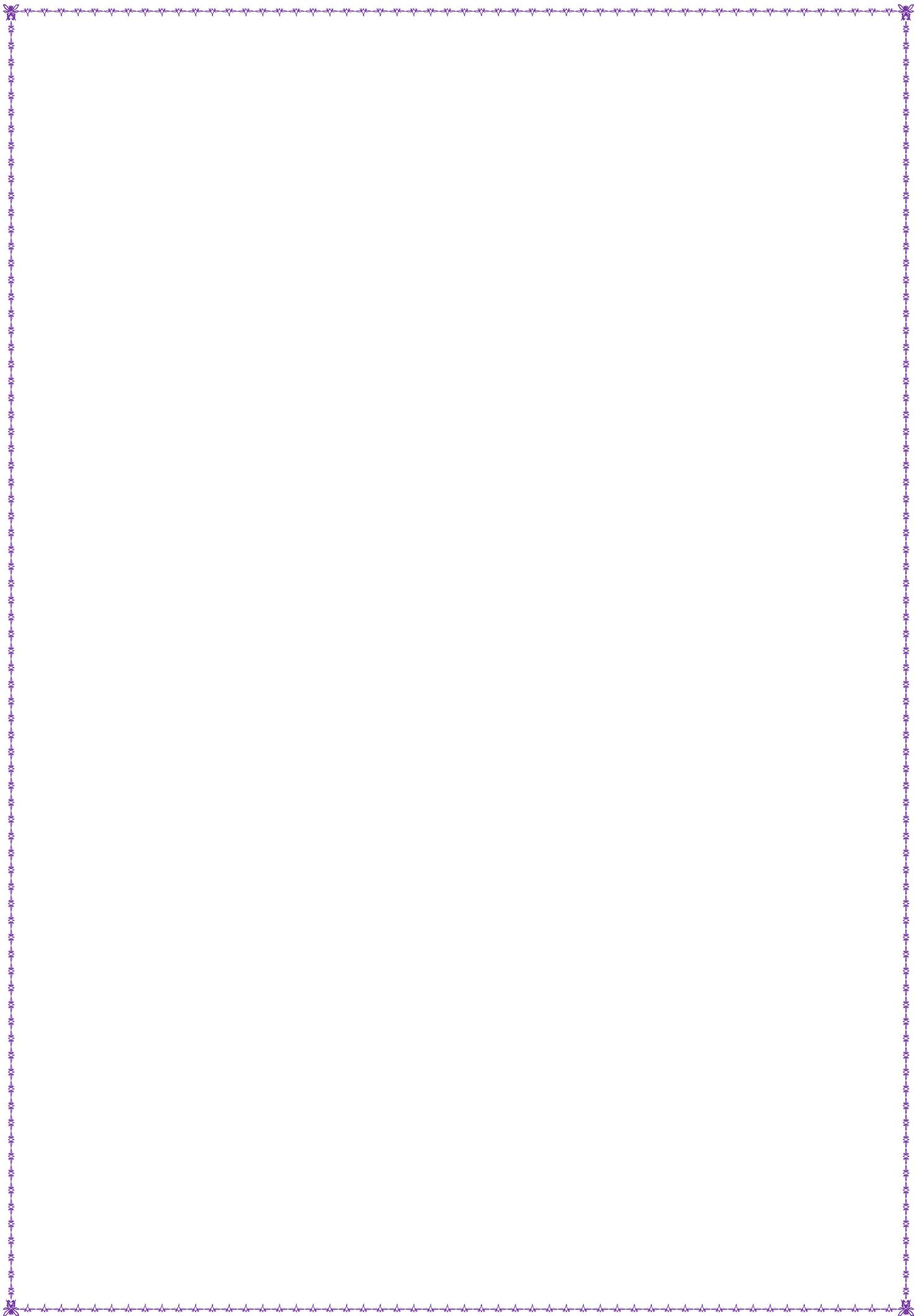
*Ma chère petite Malak,*

*Hamza et Saadi qui m'ont aidé durant mon travail.*

*Ma binôme Lynda et sa famille.*

*A toute ma famille et à tous mes amis (es).*

*Soraya*



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b> Classification de <i>B. cinerea</i> selon le mode de reproduction .....	2
<b>Tableau II.</b> Classification morphologique de <i>B. cinerea</i> sur milieu Malt-Agar.....	8
<b>Tableau III.</b> Exemple de produits de lutte biologique commercialisés dans le monde pour la lutte contre <i>B. cinerea</i> .....	18
<b>Tableau IV.</b> Les différentes souches utilisées et leur origine.....	20
<b>Tableau V.</b> Les différents fongicides.....	20
<b>Tableau VI.</b> La gamme de concentrations utilisées pour le test de croissance mycélienne et de germination.....	21
<b>Tableau VII.</b> Effet des fongicides sur la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> ...	29
<b>Tableau VIII.</b> Effet des fongicides sur la germination des spores de <i>B. cinerea</i> .....	30

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Dégâts causés par <i>B. cinerea</i> sur les différents organes de tomate.....	5
<b>Figure 2.</b> Cycle de développement de <i>B. cinerea</i> sur différentes cultures.....	7
<b>Figure 3.</b> Mode d'action des fongicides systémiques et de contact.....	13
<b>Figure 4.</b> Sites d'action des différentes familles de fongicides anti- <i>Botrytis</i> .....	16
<b>Figure 5.</b> Test de fongicide sur la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> .....	22
<b>Figure 6.</b> Préparation de la suspension sporale.....	23
<b>Figure 7.</b> Test de fongicides sur germination.....	24
<b>Figure 8.</b> Test d'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> sur folioles de tomate.....	26
<b>Figure 9.</b> Croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> en présence de trois fongicides.....	28
<b>Figure 10.</b> Les lésions causées par les cinq souches de <i>B. cinerea</i> sur folioles de tomate à 96h.....	31
<b>Figure 11.</b> Agressivité de souches de <i>B. cinerea</i> sur folioles de tomate (mm <sup>2</sup> ).....	31
<b>Figure 12.</b> Agressivité de souches de <i>B. cinerea</i> sur folioles de tomate.....	32
<b>Figure 13.</b> Agressivité de souches de <i>B. cinerea</i> sur folioles de tomate.....	32

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

**PDA:** Bouillon nutritif préparé à base de pomme de terre (pomme de Terre d'e

**INRA :** Institut National de la Recherche Agronomie.

**AUDPC:** Area Under the Disease Progress Curves.

**GA:** Gélose Agar.

**BC :** *Botrytis cinerea*

**Alg:** Algérie.

**Anova :** Analysis of variance.

**IC50 :** Concentration inhibitrice 50% de la population.

**%I :** Pourcentage d'inhibition

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>I. Synthèse bibliographique</b>	
I.1. La pourriture grise.....	2
I.2. Agent causal.....	2
I.2.1. Systématique.....	2
I.2.2. Les facteurs favorisant le développement de <i>B. cinerea</i> .....	3
I.2.2.1. Les facteurs climatiques.....	3
I.2.2.2. Autres facteurs.....	3
I.3. Les principaux symptômes de la pourriture grise sur tomate.....	4
I.4. Epidémiologie et cycle de vie de <i>B. cinerea</i> .....	6
I.4.1. Cycle de vie de <i>B. cinerea</i> .....	6
I.4.2. Dissémination.....	7
<b>II. Diversité phénotypique et génétique de <i>B. cinerea</i></b> .....	8
II.1. Diversité phénotypique.....	8
II.1.1. Morphotypes.....	8
II.1.2. Sensibilité à la qualité de la lumière.....	9
II.1.3. Agressivité sur la plante.....	9
II.1.4. Exigences nutritives.....	9
II.1.5. Sensibilité aux fongicides.....	9
II.2. Diversité génétique.....	10
<b>III. Les moyens de lutte contre <i>B. cinerea</i></b> .....	10
III.1. Les mesures prophylactiques.....	10
III.2. La lutte chimique.....	11
III.2.1. Classification des fongicides.....	12
III.2.1.1. Suivant leur pénétration dans la plante.....	12

III.2.1.1.1. Les fongicides de contact.....	12
III.2.1.1.2. Les fongicides systémiques.....	13
III.2.1.2. Suivant leur mode d'action biochimique.....	14
III.3. La lutte biologique.....	17
III.3.1. Les agents de lutte biologique.....	17
III.3.2. Mécanismes d'action des agents de lutte biologique.....	17
III.4. La lutte intégrée.....	19
<b>IV. Matériels et méthodes.....</b>	<b>20</b>
IV.1. Matériel fongique.....	20
IV.2. Les fongicides.....	20
IV.2.1. Détermination des concentrations des fongicides.....	20
IV.3. Test des fongicides sur les souches de <i>B. Cinerea</i> .....	21
IV.3.1. Effet sur la croissance mycélienne.....	21
IV.3.2. Effet sur la germination .....	22
IV.4. Test d'agressivité sur folioles de tomate.....	25
<b>V. Résultats et discussion.....</b>	<b>28</b>
V.1. Résultats.....	28
V.1.1. Résultats de test des fongicides sur la croissance mycélienne.....	28
V.1.1. Résultats de test des fongicides sur la germination.....	29
V.1.2. Résultats de test de l'agressivité.....	30
V.2. Discussions.....	33
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>



# Introduction

La tomate est l'un des légumes les plus cultivés dans le monde. Une grande partie de la production pour le marché de frais est réalisée sous abris. Cette culture nécessite l'utilisation de beaucoup d'intrants particulièrement des fongicides, car les conditions de l'environnement sous serre favorisent l'apparition des maladies cryptogamiques diverses. Parmi ces maladies, *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise, est l'un des plus importants agents pathogènes de la tomate sous abris et cause des pertes considérables aux producteurs (Blancard, 2009).

La lutte chimique a constitué durant les décennies précédentes la méthode la plus utilisée, cependant des problèmes de résistance sont vite apparus (Leroux, 1995). L'inefficacité des fongicides est généralement attribuée à l'apparition de souches résistantes. Le maintien des souches résistantes paraît lié à leur capacité à survivre dans les conditions naturelles et à entrer en compétition avec les souches sensibles en termes de potentiel d'infection, de sporulation ou encore de dissémination. D'où l'intérêt des tests de l'agressivité des souches retenues dans les études de résistance.

Les travaux de recherches actuelles visent à comprendre le comportement des populations de *Botrytis cinerea* à différentes pressions de sélections. En effet ce champignon est particulièrement problématique en raison de sa capacité à développer des résistances vis-à-vis des fongicides. La résistance des souches de *Botrytis cinerea* aux fongicides est un axe développé dans le laboratoire de mycologie de l'université Bejaia en collaboration avec le laboratoire de mycologie de l'INRA d'Avignon France.

Ce travail est une contribution à la connaissance des souches algériennes. Il constitue la première étape d'un projet, en cours, entre l'INRA Avignon et le Laboratoire de d'Ecologie microbienne (LEM). Pour atteindre cet objectif, nous avons entrepris une étude sur l'impact de trois fongicides dont deux chimiques (Iprodione et Teldor) et l'autre biologique (Serenade) sur des souches de *B. cinerea* (ALG20, ALG295, ALG195, BC1 et BC142) issues de deux sites géographique différents (Algérie, Europe). La résistance a été réalisée *in vitro* sur la croissance mycélienne et sur la germination des spores. Une deuxième expérimentation a porté sur l'agressivité des cinq souches sur des folioles de tomates (*in vivo*). Ce travail a pour objectif de vérifier l'hypothèse suivante :

- Les souches de *B. cinerea* sont identiques en termes d'agressivité sur tomate et on le même niveau de résistance aux différents fongicides quel que soit le site d'isolement ?

## I.1. La pourriture grise

La pourriture grise est une maladie provoquée par le champignon *B. cinerea*, ce champignon provoque des dégâts économiques désastreux dans plusieurs cultures (Petit, 2008).

## I.2. Agent causal

*Botrytis cinerea* Pers: Fr. [téléomorphe: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzl], est un champignon phytopathogène attaquant principalement les parties aériennes des plantes hôtes (Williamson et al., 2007). Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante à plusieurs stades de sa croissance. Ce champignon peut attaquer les feuilles, les tiges et les fruits de plusieurs espèces de plantes d'importance économique. En effet, il attaque plus de 200 espèces de plantes, principalement les dicotylédones sous serre (Tomate, concombre, poivron, fraise, rose...) (Blancard et al., 2009)

Sur le plan économique, ce champignon est, par exemple, considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez et al., 2005).

### I.2.1 Systématique

*B. cinerea*, comme beaucoup d'autres champignons, présente une double classification et qui donne deux formes selon le tableau suivant (Ajouz, 2009):

- Forme parfaite (téléomorphe)
- Forme imparfaite (anamorphe)

**Tableaux I.** Classification de *B. cinerea* selon le mode de reproduction (Williamson, 2007).

Forme	Sexuée (forme parfaite)	Asexuée (forme imparfaite)
<b>Règne</b>	Fungi	Fungi
<b>Phylum</b>	Ascomycète	Deutéromycète
<b>Classe</b>	Discomycète	Hyphomycète
<b>Ordre</b>	Léotiale	Moniliale
<b>Famille</b>	Sclerotiniaceae	Moniliaceae
<b>Genre</b>	Botryotinia	Botrytis
<b>Espèce</b>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>

## **I.2.2. Les facteurs favorisant le développement de *Botrytis cinerea***

Différents facteurs d'origines extérieures ou dépendants de la plante interviennent dans les premiers stades d'infection, dans le développement de la maladie et dans la dissémination du champignon (Yuniset *al.*, 1990; Elad et Yunis, 1993).

### **I.2.2.1. Les facteurs climatiques :**

#### **❖ Température**

Dans la serre des températures comprises entre 17°C et 23°C est la condition propice aux attaques de *B. cinerea* (Blancard *et al.*, 2009).

D'après des études de (Shiraishi *et al.*, 1970), la température optimale pour la germination des conidies comprise entre 20 et 30°C. À des températures inférieures à 5°C et supérieures à 35°C, les spores de *B. cinerea* ne germent pas après 48 heures d'incubation.

Des études sont en cours de réalisation dans le laboratoire de mycologie en collaboration avec INRA d'Avignon sur la variabilité des souches en fonction de leur capacité à s'adapter aux températures élevées.

#### **❖ Hygrométrie**

L'hygrométrie optimise la croissance mycélienne et la sporulation se développent d'une manière plus rapide à 21°C, 94% d'humidité relative. (Thomas et Marois, 1986).

### **I.2.2.2. Autres facteurs :**

#### **❖ Fertilisation**

Les quantités d'engrais et la composition de la solution nutritive utilisée influencent la sensibilité de la plante hôte à la pourriture grise. Cependant, les résultats sont parfois contradictoires dans ce domaine (Dik et Wubben, 2004). Un taux d'azote élevé, par exemple, augmente la croissance des plantes et la densité du feuillage mais en même temps sa sensibilité à *B. cinerea* (Pitchay *et al.*, 2007).

En revanche, Lecompte *et al.*, 2010 ont constaté que l'expansion des lésions sur les tiges de tomates a diminué avec l'augmentation des niveaux de fertilisation azotée pour les isolats les plus agressives.

### ❖ La lumière

La lumière (l'intensité et la longueur d'onde) est un facteur important dans la protection des cultures sous serre, entre autre les UV, qui augmente la sporulation de *B. cinerea*. (Dik et Wubben, 2004).

La germination des conidies de *B. cinerea* se produit aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, pourvu qu'il y ait de l'eau et des nutriments en quantité suffisante (Blakeman, 1980).

La sporulation de *B. cinerea* est par contre dépendante de la qualité de la lumière reçue et surtout des UV (Nicot et al., 1996 ; Elad, 1997; West et al., 2000).

La production de spores sous un film sélectif filtrant les ultraviolets en boîte de Pétri représente 0,05% de la production de spores sous un film témoin non filtrant et ceci pendant plusieurs semaines après l'inoculation. Ceci démontre que l'absence des UV inhibe la sporulation plutôt que de la retarder (Nicot et al., 1996).

### ❖ L'irrigation

Le type d'irrigation peut également influencer sur le développement de la pourriture grise. Le développement de pourriture sur les tiges de la tomate survient dans l'irrigation par rigoles que dans l'irrigation goutte à goutte. Même constatation a été faite concernant la cinétique de l'évolution de l'infection et sa gravité (Aissat et al., 2008).

## I.3. Les principaux symptômes de la pourriture grise sur tomate :

En culture, *B. cinerea* attaque les feuilles, le pédoncule, les fleurs, les sépales, les fruits et les tiges sous forme d'une pourriture grise caractéristique. Il provoque la chute des fruits et la mort de la plante.

### ❖ Dégâts sur feuilles

Les folioles présentent fréquemment des taches circulaires et humides dans un premier temps. de teinte beigeâtre à brun clair, celles-ci révèlent aussi un aspect parcheminée laissent apparaître des arabesques concentriques (fig1 A). Elles évoluent rapidement et entraînent le dessèchement de secteurs importants du limbe. Ces altération peuvent donner lieu à une pourriture qui s'étend ensuite et finit par léser des feuilles entières, les tissus s'effondrant et se nécrosant progressivement. (Blancard et al., 2009).

❖ **Dégâts sur pétales**

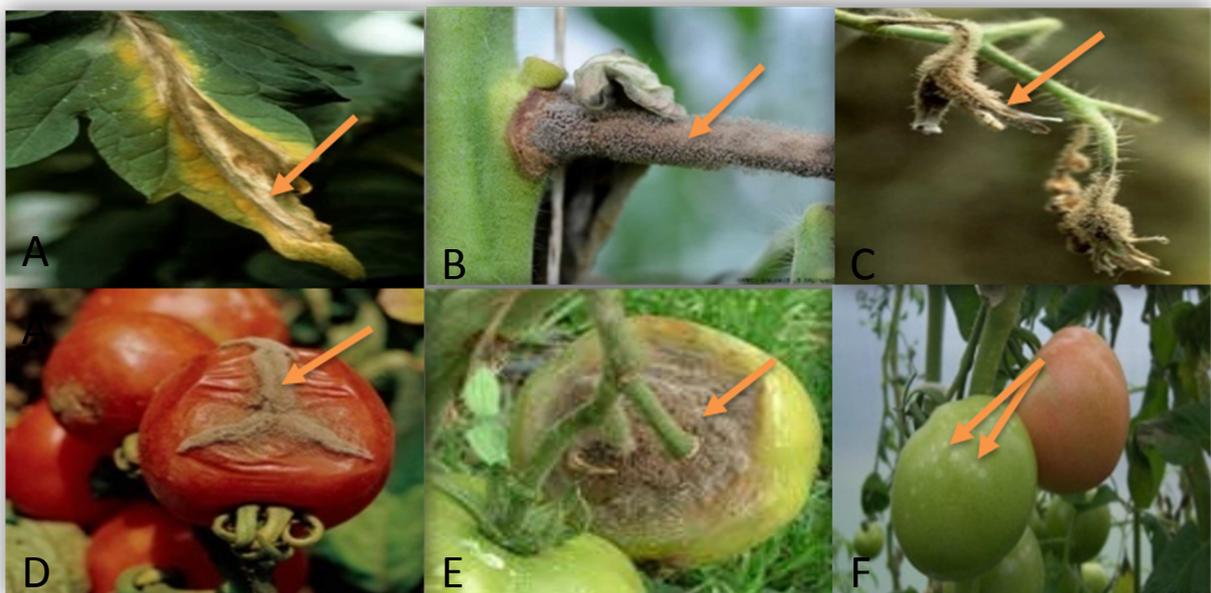
Les pétales sénescents permettent à *B.cinerea* de s'installer sur les inflorescences (**fig1 C**) et de les utiliser comme bases nutritives dans un premier temps, afin d'assurer les infections ultérieures sur folioles et sur fruits (**Blancard et al., 2009**).

❖ **Dégâts sur tiges**

Les symptômes se caractérisent par des chancres beiges, ils se développent progressivement sur la tige avec la formation des contours bien délimités et finissent par l'altération d'une partie ou la totalité de la tige (**fig1 B**), causant la mort de la plante (**Blancard et al., 2009**).

❖ **Dégâts sur fruits**

Les fruits verts, présentent de minces anneaux blanchâtres, de 2 à 10mm de diamètre, encerclant une minuscule lésion nécrotique centrale. ces anneaux sont dénommés : taches fantômes (ghoste spot) (**fig1F**), sont plutôt jaunâtres sur les fruits murs (**Blancard et al., 2009**). Le fruit peut présenter aussi une pourriture molle (**fig1 D, E,**) qui se développe le plus souvent à partir des pétales et sépales desséchées (**Blancard et al., 2009**).



**Figure 1.**Dégâts causé par *B. cinerea* sur les différents organes de tomate :

(A)Dégâts sur feuille, (B) Dégâts sur tiges,(C) Dégâts sur pétale, (D) et (E), Dégâts sur fruit, (F) des taches fantôme sur fruit (**Blancard et al., 2009**).

## **I.4. Epidémiologie et cycle de vie de *B. cinerea***

### **I.4.1. Cycle de vie de *B. cinerea***

*B. cinerea* passe l'hiver dans le sol et dans des débris de culture sous la forme de mycélium ou de sclérotés. Ces petits organes noirs, durs et de forme irrégulière, sont considérés comme étant le principal moyen de survie à long terme du champignon (**Amselem et al., 2011**).

Pour la phase asexuée, des conidiophores grisâtres produisent des spores (conidies) par mitose lorsque les conditions sont favorables, les conidiophores libèrent les conidies dans l'air (**Petit, 2008**). Une fois les conidies installées sur un tissu végétal blessé ou sénescant avec des conditions d'hygrométrie et de températures favorables, un mycélium cloisonné se développe et colonise les tissus. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des conidiophores et le cycle est relancé (**Williamson et al., 2007**).

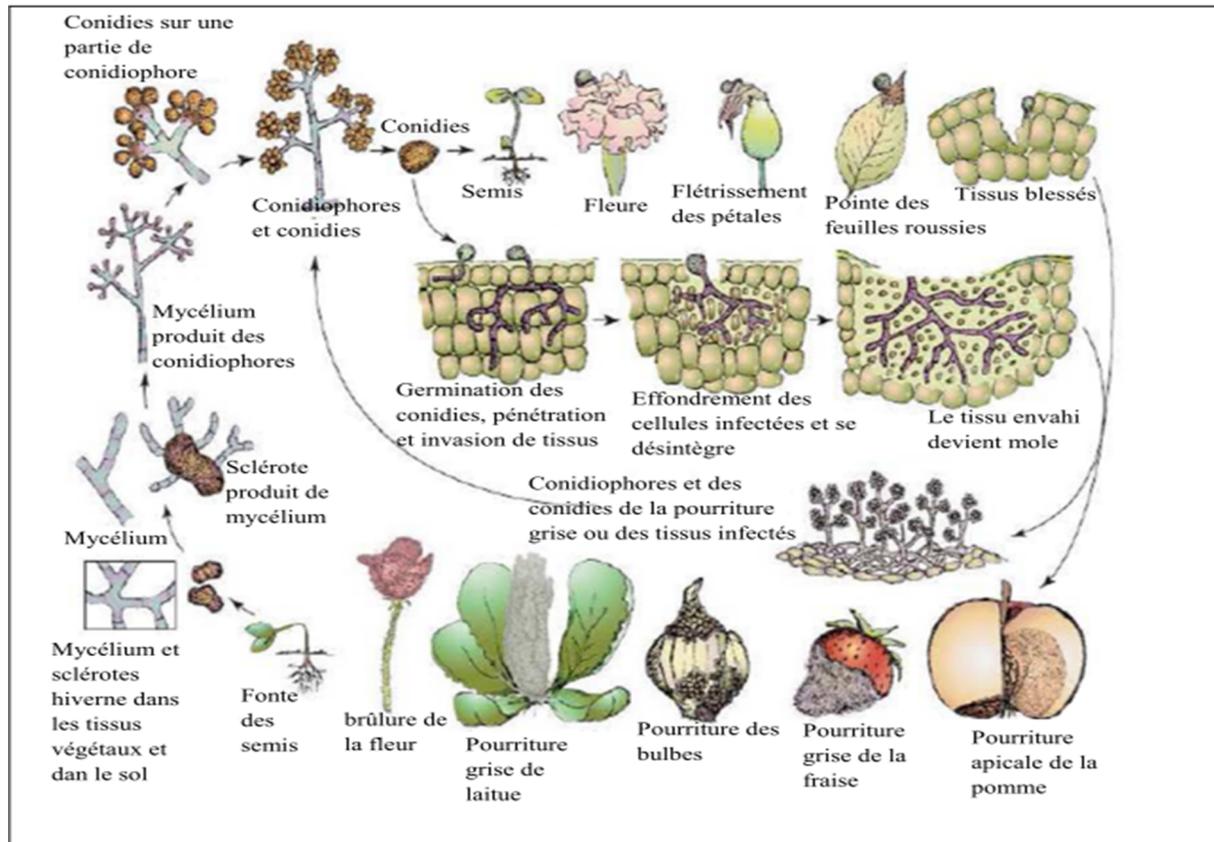
En début de matinée, une diminution rapide de l'humidité couplée à une augmentation de température entraîne une torsion et un dessèchement des conidiophores qui éjectent alors les conidies dans l'air. Les gouttes d'eau peuvent également jouer un rôle dans la dispersion des conidies (**Williamson et al., 2007**), de même pour les insectes (**Holz et al., 2004**).

L'adhésion et la germination d'une spore à la surface d'une plante hôte sont des étapes essentielles qui précèdent la pénétration et la colonisation des tissus (**Doehlemann et al., 2006**). Leur durée de vie au champ est faible et dépend de conditions biotiques et abiotiques telles que la température, l'humidité et l'exposition à la lumière (**Elad et al., 2004**).

Lorsque les conditions environnementales sont particulièrement défavorables au champignon, un autre type de spores est produit, les micro-conidies. Elles interviennent dans le processus de reproduction sexuée (**Messiaen et al., 1991**). Ces organes de fructification libèrent par la suite des ascus contenant huit ascospores binucléées (**Williamson et al., 2007**).

Toutefois, l'existence de ces apothécies au champ n'a été que très rarement observée (**Martinez et al., 2008**). La reproduction sexuée a surtout été observée en laboratoire lorsque les conditions de croissance étaient défavorables.

Le processus infectieux de *B. cinerea* se décompose en plusieurs étapes : la pénétration de la plante hôte, la formation de lésions primaires, l'expansion des lésions et la macération des tissus puis la sporulation (**Van Kan, 2006**). Au cours d'une saison, plusieurs cycles peuvent être accomplis : la maladie est dite polycyclique (**Williamson et al., 2007**).



**Figure 2.** Cycle de développement (reproduction asexuée) de *B. cinerea* sur différentes cultures (Agrios, 2005).

### I.4.2 Dissémination

La dispersion des spores du *B. cinerea* est assurée par plusieurs facteurs:

- ❖ **Le vent:** C'est un facteur très important, il assure la dispersion des spores à distances proportionnelles à la vitesse du courant (Holz et al., 2007).
- ❖ **L'eau:** Elle joue un rôle important dans la dissémination des spores. La chute d'une goutte d'eau avec une vitesse de 4 m/s assure une dispersion des spores à une distance de plusieurs mètres carrés (Corbaz, 1994).
- ❖ **Les insectes :** L'exemple des abeilles, qui en butinant transportent des spores de champignons des fleurs atteintes aux saines (Holz et al., 2007).
- ❖ **L'homme:** La dissémination par l'homme est généralement liée aux manques d'hygiène. La dispersion par les outils ou par le manque de soin (Agrios, 2005).

## II. Diversité phénotypique et génétique de *B. cinerea*

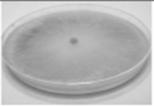
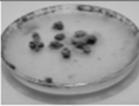
*B. cinerea* est un champignon présentant une diversité phénotypique pour sa morphologie sur milieu de culture, sa capacité à produire des conidies selon la qualité de la lumière, ses exigences nutritives, son agressivité sur la plante ou sa sensibilité aux fongicides. Il présente également une forte diversité génétique (Ajouz, 2009).

### II.1. Diversité phénotypique

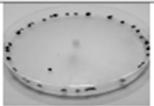
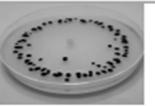
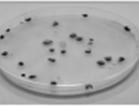
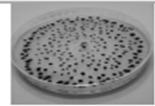
#### II.1.1. Morphotypes

D'après les études de Martinez *et al.*, (2003), la diversité morphologique des souches de *B. cinerea* sur milieu artificiel gélosé Malt-Agar est déterminée par une classification visuelle en huit morphotypes différents dont quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre sclérotiens (Tableau II).

**Tableau II.** Classification morphologique de *B. cinerea* sur milieu Malt-Agar (Martinez *et al.*, 2003).

Type Mycélien "M"				
Representation				
<b>Phenotype</b>	<b>M 1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense
Sporulation <sup>(1)</sup>	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés <sup>(2)</sup>	0	0	0	0

Type Sclérotien "S"				
Representation				
<b>Phenotype</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant
Sporulation <sup>(1)</sup>	1	1	1	0
Sclérotés <sup>(2)</sup>	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillés	Nombreux, petits et éparpillés

<sup>1</sup> Sporulation : 0: absence; 1: sporulation peu abondante; 2: sporulation très abondante

<sup>2</sup> Sclérotés : 0: absence; 1: rares; 2: très abondantes

### II.1.2. Sensibilité à la qualité de la lumière

Plusieurs études ont mis en évidence que les ultraviolets proches (300 à 400 nm) stimulent la production de spores alors que les infra rouges (> 720 nm) inhibent la sporulation chez *B. cinerea* (Epton et Richmond, 1980; Jarvis, 1992). Il existe des isolats capables de sporuler en absence de rayonnements ultraviolets (Nicot et al., 1996). Certains isolats sont même capables de sporuler à l'obscurité (Thomas et Marois, 1986 ; Steward et Long, 1987; Dik et Wubben, 2004).

### II.1.3. Agressivité sur la plante

En phytopathologie, l'agressivité est la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte donné et à causer une maladie (Andanson, 2010). L'ensemble des souches de *B. cinerea* ne présentent pas le même niveau d'agressivité sur une même plante hôte. Par exemple, Decognet et al., (2009) ont remarqué une variation d'agressivité de 17 souches de *B. cinerea* sur la tomate.

### II.1.4. Exigences nutritives

Afin de pouvoir germer, croître et sporuler, les spores de *Botrytis cinerea* ont des besoins nutritifs (Ajouz, 2009). Des expériences ont montré que la germination de *B. cinerea* dans l'eau était significativement plus faible que dans une solution nutritive (Kosuge et Hewitt, 1964). La germination des spores de *B. cinerea* dans l'eau (absence de nutriments) a cependant été observée pour certaines souches (Doehleermann et al., 2006).

### II.1.5. Sensibilité aux fongicides

Des niveaux variables de résistance envers différents fongicides, ont été mis en évidence au sein des populations de *B. cinerea* (Lauber, 1971). Par exemple, Corbaz (1993) a montré que sur 38 souches de *B. cinerea* isolées de cultures maraîchères en Suisse (tomate et laitue principalement), 44,7% sont résistantes aux dicarboximides, 73,6% aux benzimidazoles et 31,8% présentaient une double résistance.

Des isolats naturels de *B. cinerea* résistants au fenhexamide ont été détectés avec une fréquence de 10% (sur 200 isolats testés) alors que la population de l'agent pathogène n'avait, à priori, jamais été exposée à ce fongicide (Zhang et al., 2007).

## II.2. Diversité génétique

La biologie moléculaire a révélé une grande variabilité génétique au sein de l'espèce *B. cinerea*. Différents types de marqueurs moléculaires ont été développés chez cette espèce tels que les RAPDs, les RFLPs, les AFLPs et les marqueurs microsatellites (**Ross et al., 2007**).

*B. cinerea* présente une grande diversité génotypique et cette dernière est modelée par le lieu d'échantillonnage, la plante hôte et l'origine géographique des isolats (**Karchani-Balma et al., 2008**). 184 isolats de *B. cinerea* provenaient de six régions de France a permis d'identifier 180 génotypes différents à l'aide de marqueurs microsatellites (**Fournier et Guiraud, 2008**). La présence systématique des génotypes dominants de *B. cinerea* dans toutes les serres suggère que le système de culture influe sur la structure génétique et que l'inoculum endogène secondaire (produits sur des plants malades) joue un rôle essentiel dans le développement des épidémies de moisissures dans les serres commerciales de tomate (**Decognet et al., 2009**).

Enfin, une grande diversité génétique a été observée dans des populations aériennes d'isolats de *B. cinerea* collectés dans des serres expérimentales de tomate. Une meilleure connaissance de la diversité génétique de *B. cinerea* a un impact direct pour la gestion de la pourriture grise dans les serres de légumes.

## III. Les moyens de lutte contre *B. cinerea*

Elle repose sur des traitements chimiques mais également sur des stratégies de lutte culturales (lutte climatique- prophylaxie....etc) mais aucune de ces méthodes ne permet de garantir une protection totale des cultures.

### III.1. Les mesures prophylactiques

Parmi les méthodes de lutttes disponibles, une attention toute particulière doit être portée aux mesures prophylactiques. En complément des autres moyens de lutte, il s'agit d'une stratégie efficace pour limiter les dégâts causés par *B. cinerea*. Les mesures à préconisées sont :

Les feuilles sénescents et les organes infectés doivent être retirés de la serre afin de réduire les sources d'inoculum (**Richard et Boivin., 1994**). *B. cinerea* est capable de coloniser rapidement les tissus nécrotiques (**Kohl et al., 1999**) et de produire des quantités importantes

d'inoculum secondaire par la suite.

- ❖ Dans les serres, l'effeuillage est très important afin de permettre une aération optimale et réduire ainsi l'hygrométrie (**Decognet et al., 2009b**). L'effeuillage au ras de la tige sans laisser de chicot de pétioles diminue significativement les risques d'infection des plaies (**Decognet et al., 1997; Decognet et al., 2009b**).
- ❖ Le type d'irrigation peut également influencer sur le développement de la pourriture grise. Le développement de pourriture sur les tiges est survenu plus tôt dans l'irrigation par rigoles que dans l'irrigation goutte à goutte (**Aissat et al., 2008**).
- ❖ La fertilisation azotée doit être raisonnée, une faible dose engendrerait des feuilles chlorotiques qui sont idéales pour le développement de la maladie, tandis qu'une forte dose produirait des tissus succulents très réceptifs. (**Hoffland et al., 1999 ; Davidson et al., 2004 ; Pitchay, 2007**). L'enrichissement des tissus en azote réduirait fortement la sensibilité de la plante à *B. cinerea* (**Lecompte et al., 2010**).
- ❖ La taille des plants de tomate doit être régulière et soignée et de préférence le matin (**Decognet et al., 2010**). Les plaies ont ainsi davantage de temps pour sécher au cours de la journée.
- ❖ Les autres bio-agresseurs doivent également être maîtrisés afin d'éviter l'apparition de blessures, propices à l'infection de *B. cinerea* (**Blancard et al., 2003**).

### III.2. La lutte chimique

La pourriture grise conduit régulièrement à des pertes économiques importantes (**Petit, 2008**). L'utilisation de fongicides est donc une condition préalable pour produire des récoltes saines. La lutte chimique s'est révélée depuis toujours une méthode de lutte efficace et indispensable pour combattre les agents pathogènes (**Leroux, 2003 ; Pezet et al, 2004**). Elle se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir ou réprimer le champignon (**Ajouz, 2009**). Cette lutte chimique vient en complément des mesures prophylactiques qui contribuent à réduire l'incidence de la maladie en établissant des conditions environnementales moins favorables à l'infection (**Rosslenbroich et Stuebler, 2000 ; Leroux, 2007**).

A partir des années 1950, il y a eu une expansion rapide de l'emploi de produits phytopharmaceutiques, liée à l'essor de la chimie de synthèse (**Riba et Silvy, 1989**). Les fongicides anti-*Botrytis* utilisés en agriculture ont largement évolué depuis le début des

années 1970, où les premières matières actives apparues sur le marché français pour lutter contre la pourriture grise furent le folpel, le captafol, l'euparène (dichlofluanide) et le thirame. Des progrès ont été réalisés avec la commercialisation des benzimidazoles, des thiophanates, et des dicarboximides à partir de 1976 (**Leroux et al., 1999**). Les fongicides restent des outils indispensables pour lutter contre *Botrytis cinerea* en pré- et post-récolte et assurer une protection suffisante (**Leroux, 2004**).

### **III.2.1. classification des fongicides**

Les fongicides sont classés suivant leur pénétration dans la plante et selon leur mode d'action biochimique (**Rocher, 2004**).

#### **III.2.1.1. Suivant leur pénétration dans la plante**

Une fois appliqué sur une plante ou dans le sol, les fongicides restent à la surface ou pénètrent dans la plante (**Figure 3**). on peut donc distinguer deux grands groupes :

- Les fongicides de surface (contact) qui ne sont pas absorbés par la plante.
- Les fongicides pénétrants (systémiques) qui sont absorbés par la plante (**Carisse et al., 2009**).

##### **III.2.1.1.1. Les fongicides de contact**

Sont dits aussi préventifs, protecteurs ou résiduels (**Corbaz, 1990**). Ces fongicides demeurent au niveau du point d'application sur la plante (**Rocher, 2004**), ils attaquent le pathogène en tant que poisons peu spécifiques, à large base d'action. Ils inhibent un grand nombre de systèmes enzymatiques cellulaires et respiratoires. Dès que le champignon est installé à l'intérieur de la feuille, il ne peut être atteint par les fongicides de contact. Cependant la sporulation peut être inhibée étant donné que de nombreux pathogènes doivent sortir de la plante pour produire des spores (**Bosseur et al., 2002**). L'efficacité finale de ce type de produit dépend (**Corbaz, 1990**) :

- Mode d'application du fongicide : il faut l'appliquer de telle sorte qu'il y en ait partout et en quantité suffisante, en évitant les surplus qui se concentrent en certains endroits et peuvent occasionner des brûlures.

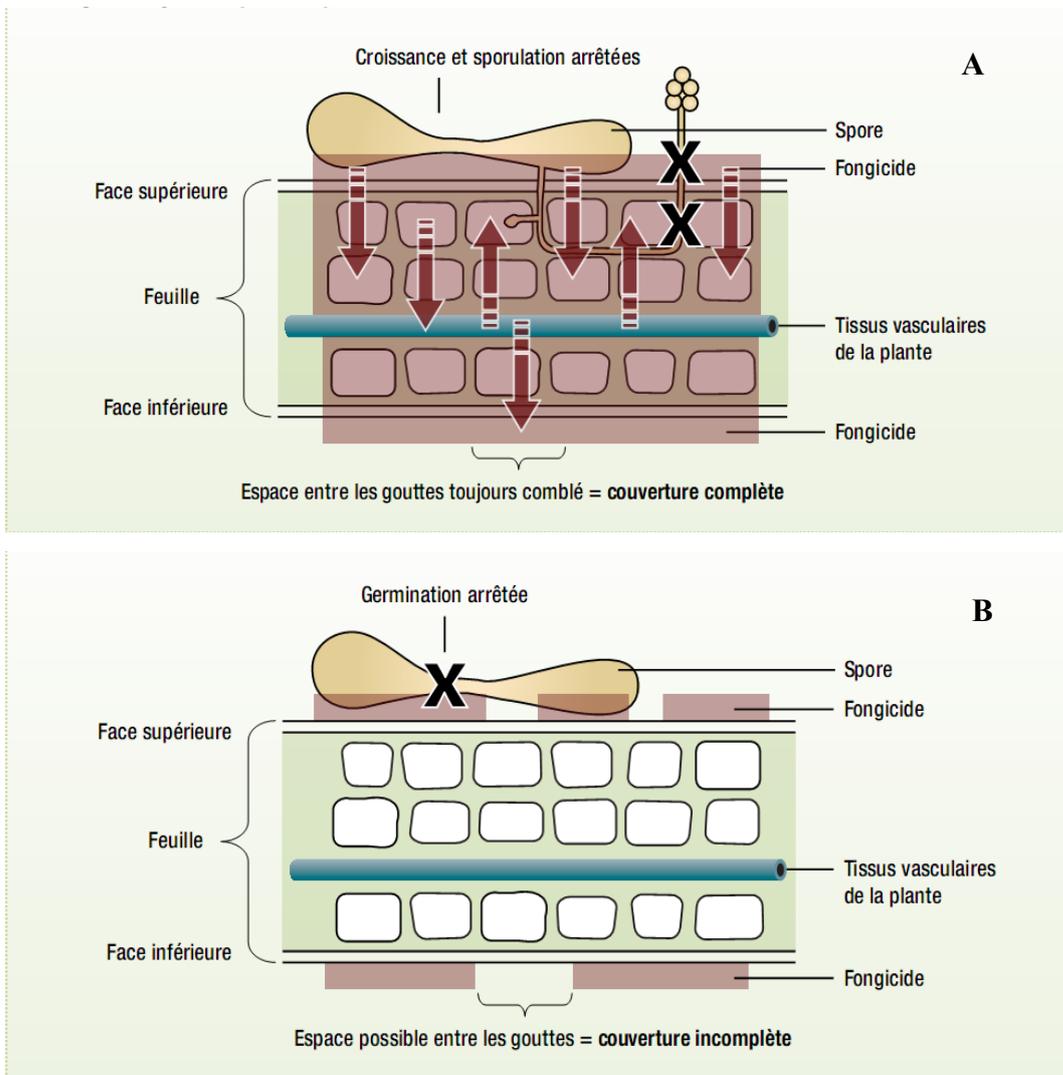
- La répartition du fongicide sur les surfaces.

-l'application avant l'infection.

- Ils nécessitent des applications répétées pour renouveler la couche protectrice (**Bosseur et al., 2002**).

### III.2.1.1.2. Les fongicides systémiques

Dits aussi endothérapie. La matière active est absorbée par la plante, tant par les racines que par le feuillage (**Corbaz, 1990**), ils se déplacent dans la plante par les vaisseaux du xylème et du phloème (**Bosseur et al., 2002**). Ces fongicides ont une action curative, c'est-à-dire qu'ils peuvent guérir des plantes déjà infectées. Leur action repose sur une inhibition très spécifique ; unisite et leur période d'action est plus étendue et n'est pas seulement restreinte à la germination de la spore comme les préventifs. Le mode d'application est moins important, puisque le fongicide agit à et depuis l'intérieur de la plante (**Corbaz, 1990**).



**Figure 3.** Mode d'action des fongicides systémiques (A) et de contact (B) (Carisse et al., 2009).

### III.2.1.2. Suivant leur mode d'action biochimique

Plusieurs familles de fongicides de synthèse sont disponibles pour lutter contre *Botrytis cinerea*. Elles sont classées en cinq catégories selon leur mode d'action biochimique sur le pathogène : les fongicides affectant la respiration, le fonctionnement des microtubules, l'osmorégulation, la biosynthèse de méthionine ou des stérols (**Petit, 2008**) (**Figure 4**).

#### ❖ Les inhibiteurs de la respiration mitochondriale

Ce sont des fongicides multi-sites. Leur action sur le champignon est principalement due à une forte inhibition de la germination des conidies. Les fongicides inhibiteurs de la respiration plus récents comme le fluazinam, les strobilurines et les carboxamides agissent en bloquant le fonctionnement des mitochondries. Le fluazinam exerce une action découplante de la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries (**Leroux et Moncomble, 1993**). Les strobilurines tels que l'azoxystrobine sont des inhibiteurs du complexe mitochondrial III et les carboxamides comme leboscalid, des inhibiteurs du complexe II (**Leroux, 2003; Elad et al., 2004**).

#### ❖ Les fongicides anti-microtubules

Il existe deux grandes familles de fongicides anti-microtubules : les benzimidazoles et les phénylcarbammates. Ils n'affectent pas la germination des conidies mais inhibent l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne (**Leroux et al., 1999**). Leurs effets anti-fongiques résultent de l'inhibition de l'assemblage microtubulaire due à la fixation des fongicides sur la tubuline, composant majeur des microtubules (**Davidse et Ishii, 1995**). Ces fongicides perturbent la structure du cytosquelette et bloquent les divisions nucléaires et cellulaires (mitoses) en perturbant la constitution du fuseau achromatique constitué de microtubules (**Bosseur et al., 2002**).

#### ❖ Les fongicides agissant sur l'osmorégulation

Trois familles chimiques appartiennent à ce groupe de fongicides : les dicarboximides, les phénylpyrroles et les hydrocarbures aromatiques (**Petit, 2008**). Ils inhibent à la fois la germination des conidies et la croissance mycélienne. De plus, tous ces fongicides produisent des altérations morphologiques similaires au niveau des tubes germinatifs tels que des gonflements, des ramifications anormales et des éclatements cellulaires (**Elad et al., 2004**). Des études biochimiques ont indiqué que ces fongicides affectaient la synthèse de la paroi cellulaire et induisaient l'accumulation de glycérol dans les cellules

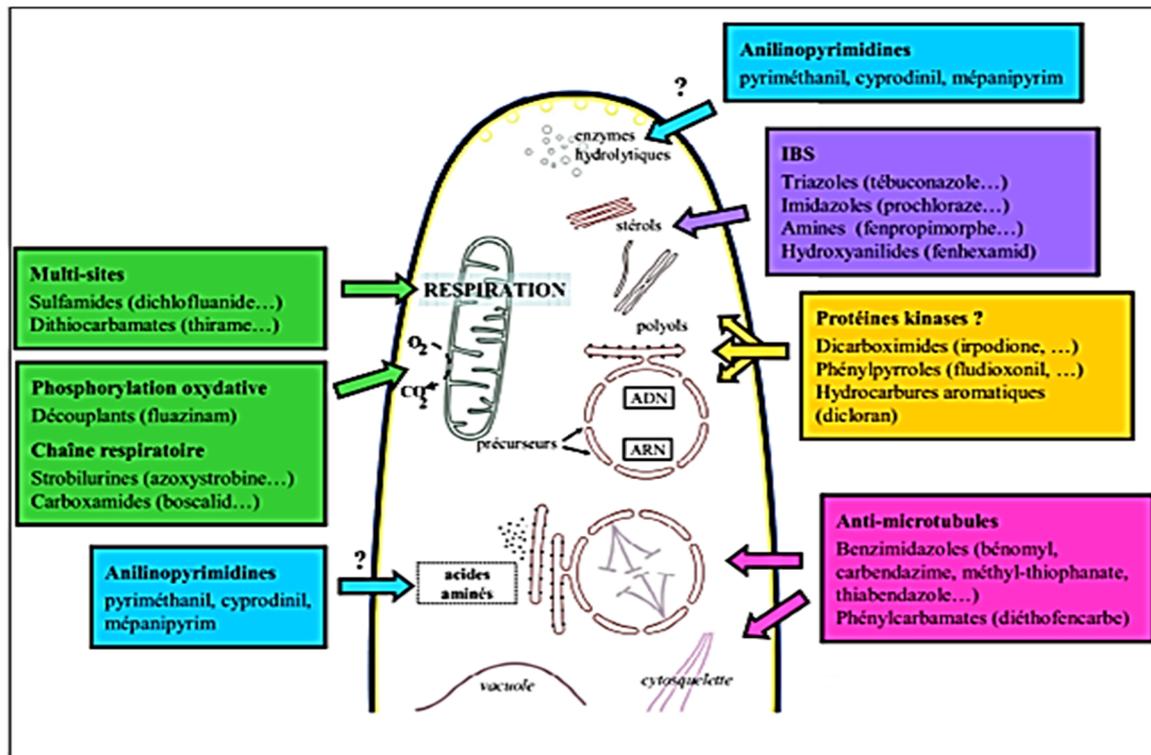
mycéliennes (**Leroux, 1996**). Plusieurs recherches suggèrent que leur cible primaire pourrait être des protéines kinases impliquées dans la régulation de la biosynthèse des polyols (**Orth et al., 1995; Pillonel et Meyer, 1997 ; Schumacher et al., 1997**).

❖ **Les inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine**

Les anilinopyrimidines n'affectent pas la germination des conidies mais inhibent l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne de *B. Cinerea* (**Rosslbroich et Stuebler, 2000**). Des études concernant leur mode d'action ont montré que ces fongicides pouvaient interférer dans la biosynthèse de plusieurs acides aminés et particulièrement de la méthionine (**Leroux, 1994 ; Masner et al., 1994 ; Fritz et al., 1997**). Les anilinopyrimidines présentent également la capacité d'inhiber la sécrétion de protéines extracellulaires, y compris d'enzymes hydrolytiques impliquées dans le processus d'infection du champignon (**Miura et al., 1994 ; Milling et Richardson, 1995**). Leur activité antifongique in vivo pourrait donc résulter d'une inhibition de la biosynthèse de méthionine dans les cellules fongiques et/ou d'un blocage dans l'excrétion d'enzymes hydrolytiques impliquées dans le processus de pathogénicité (**Leroux, 1996**).

❖ **Les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols**

Ces différents fongicides ne suppriment pas la germination des conidies mais ils inhibent l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne (**Leroux et al., 1999**). De plus, les tubes germinatifs produits sur des milieux avec ajout de ces fongicides sont déformés par des renflements et leur cytosol présente une apparence granulaire (**Leroux et al., 1999**). Le plus efficace est le fenhexamid. Son site d'action semble être différent des autres fongicides anti-*Botrytis* car aucune résistance croisée n'a été décelée avec les autres fongicides (**Rosslbroich et Stuebler, 2000**). L'accumulation de plusieurs stérols dans le mycélium traité par le fenhexamid indique que ce fongicide inhiberait la 3-céto réductase impliquée dans la C4-déméthylation (**Debieu et al., 2001**).



**Figure 4.** Sites d'action des différentes familles de fongicides anti-*Botrytis* (Petit, 2008).

Les fongicides restent des outils indispensables pour lutter contre *B. cinerea* en pré- et post- récolte et assurer une protection suffisante (Leroux, 2004), mais plusieurs familles sont concernées par des phénomènes de résistance. La variabilité génétique de *B. cinerea* lui a permis de s'adapter à de nombreux fongicides qui lui ont été opposés (Blancard et al., 2009).

Afin de garantir l'efficacité sur le long terme des stratégies de lutte, le nombre de traitements doit donc être réduit au maximum (Delp, 1980). De plus, il est fortement recommandé d'alterner l'emploi des familles chimiques non seulement sur l'année mais pluri-annuellement (Dubos, 1999 ; Viret, 1999).

En plus des phénomènes importants de résistance, les pesticides peuvent générer un grand nombre de risques significatifs pour la santé humaine et l'environnement (Petit, 2008), justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon (Ajouz, 2009).

### III.3 .La lutte biologique

Le traitement chimique représente une solution de facilité, qui correspond aussi au besoin d'absolu de l'homme, désirant un résultat rapide et total. La lutte biologique au contraire n'a qu'une efficacité relative et demande davantage de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est plus intéressante sur tous les plans (**Corbaz, 1990**).

La lutte biologique est définie par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) comme l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs aux productions végétales (**Ajouz, 2009**).

#### III.3.1. Les agents de lutte biologique

Les agents de lutte biologiques sont représentés par des bactéries et des champignons permettant d'améliorer la résistance à *B.cinerea* (**Elmer et Reglinski, 2006**). Le champignon le plus largement étudié est le *Trichoderma spp.* (**Dubos et al., 1978 ;Dubos et al., 1982**). Concernant les bactéries, le genre *Bacillus* produisant des phytoalexines et présente une meilleure résistance à *B. cinerea* (**Paul et al., 1997 ;Paul et al., 1998**).

#### III.3.2. Mécanismes d'action des microorganismes impliqués dans la lutte biologique

##### ❖ Antibiose

Il s'agit de la production par un microorganisme de métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène qui vont inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ ou la sporulation des agents pathogènes (**Ajouz, 2009**).

##### ❖ Hyperparasitisme

L'antagoniste est un parasite et reconnaît spécifiquement sa cible, pénètre dans ces cellules et entraîne sa destruction via la colonisation de ses organes (**Ajouz et al., 2009**).

##### ❖ Compétition nutritive

Le champignon *B. cinerea* est très sensible à l'absence de nutriments : il a besoin de nutriments d'origine extérieur pour assurer la germination de ses spores (**Elad, 1996**). La bactérie *Pseudomonas sp* utilise les acides aminés plus vite que les conidies de *B. cinerea*. Il a été montré que l'inhibition de la germination des conidies de ce champignon est corrélée à la quantité d'acides aminés prélevés par la bactérie (**Brodie et Blakeman, 1975**).

❖ **Interférence avec le pouvoir pathogène**

Les agents de lutte biologique peuvent interférer avec les facteurs du pouvoir pathogène en inhibant certaines enzymes hydrolytiques (cutinases, pectinases) produites par les agents pathogènes.

❖ **Modification de la surface des feuilles**

Certains microorganismes peuvent changer les propriétés de surface des feuilles en produisant des biosurfactants. Ces derniers entraînent un assèchement de la surface foliaire et gênent le processus d'attachement et la croissance des agents pathogènes sur les feuilles (**Bunster et al., 1989**)

❖ **Stimulation des défenses de la plante**

Les agents de lutte biologique peuvent induire une résistance chez la plante hôte par l'activation de ses systèmes de défense. Ces défenses peuvent entre autres impliquer la production de substances antibiotiques par la plante (type phytoalexines) ou le renforcement des parois cellulaires pour ralentir la progression de l'agent pathogène (**Jacobsen, 2006**).

**Tableau III.** Exemple de produits de lutte biologique commercialisés dans le monde pour la lutte contre *B. cinerea* (**Elad et Stewart, 2004 ; Fravel, 2005**)

Nom de produit	Antagoniste	Utilisation	Fabricant/Pays
<b>Trichodex</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	En vignes et en cultures sous serre	Makhteshim, Israël
<b>Plantshield</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Culture sous serre	BioWorksInc, Etats-Unis
<b>Botry-Zen</b>	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Vignes	Botry-Zen Ltd, Nouvelle-Zélande
<b>Aspire</b>	<i>Candida oleophila</i>	Fruits après récolte	Ecogen, Etats-Unis
<b>Serenade</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Cultures sous serre et de plein champ	Agra Quest, Etats-Unis

La lutte biologique n'est pas une solution miracle, elle est limitée par divers facteurs (**Corbaz, 1990**) :

- la manipulation de deux populations d'organismes, le parasite et le contre parasite, toutes deux susceptibles d'évoluer dans des directions imprévues
- La maladie n'est pas considérée comme seule relation entre la plante hôte et le parasite mais de tenir compte de l'ensemble de l'environnement.
- Contraintes pour le stockage des microorganismes.

### III.4. La lutte intégrée

Pendant longtemps, la lutte chimique contre les maladies des cultures a occupé une place centrale dans les systèmes de production (**Ridray et al., 2003**). Les pesticides ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité des récoltes (**Pope, 2006**). Cependant leurs effets secondaires sur l'environnement et la santé ne s'avèrent pas compatibles avec une exploitation durable des agro-écosystèmes (**Deguine et Ferron, 2004**). Bien que la lutte biologique a montré son efficacité, elle est limitée par plusieurs facteurs. La complexité des interactions hôte/ pathogène/ environnement génère une efficacité très variable de ces stratégies (**Corbaz, 1990**).

De nouvelles méthodes de lutte se développent tout en évitant des dégâts économiques et en préservant l'environnement et la santé humaine. Ces méthodes s'inscrivent dans un cadre appelé lutte intégrée combinant une lutte chimique raisonnée, la lutte biologique et des mesures prophylactiques (**Fabre, 2001**).

C'est dès les années 1950 que le concept de lutte intégrée est introduit (**Ferron, 1999**). Selon la FAO (Food Agricultural Organisation), la lutte intégrée est définie comme étant un « système de lutte aménagée qui, compte tenu du milieu particulier et de la dynamique des populations des espèces considérées, utilise toutes les techniques et méthodes appropriées de façon aussi compatible que possible en vue de maintenir les populations d'organismes nuisibles à des niveaux où ils ne causent pas de dommages économiques » (**Milaire, 1995**).

L'objectif de cette nouvelle stratégie est de permettre une lutte efficace, à coûts abordables, tout en respectant l'environnement (**Hale, 2000**). Elle constitue actuellement un incontournable élément de valorisation commerciale et doit s'intégrer au sein du système cultural et de ses composantes agro-économiques.

## IV. Matériels et méthodes

### IV.1. Matériel fongique

Cinq souches de *B. cinerea* sont utilisées dans cette étude. Elles sont issues de la collection du laboratoire de mycologie. Elles sont obtenues durant trois campagnes de prélèvement effectuées sur trois saisons culturales à partir de trois sites de la région de Béjaïa : Merdj ouamen « A », Baccaro « B » et Tichy « C » (Tableau IV).

**Tableau IV.** Les différentes souches utilisées et leurs origines

Souche	Site de prélèvement	Année
ALG20	Serre B (Baccaro) Algérie	2007
ALG136	Serre B (Baccaro) Algérie	2008
ALG295	Serre B (Baccaro) Algérie	2010
BC1	France	1989
BC142	Norvège	-

### IV.2. Les fongicides

Trois fongicides sont utilisés (tableau V), dont deux sont chimiques et un biologique. Ils sont sélectionnés selon leur utilisation sur le terrain. Les trois fongicides sont fournis par l'unité de Pathologie Végétale de l'INRA d'Avignon, France.

**Tableau V.** Les différents fongicides utilisés.

Nom commercial	Famille chimique	Matière active	Teneur
Teldor	Hydroxyanilides	Fenhexamide	50%
Rovral	Dicarbomaximide	Iprodione	50%
Serenade	Biofongicide	<i>Bacillus Subtilis</i> QST713	5. 10 <sup>9</sup> UFC/g

#### IV.2.1. Détermination des concentrations des fongicides

Le choix des concentrations est effectué sur la base des travaux ultérieurs (**Leroux et al., 1998**). La gamme de concentration utilisée pour le test de la croissance mycélienne et le test de germination est mentionnée dans le tableau VI.

**Tableau VI.** La gamme de concentrations utilisées pour le test de croissance mycélienne et de germination

Test	fongicide	concentrations utilisées
Croissance mycélienne	Iprodione- Teldor-Serenade	0,1-1-10-100-1000 ppm
Germination	Iprodione	0,1-1-2,5-5ppm
	Teldor	0,1-1-5-10-15ppm
	Sérénade	0,1-1-5-10-20ppm

### IV.3. Test des fongicides sur *B. cinerea*

#### IV.3.1. Effet sur la croissance mycélienne (Ajouz, 2009)

Les suspensions de fongicides préparées à base de poudre dans l'acétone pour l'iprodione et l'eau distillée pour les deux autres fongicides (voir annexe 2) sont incorporées à différentes concentrations dans le milieu PDA (Voir annexe 1) en surfusion. 200ml de milieu PDA contenant les fongicides ont été coulés dans des boîtes de Pétri de 90mm. Après solidification, des implants de 5 mm de diamètre, issus d'une culture jeune de *B. cinerea* sont déposés au centre de chaque boîte de Pétri. Ces boîtes sont incubées pendant 7 jours à 21°C. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration et pour chaque souche, des boîtes traitées de la même façon ne contenant pas le fongicide, constituent le témoin (**Figure 5**). Des témoins avec acétone sont effectués avec trois répétitions pour chaque concentration de l'iprodione.

La croissance mycélienne est estimée tous les jours en mesurant le diamètre moyen de chaque colonie (deux diamètres perpendiculaires). Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante :

$$I (\%) = 100. (A - B)/A$$

Avec :

**%I** : Pourcentage d'inhibition

**A** : Diamètre moyen des colonies témoins

**B** : Diamètre moyen des colonies traitées

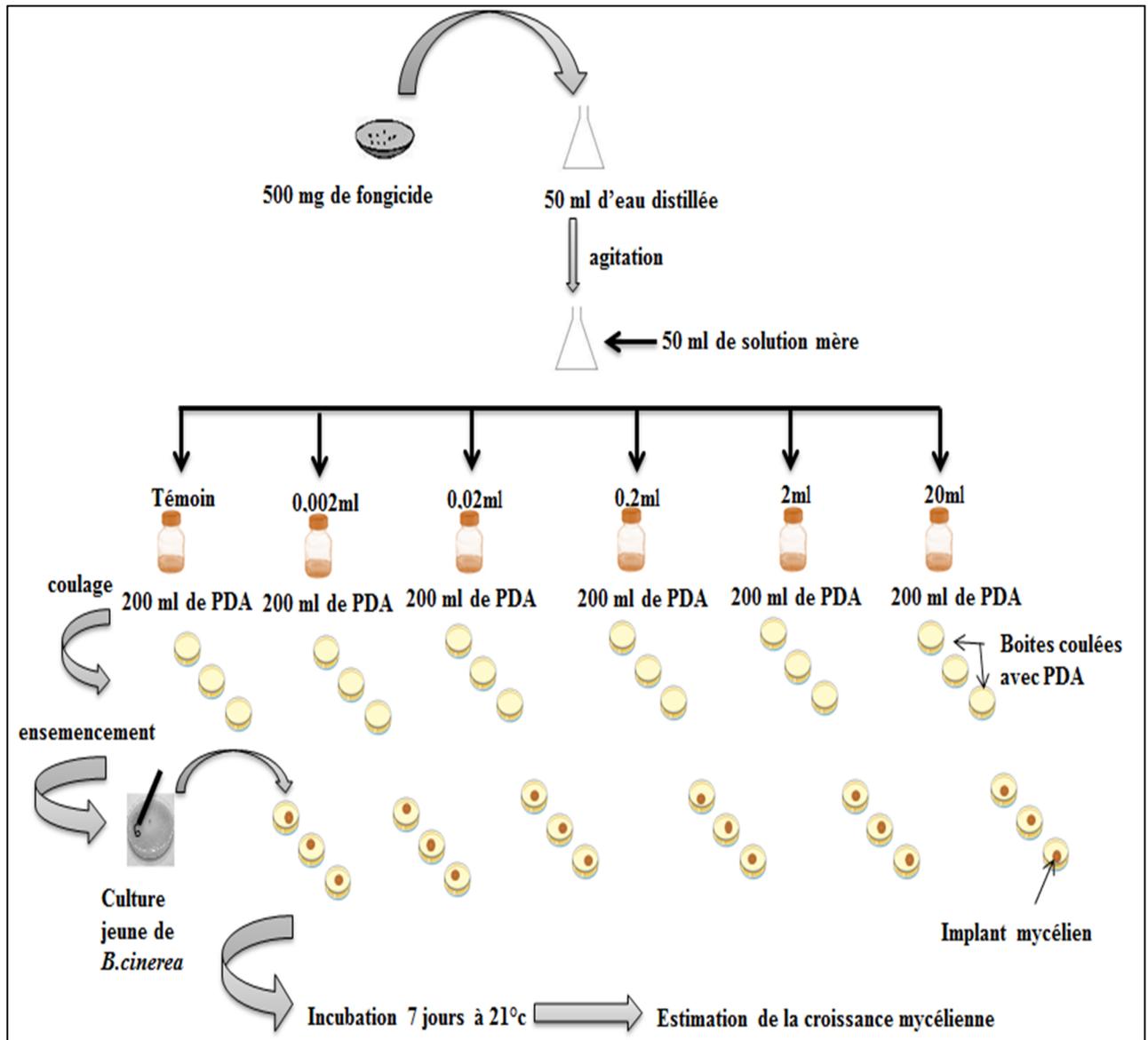


Figure 5. Test de fongicide sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*.

### V.3.2. Effet sur la germination (Ajouz, 2009)

Consiste à déterminer le taux de germination au bout de 18h sous l'effet des fongicides à différentes concentrations. Pour cela, il faut préparer une suspension sporale à  $10^6$  spores/ml (Figure 6) et le milieu de culture à différentes concentrations de fongicides (voir annexe 3).

### V.3.2.1. Préparation de la suspension sporale

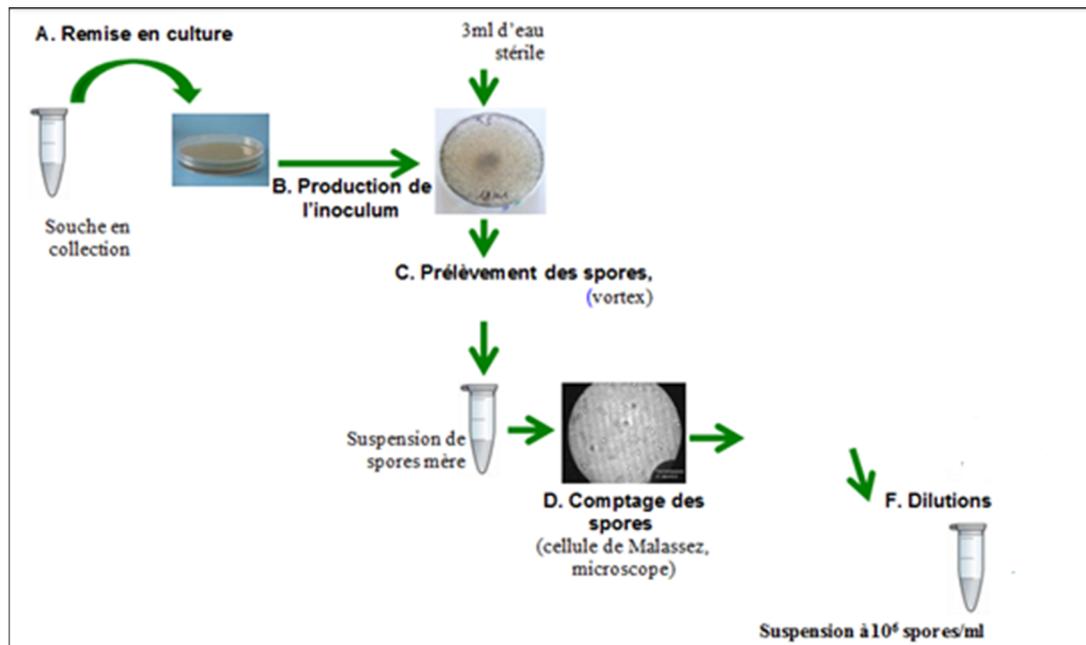


Figure 6. Préparation de la suspension sporale

### V.3.2.2. Préparation des solutions de fongicides

Les solutions de fongicides sont préparées comme précédemment, mais elles sont additionnées au milieu glucose-agar (GA) (voir annexe 1) en surfusion. 5 ml du milieu sont coulés sur des lames. Après solidification, 10  $\mu$ l de la suspension sporale à  $10^6$  spores/ml sont déposés à la surface de chaque lame en homogénéisant régulièrement au vortex entre les ensemencements, puis sont étalés à l'aide d'un râteau sur toute la surface de la lame. Ces dernières sont placées dans des boîtes en plastique tapissée d'une double couche de papier absorbant humidifié. Les boîtes sont ensuite incubées pendant à 21°C/18h. 05 répétitions sont réalisées pour chaque souche et pour chaque concentration (**Figure 7**).

### V.3.2.3. Le dénombrement des spores germées

Le dénombrement est effectué sous microscope optique à objectif  $\times 10$ . Les lames sont observées une par une et le nombre de spores germées et non germées est compté à l'aide de deux compteurs. Une spore est considérée germée lorsque la taille du tube germinatif est deux fois supérieure à la taille de la spore elle-même.

Calculer le pourcentage d'inhibition induit par chaque dose :

$$\%INH = [1 - (\%G_{Dx} - \%G_{\text{témoin}})] \times 100$$

Avec :

**% INH** : le pourcentage d'inhibition ;

**%G<sub>Dx</sub>** : le pourcentage de germination à la dose x ;

**%G<sub>témoin</sub>** : le pourcentage de germination ;

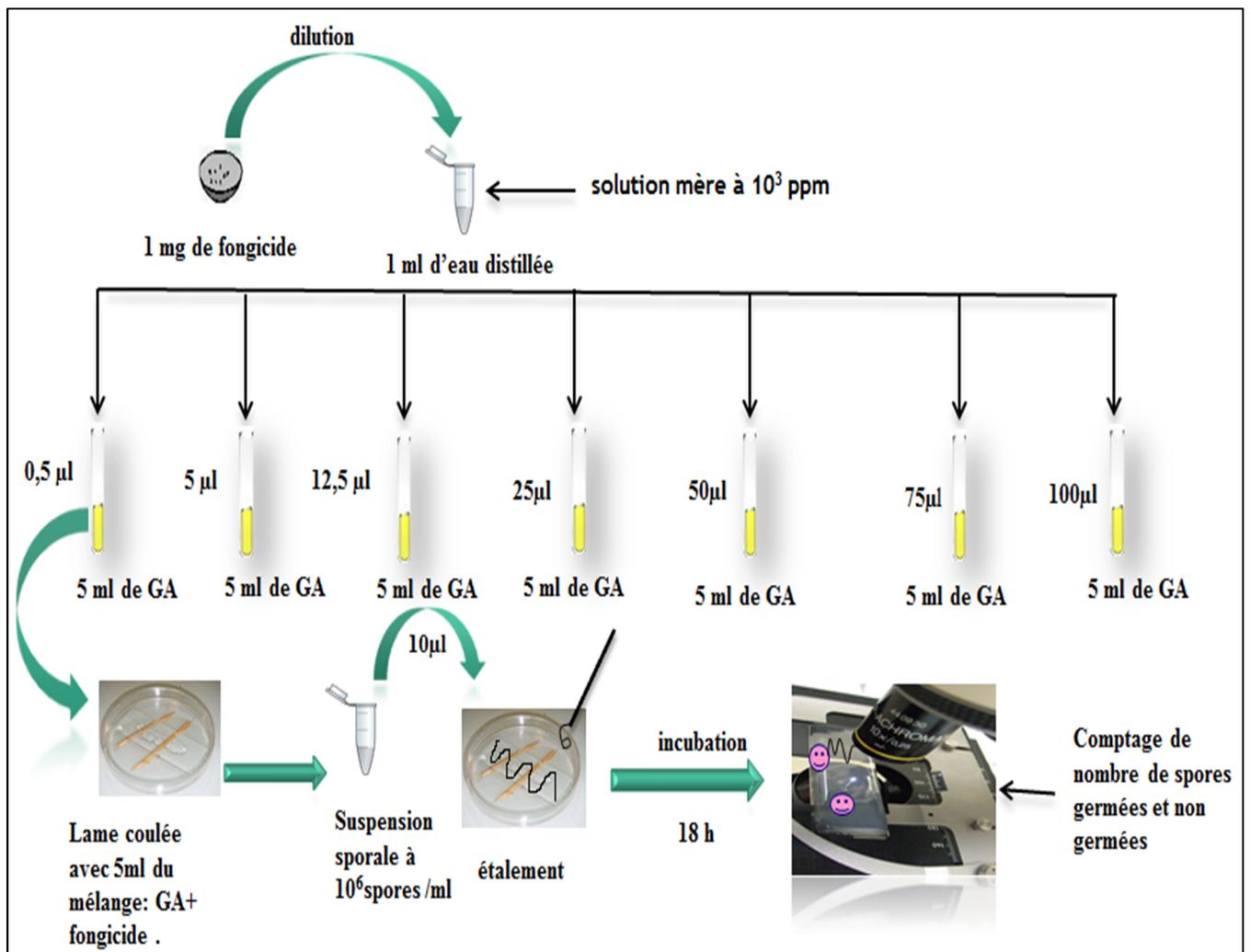


Figure 7. Test fongicide sur germination

### **Le calcul des IC50**

Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des spores ont été transformés en valeurs probit. L'équation de régression  $y = a \log x + b$ , avec  $a =$  coefficient de corrélation,  $b =$  constante,  $x =$  concentration en fongicide,  $y =$  probit et  $\log =$  logarithme décimal permet d'obtenir les IC 50, concentrations inhibitrices réduisant de moitié la croissance mycélienne et la germination des spores (voir annexe 4).

## **IV.4. Test d'agressivité sur folioles de tomate**

Ce test consiste à inoculer des folioles de tomate avec différentes souches de *B.cinerea*. L'objectif était de comparer les différentes souches entre elles sur la base de leur agressivité. Le protocole appliqué dans cette étude a été fourni par l'INRA d'AVIGNON France (Andanson, 2010).

### **IV.4.1. Production des implants mycéliens**

Trois jours avant l'inoculation des folioles, les souches ont été mises en culture. Pour chacune des cinq souches, des implants mycéliens ont été déposés sur boîtes PDA. Les boîtes ensemencées ont ensuite été placées en étuve à 21°C durant trois jours, temps nécessaire au développement mycélien du champignon.

### **IV.4.2. Inoculation sur des folioles de tomate avec les implants mycéliens**

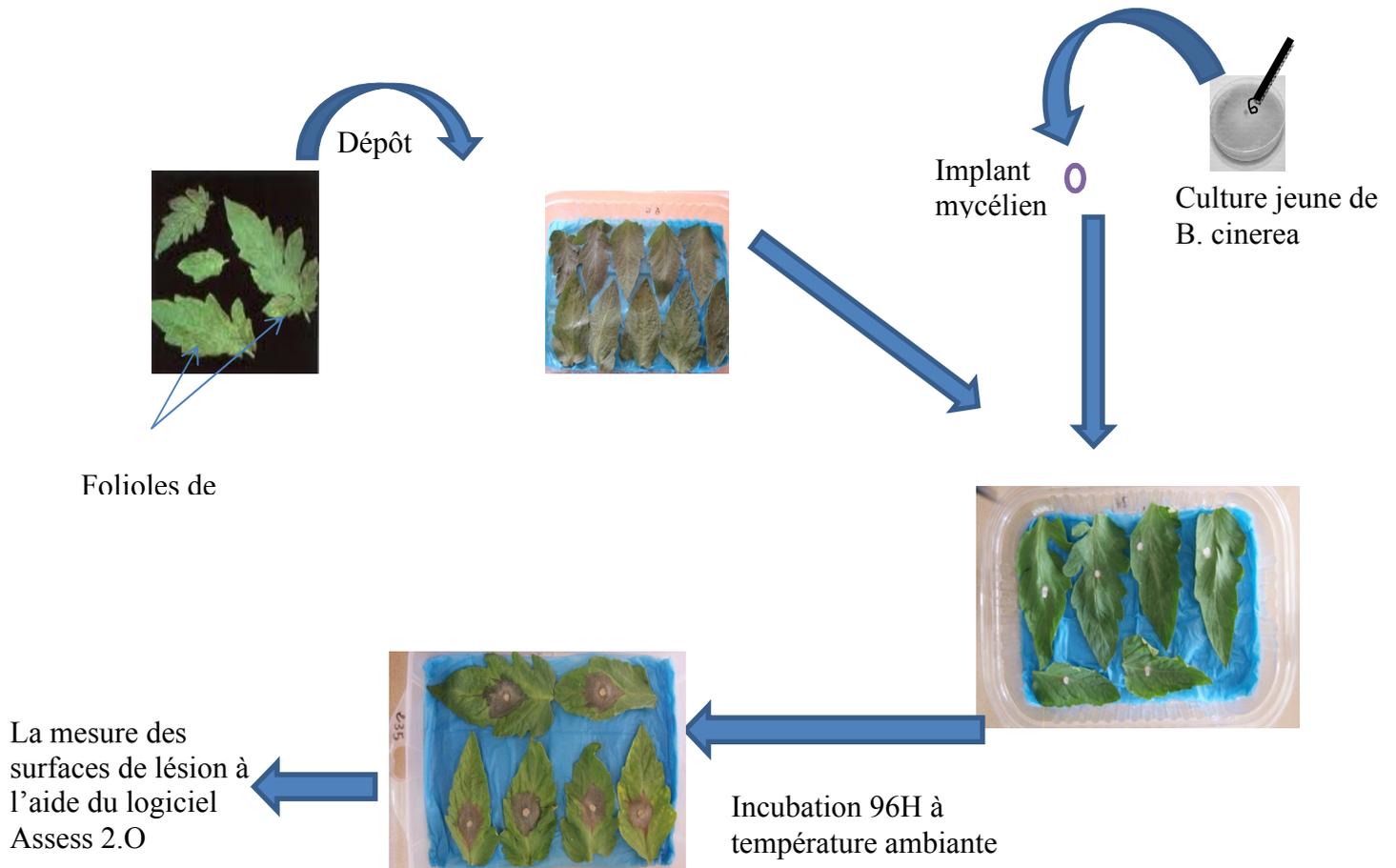
Des folioles de tomates (**variété Tavira F1**) appartenant à un même niveau foliaire, de taille homogène, ont été prélevées sur les plants âgés de huit semaines, puis déposées dans des boîtes en plastique transparentes dont le fond avait été recouvert d'une double couche de papier absorbant humidifié. Les implants mycéliens, d'un diamètre de 3 mm, ont été excisés à l'emporte-pièce à partir des cultures préparées trois jours plutôt. Ils ont été disposés sur les organes foliaires (1 disque par foliole) en veillant à ce que le mycélium soit en contact avec le tissu végétal. Ces disques mycéliens ont systématiquement été placés au milieu des folioles. Au total, 30 folioles ont été inoculées à raison de 6 folioles par souche (provenant de la même variété de plante de tomate et ont la même taille)

### **IV.4.3. Incubation :**

Les boîtes contenant les folioles inoculées ont été fermées avec leur couvercle puis placées au laboratoire à une température ambiante pendant quatre jours (**Figure 8**).

#### IV.4.4. Suivi et quantification des lésions

A partir 24h suivant l'inoculation, chaque boîte a été photographiée quotidiennement pendant quatre jours afin d'observer l'évolution des lésions causées par le champignon. La surface (mm<sup>2</sup>) des lésions a été déterminée avec le logiciel ASSESS 2.0 (APS Press, St Paul, Minnesota).



**Figure 8.** Test d'agressivité des souches de *B. cinerea* sur folioles de tomate.

#### IV.4.5. Analyse des données

L'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curves), qui correspond à la surface présente sous la courbe de progression de la maladie (Jeger et Viljanen-Rollinson, 2001), a été calculée de la manière suivante :

$$\text{AUDPC} = [Y_1/2 + \sum_2^{n-1} Y_j + Y_n/2][I]$$

Avec  $Y_j$  la surface de la lésion (en mm) au temps d'observation  $j$ ,  $n$  le nombre total d'observations et  $I$  l'intervalle de temps entre chaque observation (en jours). L'AUDPC, exprimée sans unité.

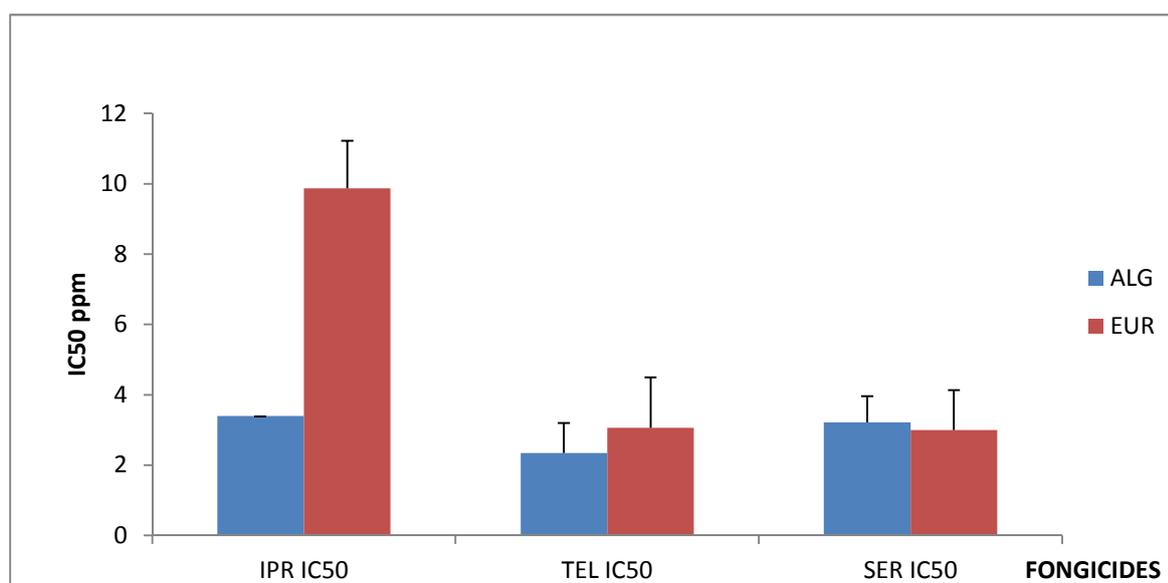
## V. Résultats et discussions

### V.1. Résultats

#### V.1.1. Résultats de test des fongicides sur la croissance mycélienne et sur la germination

##### ❖ Croissance mycélienne :

En présence de l'Iprodione, la cinétique de croissance des souches de *B. cinerea* était différente. Les souches d'origine d'Algérie étaient plus sensibles vis-à-vis de ce fongicide que les souches d'origine d'Europe. Cette différence significative a été confirmée par le test statistique d'ANOVA2 (Newman-Keuls) ( $P < 0,05$ ) (**Figure 9**).



**Figure 9.** Croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* en présence de trois fongicides.

Les barres représentent les écarts types.

IC50 : Concentration inhibitrice de 50% de la croissance mycélienne des spores des souches de *B. cinerea*

En présence de Teldor et de Serenade, une légère différence a été observée dans la cinétique de croissance des souches de *B. cinerea* (**Figures 9**). Les souches d'origine d'Algérie étaient faiblement plus sensibles vis-à-vis de ces deux fongicides. Cependant le test statistique d'ANOVA2 (Newman-Keuls) n'a indiqué aucune différence significative en

termes de croissance en présence de Teldor et de Serenade, avec une probabilité associée ( $P > 0,05$ ).

Une différence a été constatée entre les souches de même origine. Elles ont présenté des  $IC_{50}$  variables. Au sein des souches d'origine d'Algérie, la souche ALG<sub>20</sub> apparaît un peu plus résistante vis-à-vis des trois fongicides avec des  $IC_{50}$  qui sont supérieures à 3 ppm (**Tableau VII**). Quant aux souches d'origine d'Europe, c'est la souche BC<sub>1</sub> qui est apparue plus résistante avec des  $IC_{50}$  comprises entre 3,8-11,22 ppm.

**Tableau VII.** Effet des fongicides sur la croissance mycélienne souches de *B. cinerea*.

		Croissance mycélienne		
		Iprodione	Teldor	Serenade
origine	souche	IC 50%	IC 50%	IC 50%
ALG	ALG20	5,012	4.073	3.02
ALG	ALG136	3.4	2.82	1.38
ALG	ALG295	3.4	2.754	2.63
EUR	BC1	11.22	3.8	4.074
EUR	BC142	8.511	2.2	2.042

$IC_{50}$  : Concentration inhibitrice de 50% de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*

### ❖ Germination des spores

Sous l'effet de l'Iprodione et de Teldor, l'analyse statistique (test de Newman-Keuls) n'a détectée aucune différence significative en termes de taux de germination entre les souches de *B. cinerea* de provenance géographique différente. Néanmoins, le taux de germination était différent entre les souches testées. La souche BC1 était la plus résistante en présence de l'iprodione avec une  $IC_{50}$  de 16,25 ppm et la souche ALG 20 était la plus sensible avec une  $IC_{50}$  de 0,31 ppm. En présence de Teldor la souche ALG<sub>20</sub> était la plus résistante avec une  $IC_{50}$  de 8,37 ppm et la souche BC 142 ppm la plus sensible avec une  $IC_{50}$  de 0,23 ppm, tandis qu'en présence de Serenade, toutes les souches sont avérées résistantes avec des  $IC_{50}$  supérieures à 20 ppm à l'exception de la souche ALG 20 avec une  $IC_{50}$  de 13ppm (**Tableau VIII**).

**Tableau 10** : Effet des fongicides sur la germination des spores des souches de *B. cinerea*

origine	souche	Germination des spores		
		Iprodione IC 50%	Teldor IC 50%	Serenade IC 50%
ALG	ALG20	0.31	8.37	12.95
ALG	ALG136	0.77	2.32	> 20
ALG	ALG295	1.55	2.37	> 20
EUR	BC1	16.25	1.07	> 20
EUR	BC142	0.46	0.23	> 20

IC50 : Concentration inhibitrice de 50% de la croissance mycélienne des spores des souches de *B. cinerea*

## V.2. Résultats de test de l'agressivité

Les souches de *B. cinerea* testées sont issues de deux origines géographiques différentes. Elles ont été inoculées sur des folioles de tomate. La souche de référence BC 1 considérée comme étant très agressive. Les surfaces des lésions causées sur chaque foliole ont été mesurées périodiquement afin de déterminer l'AUDPC de chaque souche.

L'analyse statistique ANOVA suivi de test Newman-Keuls a indiqué que les souches de *B. cinerea* issues de deux origines (Algérie et Europe) n'étaient pas significativement différentes en terme d'agressivité ( $P = 0.07$ ). Cependant, la probabilité  $P$  associée n'est pas très éloignée de 0,05, laissant penser qu'une différenciation des souches selon leur origine n'est pas à exclure complètement (**Figure 11**).

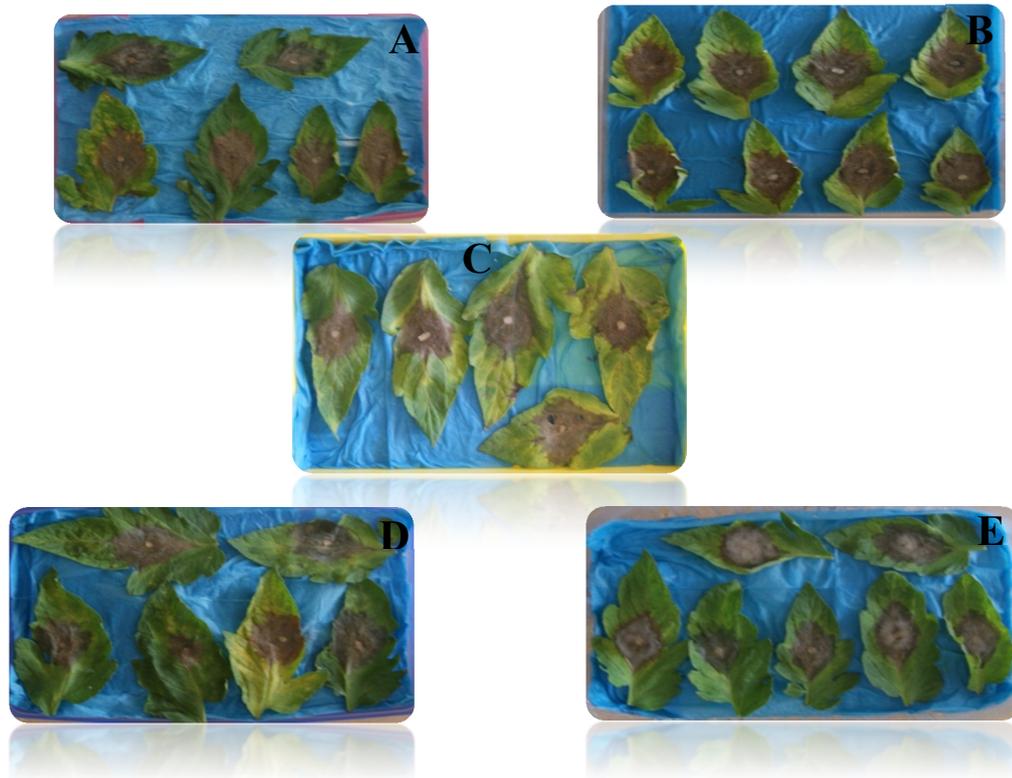


Figure 10. Les lésions causées par les cinq souches de *B. cinerea* sur folioles de tomate à 96h. A (BC1), B (ALG20), C (BC142), D (ALG136), E (ALG295).

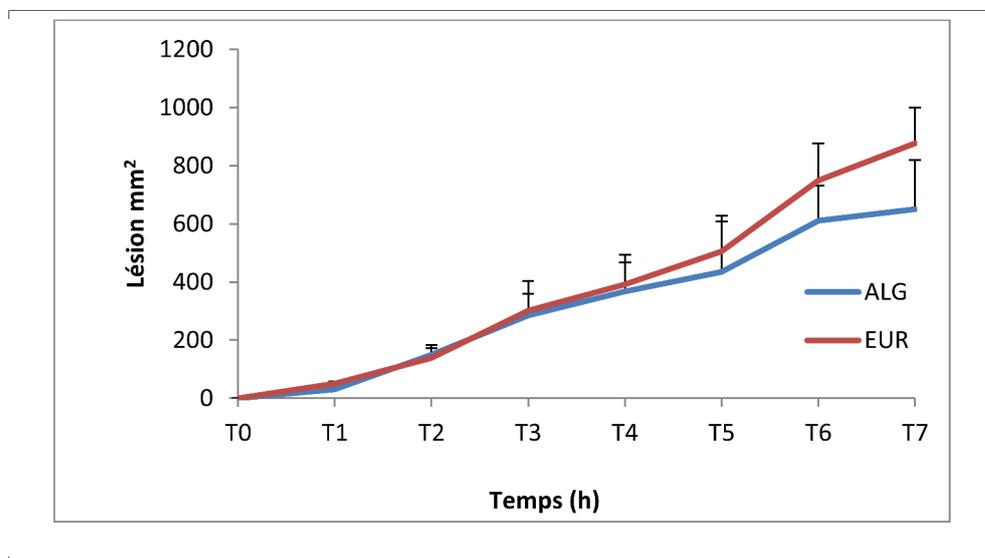
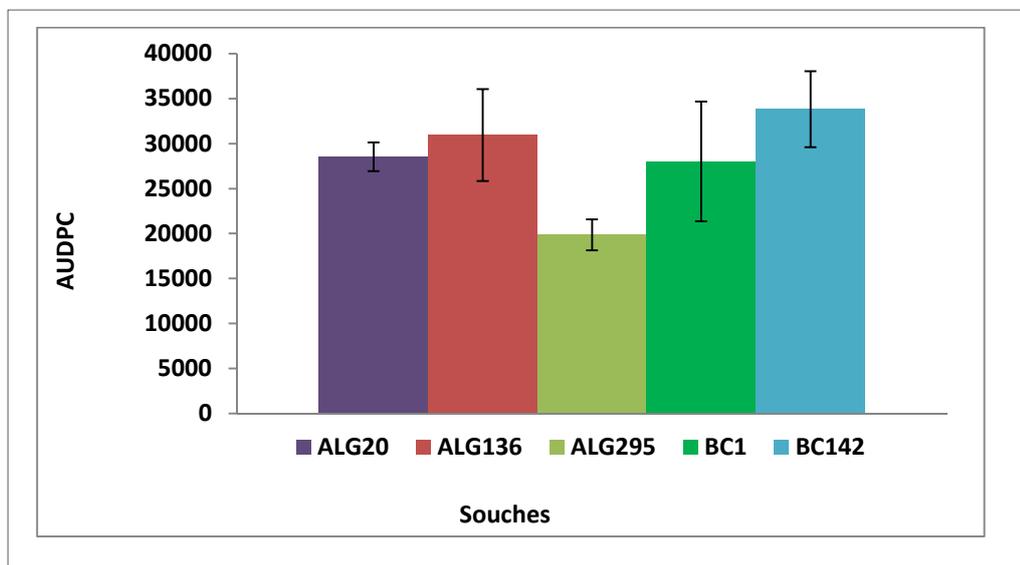


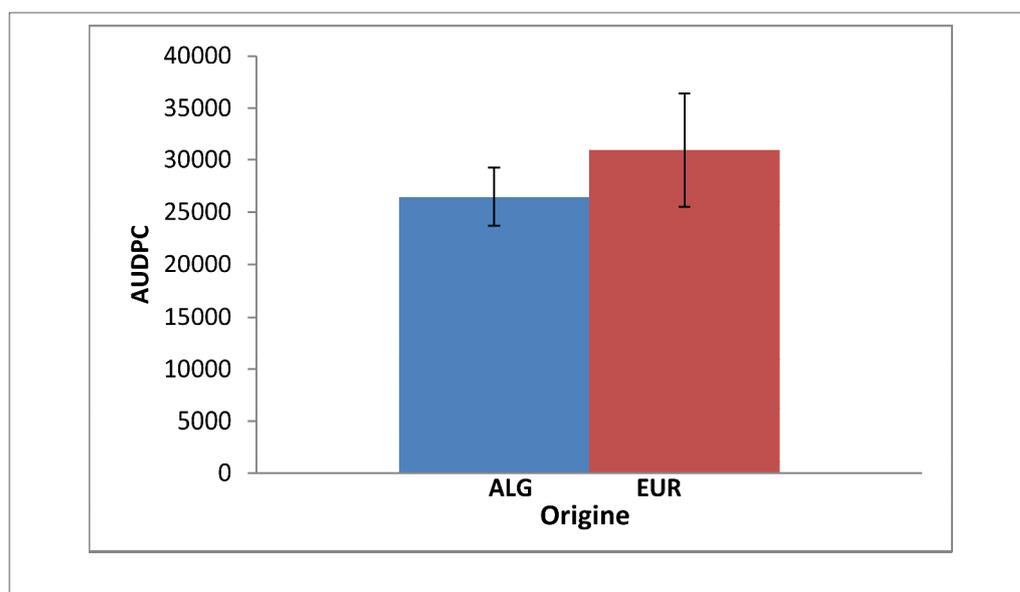
Figure 11. Agressivité de souches de *B. cinerea* sur folioles de tomate ( $\text{mm}^2$ ).  
(I) : Les barres représentent l'écart type des valeurs.

Toutes les souches ont causé des lésions sur les folioles de tomate. Celles issues d'Europe étaient globalement un peu plus agressives que les souches issues d'Algérie (Figure 13). Elles présentaient respectivement une AUDPC moyenne de 30577 et 26332. Il est important

de noter que la souche ALG 295 a eu un comportement moins agressif que les autres souches, ce résultat était significativement différent ( $P < 0,05$ ) (**Figure 12**).



**Figure 12.** Agressivité de souches de *B. cinerea* sur folioles de tomate. L’AUDPC moyenne a été déterminée pour chaque souche. Plus la valeur est élevée, plus la souche est agressive. (I) : Les barres représentent les écarts types.



**Figure13.** Agressivité de souches de *B. cinerea* sur folioles de tomate. L’AUDPC moyenne a été déterminée pour chaque origine. Plus la valeur est élevée, plus la souche est agressive. (I) : Les barres représentent les écarts types.

## V.2. Discussions

Nos résultats montrent que l'agressivité des souches de *B. cinerea* issues de deux origines n'était pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ). Cependant, les souches d'une même région ont montré une variation dans les valeurs d'AUDPC caractéristiques. La souche ALG<sub>295</sub> s'est montrée la moins agressive, tandis que la souche BC<sub>142</sub> s'est révélée la plus agressive avec des AUDPC qui sont respectivement 19855 et 33837.

Des constatations similaires ont été également signalées par **Hmouni et al (2003)** qui ont étudié l'agressivité de six souches de *B. cinerea* sur feuilles de tomate, ces souches ont été isolées à partir de quatre régions au Gharb du Maroc. Ils ont considérées deux souches comme étant les plus agressives et une souche était considérée comme la moins agressive, mais aucune différence significative n'a été détectée. **Zadehdabagh et al (2010)** ont également étudié l'agressivité de douze souches de *B. cinerea* isolées à partir de quatre régions différentes d'Iran et aucune différence significative en terme d'agressivité n'a été révélée, la souche provenant de Khuzestan et celle provenant de Gilan étaient respectivement la plus et la moins agressive. Contrairement aux résultats obtenus par **Ajouz (2011)** qui a évalué l'agressivité de 14 isolats de *B. cinerea* provenant de différents sites géographiques de France, et une différence significative a été détectée. **Bardin et al (2010)** ont étudié l'agressivité de 20 souches de provenance géographique différente sur feuilles de tomate déjà traitées par le biofongicide Serenade et une différence significative entre l'agressivité des souches a été révélée. **Mirzaeil et al (2009)** ont également détecté une différence significative de l'agressivité de 44 isolats de *B. cinerea* provenant de différentes régions géographiques d'Iran sur des feuilles de vigne.

D'après nos résultats l'Iprodione apparaît le moins efficace sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* testées, une différence significative entre ces souches a été détectée en présence de ce fongicide. Par contre, aucune différence significative n'a été détectée en présence de Teldor et de Serenade.

Contrairement aux résultats obtenus par **Hmouni et al (2003)** qui ont étudié la résistance de six souches de *B. cinerea* aux trois familles de fongicides (Benzimidazoles, Dicarboximides et Dithiocarbamates) et une différence significative entre ces six souches a été observée en présence d'Iprodione. Une plus grande efficacité des dicarboximides (l'Iprodione) sur la croissance mycélienne a été marquée. **Mouden et al (2010)** ont également étudié l'effet de six fongicides appartenant à quatre familles différentes : Benzimidazoles-

Anilinopyrimidines-Dithiocarbamates et Dicarboximides sur six souches de *B. cinerea* isolées de fraises pourries provenant de trois localités de la province du Gharb au Maroc. La croissance mycélienne était plus affectée par les Dicarboximides. Des résultats différents sont aussi obtenus par **Leroux et Gredt (1995)** qui ont étudié la résistance des souches de *B. cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines. Les  $IC_{50}$  obtenues pour toutes les souches étaient inférieures à 1,5 ppm. **Pontzen et al (1999)** ont étudié l'effet du Fenhexamid (Teldor) sur la croissance mycélienne de deux isolats de *B. cinerea* et les  $IC_{50}$  obtenues étaient inférieures à 10 ppm. Tandis que les  $IC_{50}$  obtenues dans notre étude sont comprises entre 3,4 et 11,22 ppm. Le niveau de protection des feuilles de tomate par Serenade contre *B. cinerea* a été étudié par **Badrin et al (2010)**. Une différence significative entre les souches a été révélée, contrairement à nos résultats aucune différence significative entre les souches de *B. cinerea* en termes de croissance mycélienne en présence de Serenade n'a été trouvée.

Nos résultats montrent l'efficacité de Teldor et d'Iprodione sur la germination des souches étudiées avec des  $IC_{50}$  qui sont inférieurs à 17 ppm, Par contre, Serenade s'est révélé moins efficace sur la germination des souches de *B. cinerea* avec des  $IC_{50}$  supérieurs à 20 ppm.

Des résultats similaires sont obtenus par **Ajouz (2011)** qui a étudié la variabilité de sensibilité de 204 isolats de *B. cinerea* à un antibiotique produit par les agents de lutte biologique « pyrrolnitrin », une différence de 8,4 fois en terme de  $IC_{50}$  a été détectée entre les souches les plus sensibles et les plus résistantes, cependant aucune différence significative terme de taux de germination n'a été détectée entre les isolats.

Par contre l'étude effectuée par **Hmouni et al (2003)** sur la résistance de *B. cinerea* aux fongicides (Benzimidazoles, Dicarboximides et Dithiocarbamates) a montré que la germination des souches de *B. cinerea* était peu influencée par la présence de l'Iprodione. **Pontzen et al (1999)** ont également étudié l'effet de Fenhexamid (Teldor) sur deux isolats de *B. cinerea*. Ils ont constaté que les  $IC_{50}$  de la germination de ces deux isolats étaient toutes supérieures à 10 ppm. **Leroux et Gredt (1995)** ont évalué la résistance de *B. cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines et une différence significative en termes de germination a été constatée entre les souches de *B. cinerea* étudiées.

# Conclusion

Notre étude a porté sur l'efficacité de trois fongicides : deux chimiques (Teldor, Iprodione) et l'autre biologique (Serenade). Elle a révélé une grande variabilité entre les cinq souches de *B. cinerea* issues de deux sites géographiques différents (Algérie, Europe). Cette variabilité a été mesurée par la croissance mycélienne et la germination des souches de *B. cinerea*.

D'après les résultats obtenus, on a constaté que pour les trois fongicides, la croissance mycélienne est inhibée à 100 ppm et tous les isolats se sont développés à 1 ppm. Les résultats explorés avec le test statistique de Newman-Keuls a révélé une différence significative en présence de l'Iprodione sur le test de la croissance mycélienne. Les souches d'origine Européenne présentent une certaine résistance vis-à-vis de ce fongicide alors que les souches d'origine Algérienne sont sensibles. Par contre pour les deux autres fongicides (Teldor et Serenade) une légère différence a été observée dans la cinétique de croissance des souches de *B. cinerea*. Cette différence n'est pas statistiquement significative.

Pour les résultats de test de germination des spores, aucune différence significative entre les souches de *B. cinerea* n'a été obtenue pour Teldor et l'Iprodione. Mais d'après les résultats des IC50 on remarque que ces deux fongicides sont efficaces, avec des IC50 inférieures à 20 ppm. Comme on la déjà signalé Serenade est un fongicide biologique à base de *Bacillus subtilis*. La non efficacité de Serenade peut être expliqué par le fait que le temps de génération de cette bactérie nécessite un temps supérieur par rapport à celui de notre expérimentation.

Concernant les résultats de test d'agressivité sur folioles de tomate. Les cinq souches de *B. cinerea* ont montré des niveaux d'agressivité différents, mais cette différence n'est pas statistiquement différente. Les souches d'origine Européennes se sont montré plus agressives que les souches d'origine Algérienne. En contraste à ces résultats, des travaux en cours au niveau de laboratoire de Mycologie de l'université de Bejaïa ont montré que des souches d'origine Algérienne de la même collection se sont révélées plus agressives que les souches d'origine Européennes. Ce qui confirme que les souches d'origine Algérienne sont hétérogènes.

Cette première contribution nous permet à l'issue de ces travaux d'émettre les perspectives suivantes :

-Augmenter le nombre de souches de tel sorte à avoir un screening plus représentatif, ceci passe par un échantillonnage plus large en nombre et en origine géographique.

-Choisir une gamme de fongicides conforme à ceux qui sont commercialiser en Algérie et en dans le pourtour méditerranéen.

-Réaliser des études sur des plantes entières pour les études de l'agressivité.

Une fois ces études menées, il sera possible de proposer aux agriculteurs une méthode de lutte basée sur une connaissance précise du profil des populations de ce champignon. Le but étant de rationaliser l'utilisation des pesticides.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Agrios GN. (2005).** Plant pathology. Edition: Elsevier Academic Press. Oxford. 948p.

**Aissat K, Nicot PC, Guechi A, Bardin M et Chibane M. (2008).** Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy Sustainable Development*.28 : 403–409.

**Ajouz S. (2009).** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, France,p. 4 -198.

**Ajouz S, Walker AS, Fabre F, Leroux P, Nicot PC et Badrin M. (2011).** Variability of *Botrytis cinerea* sensitivity to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents

**Andanson A. (2010).** Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes, couplage des approches théorique et empirique. Thèse Doctorat en Biologie végétale et Forestière. Université Nancy I - Henri Poincaré, Département des Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et Ecologie, Biotechnologie. 18p.

**Amselem J, Cuomo Ca, van Kan Jal, Viaud M et Benito Ep. (2011).** Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.1-27p.

**Bardin M, Comby M, Lenaerts R et Nicot PC.( 2010).**Diversity in susceptibility of *Botrytis cinerea* to biocontrol products inducing plant defence mechanisms.

**Blancard D, Laterrot H, Marchoux, G et Candresse T.( 2009).** Les maladies de la tomate, identifier connaître maîtriser. Quae éditions Paris. 571 :599 ,603.

**Blakeman JP. (1980).** Behaviour of conidia on aerial plant surfaces.115-151p.

**Brodie IDS et Blakeman JP. (1975).** Competition for carbon compounds by a leaf surface bacterium and conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 6: 125-135.

**Carisse O, Bacon R, Lasnier J, Lefebvre A, Levasseur A, Rolland D et Jobin T. (2009).** Gestion raisonnée des principales maladies de la vigne au Québec. 12p.

- Corbez R. (1990).** . Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies de des plantes. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Paris. 298 p.
- Corbaz R. (1993).** Résistance aux fongicides de *Botrytis cinerea* isolé de cultures maraîchères. Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture 24: 233-236.
- Corbaz R. (1994).** Principe de pathologie. Edition: INRA. Paris.168p.
- Davidson Ja, Suresh P, Bretag Tw, Lindbeck Kd et Gali KK. (2004).** Biology and management of *Botrytis spp.* In legume crops. In. *Botrytis: biology, pathology and control.* 295-318p.
- Debieu D, Bach J, Hugon M, Malosse C et Leroux P.(2001)** . The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)*. Pest Management Science 57 : 1060-1067.
- Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y et Nicot PC. (2009).** Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. Phytopathology. **99**, 185-193.
- Decognet V, Nicot PC, Trottin-Caudal Y et Fournier C. (1997).** Biocontrol of *Botrytis cinerea* stem infection on greenhouse tomatoes with an antagonistic strain of *Fusarium*. In: 10th congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 1997.juin .1-5; Montpellier, France. pp. 695-699.
- Deguine JP, Ferron P. (2004).** Protection des cultures et développement durable : bilan et perspectives. *Courrier de l'environnement de l'INRA.* 52 : 57-65.
- Delp CJ. (1980).** Coping with resistance to plant disease. Plant Disease 64 : 652-657.
- Dik AJ et Wubben JP. (2007).** Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. Pages 319-333 in: *Botrytis: biology, pathology and control.* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Doehlemann G, Berndt P et Hahn M .(2006).** Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. Microbiology 152: 2625-2634.

**Dubos B, Bulit J, Bugaret Y et Verdu D. (1978).**The possibilities of using *Trichoderma viride* for the biological control of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* on grapevines. Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France 14 : 1159-1168.

**Dubos B. (1999).**La pourriture grise. In Dubos, B. Maladies cryptogamiques de la vigne : champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne : Éditions Féret, Bordeaux, France, p 55-68.

**Dubos B, Jailloux F et Bulit J.( 1982).** Microbial antagonism in the control of grey mould of grapevine. Bulletin 12 : 171-175.

**Elad Y. (1996).** Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. European Journal of Plant Pathology 102: 719-732.

**Elad Y. (1997).**Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. Crop Protection 16: 635-642.

**Elad Y, Williamson B, Tudzynski P et Delen N. ( 2004).** *Botrytis spp.* and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N, *Botrytis: Biology, Pathology and Control* : Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas.1-9p.

**Elad Y et Stewart A. (2004).** Microbial control of *Botrytis spp*, p. 223-241, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Elmer PAG et Reglinski T. (2006).** Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology 55 : 155-177.

**Epton HAS et Richmond DV. (1980).** Formation, structure and germination of conidia in The biology of *Botrytis*. In Coley-Smith JR, Verhoeff K and Jarvis WR. (Eds). Academic Press, London, pp 43-83.

**Fabre F. (2001).** Lutte intégrée contre les ravageurs des cultures maraîchères a la réunion. cirad-3p, saint pierre, la réunion. 1p.

**Ferron P. (1999).** Protection intégrée des cultures : évolution du concept et de son application. Dossiers de l'Environnement de l'INRA 19 : 19-28.

**Fournier E, and Giraud T. (2008).** Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 122-132.

**Fravel DR. (2005).** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.

**Fritz R, Lanen C, Colas V, et Leroux P. (1997).** Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* 49 : 40-46.

**Hale J. (2000).** L'usage des pesticides en lutte intégrée. P1.

**Hmouni A, Oihabi A, Badoc L et Douira A. (2003).** Etude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc). *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 142, 79-100.

**Hoffland E, van Beusichem ML et Jeger MJ. (1999).** Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil* 210: 263–272.

**Holz G , Coertze S et Williamson B. (2007).** . The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. p. 9–27., in : *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.

**Jacobsen BJ. (2006).** Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents, p.133-147, in: *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. Bailey, M. J., Lilley, A. K., Timms-Wilson T. M., and Spencer-Phillips, P. T. N. Athenaeum Press, Gateshead.

**Jarvis WR. (1992).** Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society. 288p.

**Jeger Mj et Viljanen R. (2001).** The use of the area under the disease-progresscurve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theory Applied to Genetics*, 102, 32-40.

**Kohl J, Lombaers-van der Plas CH, Molhoek WML, Kessel GJT et Goossen-Van Der Geijn HM. (1999).** Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis spp.* development. *BioControl* 44: 329-346.

**Kosuge T et Hewitt WB. (1964).** Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 54: 167-172.

**Lecompte F, Abro Ma et Nicot Pc. (2010).** Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology*, 59, 891-9.

**Leroux P et Moncomble D. (1993).** Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne (2ème partie). *La Défense des Végétaux* 461 : 23-27.

**Leroux P. (1994).** Effect of pH, amino acids and various organic compounds on the fungitoxicity of pyrimethanil, glufosinate, captafol, cymoxanil and fenpiclonil in *Botrytis cinerea*. *Agronomie* 14 : 541-554.

**Leroux P. Gredt M. (1995).** Étude in vitro de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides sanilinopyrimidines

**Leroux P. (1996).** Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Science* 47 : 191-197.

**Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D et Gredt M. (1999).** Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18 : 687-697.

**Leroux P. (2003).** Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus de Biologies* 326 : 9-21.

**Martinez F, Dubos B et Fermaud M. (2005).** The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95: 692-700.

- Martinez F, Corio-Costet Mf, Levis C, Coarer M et Fermaud M. (2008).** New PCR primers applied to characterize distribution of *Botrytis cinerea* populations in French vineyards. 47:217-26.
- Martinez F, Blancard D, Lecomte P, Levis C, Dubos B et Fermaud M. (2003).** Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 109: 479-488.
- Masner P, Muster P et Schmid J. (1994).** Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. Pesticide Science 42 : 163-166.
- Messiaen Cm, Blancard, D, Rouxel, F et Lafon R. (1991).** Diseases of market garden plants. Maladies des plantes maraicheres. In. *Maladies des plantes maraicheres*.552p.
- Milaire H. (1995).** A propos de quelques définitions. Phytoma, La défense des Végétaux. 7-9 p.
- Milling RJ et Richardson CJ. (1995).** Mode of action of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. Effects on enzymes excretion in *Botrytis cinerea*. Pesticide Science 45 : 43-48.
- Mirzaei S, Mohammadi-Goltapeh E, Shams-Bakhsh M, Safaie N et Chaichi M.( 2009).** Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. Journal of Phytopathology 157: 474-482.
- Miura K, Kamakura T, Maeno S, Hayashi S et Yamaguchi I.(1994).** Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. Pesticide Biochemistry and Physiology 48 : 222-228.
- Mouden N, Benkirane R , Ouazzanitouhami A, Badoc A et Douira A. (2010).** Effet de six fongicides sur le développement de six souches de *Botrytis cinerea* isolées de fraises.
- Nicot PC, Mermier M, Vaissière BE et Lagier J. (1996).** Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light absorbing polyethylene film. Plant Disease. 80: 555-558.
- Nicot PC et Baille A. (1996).** Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in: Aerial plant surface microbiology. Morris, C. E., Nicot P. C., and Guyen-The, C. N., Plenum Press, New York, USA.

**Orth AB, Rzhetskaya M, Pell EJ et Tien M .(1995).** A serine (threonine) proteine kinase confers resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 : 2341-2345.

**Petit AN. (2008).** Effet de fongicides anti-Botrytis sur les organes végétatifs et reproducteurs de la vigne. Thèse Doctorat de Biologie et Physiologie Végétales. Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté des Sciences, Technologie, Santé. Reims. 179p.

**Pillonel C et Meyer T. (1997).** Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Science* 49 : 229-236.

**Pitchay DS, Frantz JM, Locke JC, Krause CR et Fernandez GCJ .(2007).** Impact of applied nitrogen concentration on growth of elatior begonia and new guinea impatiens and susceptibility of begonia to *Botrytis cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132: 193-201.

**Pontzen R et Hanbler G. (1999).** Effect of fenhexamid on the development of *Botrytis cinerea*.

**Pope C. ( 2006).** Contribution de la protection des plantes à l'agriculture durable, respectueuse de l'environnement.

**Richard C et Boivin G. (1994).** Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada. Société canadienne de phytopathologie et Société d'entomologie, Canada. 590p.

**Rocher F. (2004).** Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicides et d'activateurs de réactions de défense. Thèse Doctorat en chimie organique, minérale, industrielle. Université de Poitiers, faculté des sciences fondamentales et appliquées, pp.9-21.

**Ross E. Beever et Pauline L. (2007).** Weeds Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia* in *Botrytis*: biology, pathology and control. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P et Delen N. Published by Springer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 29-34.

**Rosslenbroich HJ et Stuebler D. (2000).** *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19: 557-561.

**Schumacher MM, Enderlin CS et Selitrennikoff CP. (1997).** The osmotic Locus of

*Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast. *Current Microbiology* 34 : 340-347.

**Shiraishi M, Fukutomi M et Akai S. (1970).** Effects of temperature on the conidium Germination and appressorium formation of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 36: 234-236.

**Steward TM et Long PG. (1987).** Sporulation of *Botrytis cinerea* in the dark. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 15: 389-392.

**Thomas CS et Marois JJ. (1986).** Effect of wind and relative humidity on sporulation and external mycelium formation of *Botrytis* on grape. *Phytopathology* 76: 1114.

**Van Kan Jal . (2006).** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11 : 247-53.

**Viret O. (1999).** Utilisation de fongicides contre la pourriture grise et risque de résistance. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture*, p. 49.

**West JS, Pearson S, Hadley P, Wheldon AE, Davis FJ, Gilbert A et Henbest RGC.**

**(2000).** Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology* 136: 115-120.

**Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P et van Kan J AL. (2007).** *Botrytis cinerea* : the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, pp. 561–580.

**Zadehdabagh Gh, Rokni N, Kiani S, Goltapeh ME et Danesh RY.( 2010).** Evaluation of *Botrytis cinerea* isolates for virulence on rose cutflowers in greenhouse condition in Iran.

**Zhang CQ, Zhu JW, Wei FL, Liu SY et Zhu GN .(2007).** Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables to DMIs and fenhexamid. *Phytoparasitica* 35: 300-313.



# **ANNEXES**

## **Annexe 1**

### **Composition du milieu PDA**

Jus de pomme de terre.....	200g
Agar.....	20g/l
Glucose.....	20g/l
Eau distillé.....	1l
PH.....	5,4±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

### **Composition de la gélose glucose agar**

Agar.....	15g/l
Glucose.....	10g/l
Eau distillé.....	1l
pH.....	7±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

## **Annexe 2**

### **Détermination des doses et calcul**

#### **1. Test des fongicides sur la croissance mycélienne**

- **Préparation de la solution mère des fongicides**

Pour les deux fongicides : Sérénades et Teldor

**10mg/1ml (eau distillé)      —————>      10000ppm**

Pour le fongicide : Iprodione

**10mg/1ml (acétone)      —————>      10000ppm**

Sachant que :

**1ppm=1mg/l**

## 2. Test des fongicides sur la germination

- Préparation de la solution mère des fongicides

Pour les deux fongicides : Sérénades et Teldor

1mg/1ml (eau distillé) → 1000ppm

Pour le fongicide : Iprodione

1g/1ml (acétone) → 1000ppm

### Annexe 3

#### Utilisation de l'hématimètre de Malassez pour quantifier la concentration d'une suspension de spores de champignon

Pour connaître le nombre de particule dans 1 ml (=1000 mm<sup>3</sup>)

Petit carrés : □ [X (nombre des carrés comptés)].20.10<sup>5</sup>.

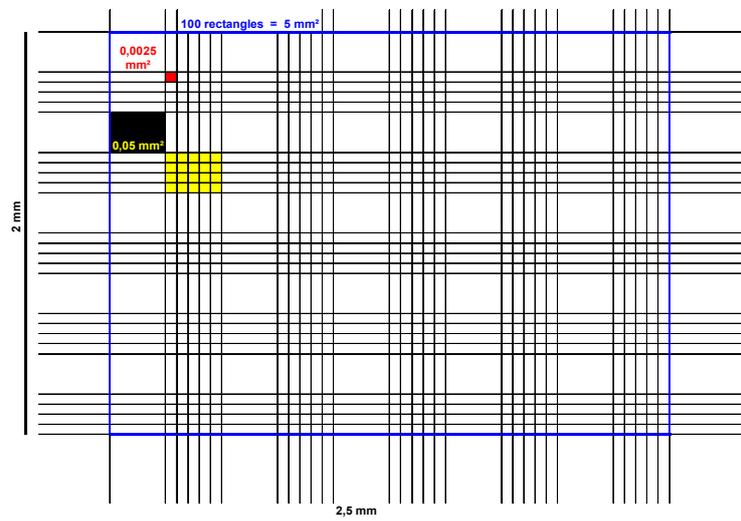
Petit rectangles horizontaux : □ [X (nombre des Petit rectangles comptés)].4.10<sup>5</sup>.

Petit rectangles verticaux : □ [X (nombre des Petit rectangles comptés)].5.10<sup>5</sup>.

Grands rectangles : □ [X (nombre des grands rectangles comptés)].10<sup>5</sup>.

Ou X est le nombre total de particules comptées.

Et voici l'apparition du quadrillage sous le microscope optique :



## Annexe 4

### Le calcul des IC50 des tests de croissance mycélienne et de germination des spores

#### a. La croissance mycélienne

croissance mycélienne						
SOUCHE	EQUATION	Y probit	a	b	Log(x)	IC 50%
ALG 20 IPR	$y = 1,995x + 3,601$ $R^2 = 0,921$	5	1,995	3,60	0,70	5 ,012
ALG 20 SER	$y = 1,290x + 4,209$ $R^2 = 0,780$	5	1,290	4,21	0,61	4,073
ALG 20 TEL	$y = 1,717x + 4,183$ $R^2 = 0,75$	5	1,717	2,47	1,48	3,020
ALG 136 IPR	$y = 1,746x + 4,083$ $R^2 = 0,884$	5	1,746	4,08	0,43	3,400
ALG 136 SER	$y = 1,667x + 4,253$ $R^2 = 0,998$	5	1,667	4,25	0,45	2,820
ALG 136 TEL	$y = 1,608x + 4,353$ $R^2 = 0,374$	5	1,608	4,35	0,40	1,380
ALG 295 IPR	$y = 1,754x + 4,068$ $R^2 = 0,854$	5	1,754	4,07	0,53	3,400
ALG295 SER	$y = 1,257x + 4,442$ $R^2 = 0,936$	5	1,257	4,44	0,44	2,754
ALG 295TEL	$y = 1,631x + 4,322$ $R^2 = 0,413$	5	1,631	4,32	0,42	2,630
BC1 IPR	$y = 0,992x + 3,955$ $R^2 = 0,901$	5	0,992	3,96	1,05	11,220
BC1 SER	$y = 1,263x + 4,269$ $R^2 = 0,902$	5	1,263	4,27	0,58	3,800
BC1 TEL	$y = 0,896x + 4,449$ $R^2 = 0,321$	5	0,896	3,55	1,61	4,074
BC142 IPR	$y = 1,300x + 3,798$ $R^2 = 0,906$	5	1,300	3,80	0,92	8,511
BC142 SER	$y = 0,763x + 4,797$ $R^2 = 0,157$	5	0,763	4,80	0,27	2,200
BC142 TEL	$y = 0,659x + 3,980$ $R^2 = 0,2$	5	0,659	3,98	1,55	2,042

## B .La germination des spores

Germination						
SOUCHE	EQUATION	Y probit	a	b	Log (x)	IC 50%
ALG 20 IPR	$y = 1,9364x + 5,7641$ $R^2 = 0,776$	5	1,9364	5,7641	-0,395	<b>0,31</b>
ALG 20 SER	$y = 0,8307x + 3,7693$ $R^2 = 0,483$	5	0,8307	3,7693	1,4815	12,95
ALG 20 TEL	$y = 0,4025x + 4,7846$ $R^2 = 0,316$	5	0,4025	4,7846	0,5352	8,37
ALG 136 IPR	$y = 1,4236x + 4,5408$ $R^2 = 0,595$	5	1,4236	4,5408	0,3226	0,77
ALG 136 SER	$y = 0,31x + 3,6665$ $R^2 = 0,175$	5	0,31	3,6665	4,3016	>20
ALG 136 TEL	$y = 0,7087x + 4,4338$ $R^2 = 0,725$	5	0,7087	4,4338	0,7989	2,32
ALG 295 IPR	$y = 2,0878x + 4,9616$ $R^2 = 0,889$	5	2,0878	4,9616	0,0184	1,55
ALG295 SER	$y = 0,072x + 2,9646$ $R^2 = 0,145$	5	0,072	2,9646	28,269	>20
ALG 295TEL	$y = 1,0079x + 4,6985$ $R^2 = 0,918$	5	1,0079	4,6985	0,2991	2,37
BC1 IPR	$y = 0,7902x + 3,8588$ $R^2 = 0,979$	5	0,7902	3,8588	1,4442	16,25
BC1 SER	$y = 0,6877x + 3,7799$ $R^2 = 0,780$	5	0,6877	3,7799	1,7742	>20
BC1 TEL	$y = 1,0063x + 4,7481$ $R^2 = 0,834$	5	1,0063	4,7481	0,2503	1,07
BC142 IPR	$y = 0,0017x + 4,8935$ $R^2 = 9E-06$	5	0,0017	4,8935	62,647	0,46
BC142 SER	$y = -0,3246x + 4,4535$ $R^2 = 0,213$	5	0,3246	4,4535	1,6836	>20
BC142 TEL	$y = 0,2908x + 5,2156$ $R^2 = 0,777$	5	0,2908	5,2156	-0,741	0,23

L'équation de régression s'écrit sous la forme suivante :  $Y = a \log x + b$

Donc pour déterminer les IC50 on a :

$$\text{Log } X = (y - b) / a$$

$$\text{IC50} = \exp (\log x)$$



## Résumé

La pourriture grise de la Tomate occasionnée par les attaques de *Botrytis cinerea* continue à provoquer d'importants dégâts en raison de sa capacité rapide de développer des résistances à plusieurs familles de fongicides chimique ou d'origine naturelle, En absence de variétés de Tomates résistantes à ce pathogène, le contrôle de cette maladie est basé sur l'usage répété des fongicides. L'étude de la sensibilité de cinq souches provenant de deux régions différentes (Algérie et Europe) aux principaux fongicides chimiques (Iprodione et Fenhexamid) et biologique (Serenade : *Bacillus subtilis* QST 713) commercialisés dans le marché a révélé une efficacité relative des trois fongicides utilisés. La croissance mycélienne est inhibée à 100 ppm. Tous les isolats testés se sont développés à 1 ppm. Néanmoins, les concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> de la croissance mycélienne les plus faibles ont été notées en présence de Fenhexamid et Serenade. La germination des spores est fortement affectée par Fenhexamid et Iprodione avec des IC<sub>50</sub> inférieures à 20 ppm, en revanche Serenade est avéré moins efficace sur la germination avec des IC 50 supérieures à 20 ppm.

L'agressivité des souches est testées sur des folioles de tomate, le résultat obtenus a révélé que le niveau d'agressivité des souches d'origine d'Algérie était inférieur à celui trouvé pour les souches d'origine d'Europe avec des AUDPC de 26332 et 30577 respectivement, aucune corrélation entre l'agressivité et la résistance aux fongicides n'a été constatée.

*Mots clés* : *Botrytis cinerea*, résistance, fongicides, croissance mycélienne, germination, agressivité.

## Abstract

Gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea* attacks continues to cause major damage because of its rapid ability to develop resistance to several families of chemical fungicides or natural origin, in absence of tomato varieties resistant to this pathogen, the control of this disease is based on the repeated use of fungicides. The study of the sensitivity of five strains from two different regions (Europe and Algeria) to the main chemical fungicides (Iprodione and fenhexamid) and biological (Serenade: *Bacillus subtilis* QST 713) are sold in the market showed a relative efficiency vis--vis the three fungicides. Mycelial growth is inhibited at 100 ppm. All strains tested are grew to 1 ppm. However, the inhibitory concentrations IC<sub>50</sub> of mycelial growth were the lowest recorded in the presence of fenhexamid and Serenade. Spore germination is strongly affected by fenhexamid and Iprodione with IC<sub>50</sub> less than 20 ppm; however Serenade was less effective on the germination with IC 50 values above 20 ppm.

The aggressiveness of the strains was tested on tomato leaflets, the obtained results revealed that the level of aggressiveness of the original strains from Algeria was lower than that found in strains of European origin with AUDPC of 26,332 and 30,577 respectively, no correlation between aggressiveness and fungicide resistance was observed.

Key words: *Botrytis cinerea*, resistance, fungicides, mycelial growth, germination, aggressiveness.

