

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Ecologie Microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Étude de la résistance de certaines souches de
Botrytis cinerea isolées de serres de tomate aux
différents fongicides**

Présenté par :
HAMOUMA Syla
Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr. RAMDANI Nacer	MAA	Président
Mr. ADJEBLI Ahmed	MCB	Encadreur
Mr. BELHADI Djellali	MAA	Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant, de m'avoir accordé la force, le courage, la santé, la volonté et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier vivement mon encadreur pour m'avoir orienté et aidé à réaliser ce travail avec rigueur et patience.

Je le remercie pour son encadrement très précieux, sa disponibilité, ses conseils, et pour la confiance qu'il m'a accordée. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et tout mon respect.

J'adresse ma gratitude aux membres de jury pour avoir bien voulu examiner ce travail

Mes remerciements s'adressent également à :

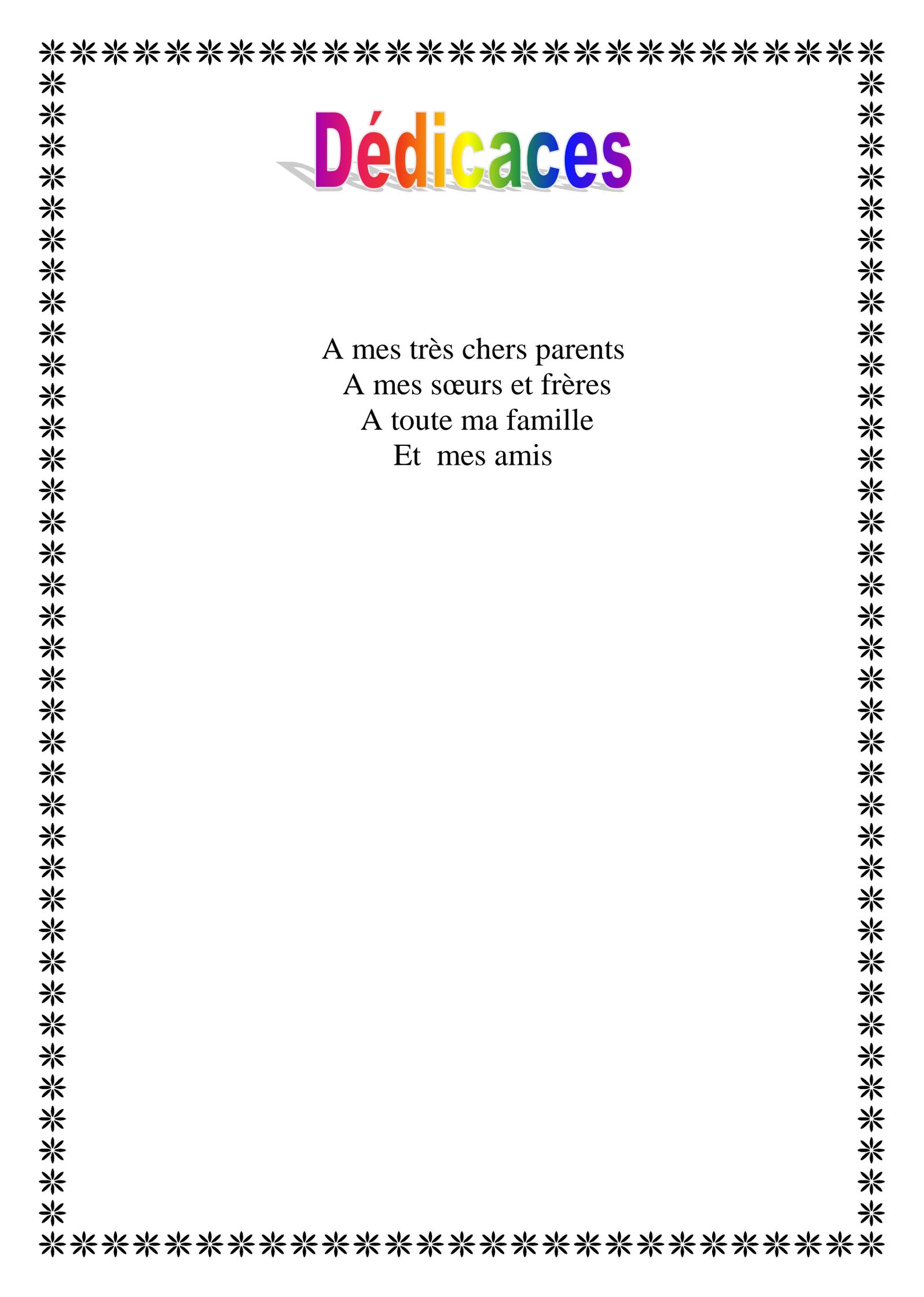
Le président de jury **M^R RAMDANI N.** de m'avoir consacré son temps en me faisant l'honneur d'accepter de présider comme jury. Comme je tiens à remercier **M^R BELHADI D.** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les enseignants qui m'ont accompagné durant tout mon cursus.

Je tiens à remercier vivement la famille DJAHNINE, en particulier Walid, pour leur aide.

Toute ma gratitude va enfin à mes parents pour leur soutien tout au long de ma vie.

En fin, que toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes remerciements.



Dédicaces

A mes très chers parents
A mes sœurs et frères
A toute ma famille
Et mes amis

Liste des figures

Figure 01 : Symptômes de la pourriture grise causée par <i>B. cinerea</i> sur différentes plantes hôtes.....	5
Figure 02 : Symptômes de la pourriture grise sur tomate	6
Figure 03 : Formation <i>in vitro</i> (à gauche) et <i>in vivo</i> (à droite) de sclérotas de <i>B.cinerea</i> ...7	
Figure 04 : Cycle de développement (forme asexuée) de <i>B. cinerea</i>	8
Figure 05 : Observation de <i>B. cinerea</i> (forme asexuée) au microscope optique	9
Figure 06 : Revivification et repiquage des isolats de <i>B.cinerea</i> sur milieu PDA	16
Figure 07 : Culture d'une souche de <i>B.cinerea</i> sur milieu PDA après 7 jours d'incubation	17
Figure 08 : Test d'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> sur les feuilles de tomate	18
Figure 09 : Résultats de pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> par le Méthylthiophanate sur milieu PDA	20
Figure 10 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois haplotypes de <i>B. cinerea</i> par Méthylthiophanate	21
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> par le Carbendazime sur milieu PDA	22
Figure 12 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois haplotypes de <i>B. cinerea</i> par Carbendazime.....	23
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> par les trois fongicides sur feuilles de tomate.....	24
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois haplotypes de <i>B. cinerea</i> par les trois fongicides	25

Liste des tableaux

Tableau 01 : Répartition des souches selon leur génotype.....15

Tableau02 : fongicides et concentrations retenues.....16

Glossaire

A

Agressivité : Pouvoir pathogène d'un parasite défini par rapport à la résistance horizontal de variétés de l'hôte.

Apothécie : Réceptacle en forme de coupe des champignons ascomycètes, constituant un organe reproducteur où se forment les spores.

Ascomycète : Groupe de champignons produisant leur spore sexuée, les ascospores, par l'intermédiaire d'asque.

Appressoria : système utilisé par les champignons pour pénétrer dans une cellule hôte (plante) : après la sporulation, la spore va adhérer à la surface de la plante et va germer.

C

Conidies: Spore issue de la multiplication asexuée formée à l'extrémité d'un conidiophore.

Conidiophore: Hyphe aérien spécialisé qui produit à son extrémité plusieurs conidies.

D

Deutéromycète : Groupe artificiel ne constituant pas une vraie classe de champignon, la reproduction sexuée est inconnue ou ne peut être obtenue facilement avec les techniques de cultures habituelles (champignon imparfaits).

F

Fructification : phénomène de transformation par fécondation des fleurs en fruits.

H

Haplotype : Ensemble de souches présentant le même profil génotypique.

Hyphe : Filament dépourvu de chlorophylle constituant le thalle des champignons

I

Inoculum : Terme générique qui désigne tout élément d'un parasite capable d'infecter l'hôte.

Isolat: Matériel biologique prélevé sur un organisme vivant, en vue de son étude ou de sa culture in vitro.

M

Mycélium: Appareil végétatif d'un champignon constitué d'un ensemble d'hyphes.

N

Nécrose : forme de dégât cellulaire qui mène à la mort prématurée et non programmée¹ des cellules dans le tissu vivant.

Nécrotrophe: Organisme pathogène dont la première phase au moins de l'installation nécessite la nécrose des tissus.

P

Plante hôte: Espèce de plante dont dépend le développement d'un organisme (source nutritive).

Phénotype: Aspect observable d'un organisme déterminé par son génotype et l'environnement.

Phytopathogène : Qui cause une maladie chez les plantes.

Polyphage : Un pathogène pouvant avoir plusieurs organismes hôtes.

S

Saprophyte: Se dit d'un organisme tirant sa nourriture de la matière organique en décomposition.

Sclérotés : Masse compacte de mycélium aggloméré, souvent de couleur brune à noire, adaptée à la survie en conditions défavorables.

Souche: Microorganisme fongique ou bactérien échantillonné sur un hôte infecté et qui a été caractérisé génotypiquement et/ou phénotypiquement.

T

Téléomorphe : Forme sexuée d'un champignon, appelée aussi « stade parfait », aboutissant après la fusion nucléaire à la formation d'ascospores.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Glossaire

Introduction 1

Chapitre I : synthèse bibliographique

I. Présentation du model *Botrytis cinerea*..... 3

I.1. Historique et taxonomie..... 3

I.2. Gamme d'hôte et symptômes..... 4

I.3. Cycle de développement et dissémination 6

II. Les facteurs influençant le développement de *B. cinerea*..... 10

II.1. Facteurs abiotiques..... 10

II.1.1. Les facteurs climatiques..... 10

II.1.2. La lumière et le pH 10

II.1.3. Les exigences nutritives 11

II.2. Facteurs biotiques 11

II.2.1. L'état physiologique de la plante hôte 11

II.2.2. l'irrigation 11

III. Méthodes de lutte..... 12

II.1. Lutte culturale..... 12

II.2. Lutte chimique..... 13

II.3. Lutte biologique 13

II.4. Lutte intégrée	14
----------------------------	----

Chapitre II : matériels et méthodes

I. Matériels fongiques	15
II. Etude du développement des isolats de <i>B. cinerea</i> <i>in vitro</i> en présence de fongicide sur milieu PDA.....	15
II.1. Production des implants mycéliens	15
II.1.1. Revivification des souches de <i>B. cinerea</i>	15
II.1.2. Purification des souches de <i>B. cinerea</i>	15
II.2. Les fongicides utilisés	16
II.3. Test d'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> sur des folioles détachés de tomate.....	17
II.3.1. Inoculations des feuilles	17
II.3.2. Quantification des lésions.....	18
VI. Traitement des données	19

Chapitre III : résultats et discussion

I. Test de résistance des souches de <i>B. cinerea in vitro</i>	20
I.1. Effet du Méthylthiophanate sur la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i>	20
I.2. Effet du Carbendazime sur la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i>	21
I.3. Effet du Manèbe sur la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i>	23
II. Test de résistance des isolats de <i>B. cinerea</i> aux fongicides sur les feuilles détachées de tomate	
III. Discussion	25
Conclusion	28
Références bibliographiques	30

Introduction

Introduction :

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) est l'une des espèces végétales la plus cultivée au monde (Blancard et al., 2009 ; Bergougnoux, 2014). Elle est considérée comme premier légume après la pomme de terre et deuxième ressource alimentaire mondiale après les céréales. En Algérie, elle a été introduite par les espagnols au XVIIème siècle et n'a cessé de progresser régulièrement ces dernières décennies (Benabadji, 1977). La tomate peut être produite sous des conditions de culture très variées et peut être consommée en frais ou transformée en industrie (Causse et al., 2000). Cependant, son rendement et sa qualité sont gravement compromis par des maladies causées par divers phytopathogènes, fongiques, bactériens et viraux (Yao et al, 2011).

La pourriture grise, causée par *Botrytis cinerea* est l'une des maladies la plus redoutable et les plus destructives de la tomate (Leroux et al., 1999); ce pathogène, responsable de la maladie, est un champignon omniprésent dans l'environnement (Elad et al., 2007) et capable de s'attaquer à une très grande variété de plantes hôtes, Il est capable de se développer aussi bien en saprophyte, sur des débris végétaux, qu'en parasite, aux dépens d'une plante vivante, (Dubos, 2002) et ainsi, causer la pourriture grise des feuilles, des pétioles, des tiges et des fruits (Kalogiannis et al., 2006), sous serre et en plein champ, mais elle est particulièrement sévère dans les conditions de lumière faible et d'humidité élevée des serres (O'Neill et al., 1997).

La lutte contre le champignon phytopathogène *B. cinerea*, repose essentiellement sur les moyens chimiques tels l'utilisation de fongicides (Hmouni et al., 2003). Depuis les années 1950, plusieurs de ces fongicides de synthèse ont été utilisés d'une manière excessive. Cette utilisation abusive a engendré l'apparition d'individus résistants dans les différentes populations de ce champignon (Leroux et al., 2002). De nos jours, la résistance aux fongicides prend de plus en plus d'ampleur au niveau mondial (Leroux et al., 2010).

Afin d'étudier le développement accéléré de la résistance aux fongicides, d'améliorer nos connaissances sur le sujet, et de mieux gérer l'utilisation des fongicides, nous avons étudié l'influence de trois fongicides sur la croissance mycélienne de quelques isolats de *B. cinerea*, et évaluer l'agressivité de ces isolats sur des feuilles de tomate.

Pour se faire, nous avons choisi trois haplotypes différents. Un ensemble de trois fongicides ont été sélectionnés pour notre étude sur la base de leur utilisation fréquente en agriculture et nous avons émis les hypothèses suivantes :

- Existe-il une relation entre le profil de résistance des souches de *B.cinerea* et le profil haplotypique ?
- Au sein du même haplotype, les souches *B.cinerea* présentent-elles le même profil de résistance aux différents fongicides ?

Synthèse bibliographique

I. Présentation du modèle *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers est un pathogène cosmopolite et très polyphage qui provoque de grave perte dans les cultures de nombreux fruits, légumes et plantes ornementales (Schwinn, 1992) et qui peut être particulièrement plus sévère dans les cultures sous serres (Jarvis, 1980). C'est un phytopathogène aérien qui colonise les débris végétaux (parties de plantes sénescents ou mortes), s'y développe vigoureusement, et à partir de cette base contamine les organes verts et sains (Lafon et al., 1970). De ce fait, il est considéré comme un champignon necrotrophe (Martinez et al., 2005) et saprophyte du sol et des débris végétaux en décomposition (Melvin et al., 2006).

L'étymologie de son nom fait référence directement à sa morphologie : « *Botrytis* » signifie « en forme de grappe », indiquant ainsi la morphologie des conidiophores, et « *cinerea* » renvoie à la couleur gris cendrée de la sporulation (Walker, 2013).

I.1. Historique et taxonomie

Le genre *Botrytis* a été reconnu pour la première fois en 1729 par Pier Antonio Micheli. Au début, il a été confondu avec *Sclerotinia spp.* Des précisions ont été apportées par Smith en 1900 pour que la confusion se dissipe par Whetzel en 1945 (Hennebert 1973). Le genre a été redéfini, définitivement, en 1973 par Hennebert et comprend plus de 20 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôtes restreint, comme par exemple *B. tulipae* (tulipes), *B. fabae* (légumineuses), *B. squamosa* (oignons) ; contrairement à *B. cinerea* qui est un champignon ubiquiste et très polyphage (Elad et al., 2007).

La classification de ce champignon connaît une double classification (Ibrahim-Ghaleb, 1990) :

- La forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (De Barry) Wetzl. C'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- La forme imparfaite (anamorphe), *B. cinerea* Pers. Un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae

Les travaux de la fin des années 90 ont montré que l'espèce *B. cinerea* ne constituait pas une entité monomorphe, mais qu'elle pouvait être subdivisée en au moins deux groupes inféodés à des espèces cryptiques (Giraud et *al.*, 2005). Deux principaux groupes génétiques coexistent 'Groupe I' et 'Groupe II', L'espèce « Groupe I » (nouvelle espèce ; nom proposé *B. pseudocinerea*) a été caractérisée comme naturellement résistante au fongicide fenhexamid à cause d'un mécanisme original permettant à cette espèce de métaboliser cette molécule toxique (Billard et *al.*, 2011) et regroupe des isolats présentant une compatibilité végétative entre eux, c'est-à-dire ayant la capacité de former un hétérocaryon viable par la fusion des hyphes (Fournier et *al.*, 2005). L'espèce « groupe II » a été divisée en deux types, *transposa* et *vacuma*. Le type *transposa* présente deux éléments transposables à la différence du type *vacuma*, « Boty » et « Flipper » (Giraud et *al.*, 1999). De plus, d'autres différences phénotypiques ont été démontré entre les deux types: les isolats '*transposa*' ont des petites macroconidies en comparaison des isolats *vacuma*, sont plus souvent résistants à la vinclozoline et au diethofencarbe, et présentent des taux de développement mycélien plus lent lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu riche en nutriments (Martinez et *al.*, 2003).

I.2. Gamme d'hôte et symptômes

B. cinerea est un champignon qui a la particularité d'être polyphage et ainsi de s'attaquer à diverses plantes dès que les conditions climatiques lui sont favorables (Tudzynski et *al.*, 2004). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ et à n'importe quel stade de leur développement ainsi qu'en période de stockage (Elad et *al.*, 1997).

B. cinerea peut s'attaquer à une grande variété de plantes hôtes. On lui dénombre environ 586 espèces (Elad et *al.*, 2016) (**Figure 1**) Ce champignon est responsable de lourdes pertes économiques sur de nombreuses cultures (Dean et *al.*, 2012).

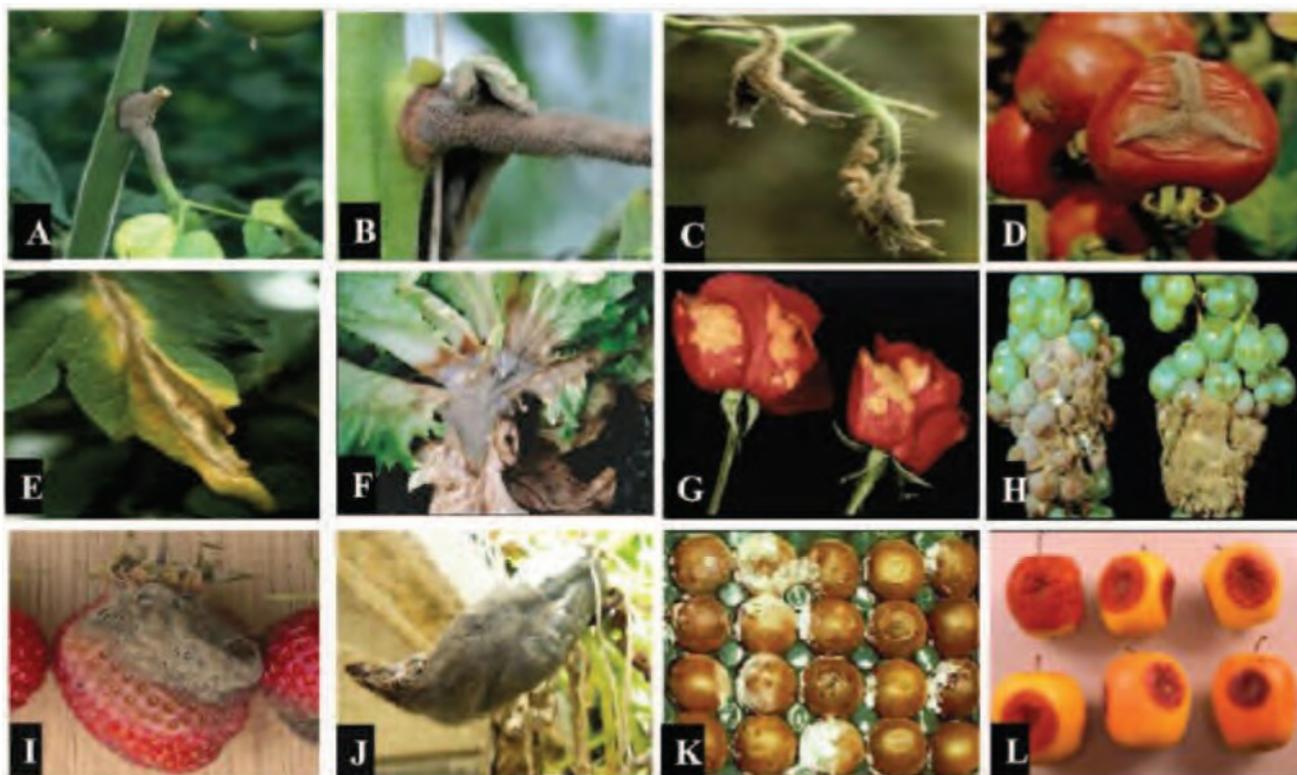


Figure 1: Symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. sur différentes plantes et des organes. (A) Plaie d'ébourgeonnage sur tomate. (B) Tige de tomate. (C) Inflorescence. (D) Fruit de tomate. (E) Feuille de tomate. (F) Laitue. (G) Fleurs du rosier. (H) Grappe du raisin. (I) Fraise. (J) Poivron. (K) Kiwi. (L) Pomme (Agrios, 2005).

Sur les cultures de tomate, *B. cinerea* affecte toute les parties de la plante, Les attaques de pourriture grise peuvent provoquer une diversité de symptômes (Williamson *et al.*, 2007), et touche toutes les parties de la plante comprenant les feuilles, tiges et les fruits, et souvent cause des dégâts très importants (Eden *et al.*, 1996) :

- Symptômes sur feuilles : Sur les feuilles, *B. cinerea* peut provoquer des nécroses et des lésions et laisse apparaitre des tâches brunes à l'extrémité des folioles permettant ainsi l'apparition d'un duvet grisâtre sur la feuille. Lors d'une épidémie grave, le feuillage entier va être détruit (Elad *et al.*, 1995).
- Symptômes sur les fruits : l'infection commence à la pointe florale ou au bout du pédoncule. Une couche de champignon d'une couleur grise a tendance à se former rapidement lorsque les conditions d'humidité sont élevées. Dans ce cas

une pourriture molle aqueuse va altérer le fruit (Elhadi, 2012), qui, dans ce cas tombe et sert de source d'inoculum dans la serre (Elad et al., 1995). Sur les tomates, le pathogène induit également un symptôme nommé «fantôme», ce type de symptôme est associé au système de défense successif de la plante caractérisé par de petites lésions nécrotiques, généralement entourées d'un halo lumineux. Les points fantômes peuvent être dispersées dans tout le fruit, affectant ainsi sa qualité (Elad et al., 2007).

- Symptômes sur tiges : lorsque la tige est envahit par *B.cinerea*, le plant meurt entièrement ce qui va engendrer des pertes de rendement (Elad et al., 1995). A ce niveau, l'infection aura lieu à la faveur d'une blessure, et commence généralement à la base des pétioles de la feuille (Elhadi, 2012).
- Symptômes sur fleurs : lorsqu'une fleur est infectée elle avorte et ne produit pas de fruit, cette infection, dans certains cas, se développe pour atteindre également la tige (Elad et al., 1995).



Figure 2: Symptômes de la pourriture grise sur tomate (Source : INRA, Avignon. France)

I.3. Cycle de développement et dissémination

Au cours de son cycle biologique, *B. cinerea* peut produire du mycélium, des spores sexuées, des spores asexuées (conidies), ainsi que des sclérotés (Agrios, 2005 ; Ajouz, 2009).

B.cinerea se reproduit majoritairement par la voie asexuée (Nicot et Alain, 1996). Durant l'hiver, le champignon se conserve principalement sous forme de sclérote dans les débris morts de l'hôte, la plupart du temps les feuilles tombées au sol (Elad et *al.*, 2007). Les sclérotés sont d'abord blancs, puis ils brunissent et enfin noircissent, par la suite leur surface est brillante et marquée de fines ponctuations régulières (**figure 3**) (Ibrahim-Ghaleb, 1999).

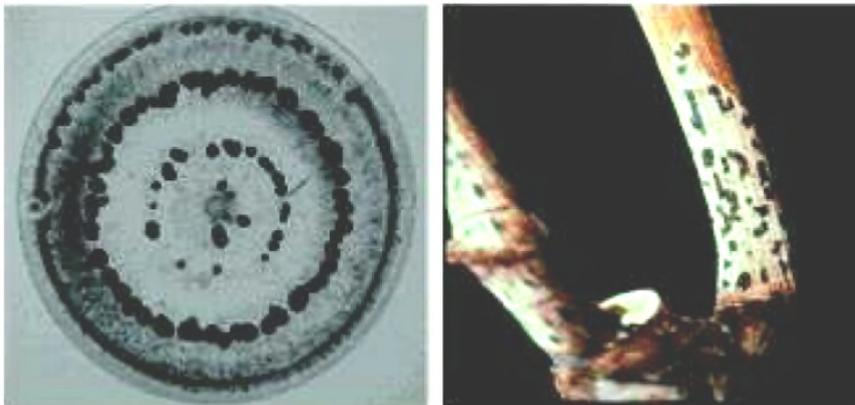


Figure 3 : Formation *in vitro* (à gauche) et *in vivo* (à droite) de sclérotés de *B.cinerea* (INRA, Avignon. France)

Lorsque les conditions de température et d'humidité redeviennent favorables à la végétation, les sclérotés germent, leur croissance commence au début du printemps dans les régions tempérées (Elad et *al.*, 2007), pour produire du mycélium qui va perforer la cuticule végétale grâce à ses appressoria (Williamson *et al.*, 2007). Il y aura par la suite le développement des conidiophores portant des macroconidies (spores asexuées) qui serviront d'inoculum primaire (**figure 4**) (Romanazzi et Erica, 2004).

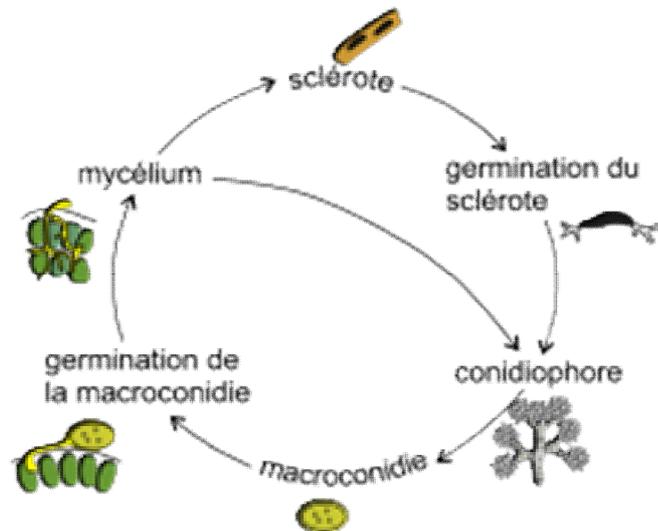


Figure 4 : Cycle de développement (forme asexuée) de *Botrytis cinerea* (INRA, Avignon, France)

B. cinerea peut aussi se conserver dans les débris de plantes de la culture précédente sous forme de mycélium, durant l'hiver, pour par la suite produire des conidies et servir d'inoculum primaire (Beever et Weeds, 2004). Les conidies apparaissent une fois les conditions sont rétablies (**figure 5**), leur développement se manifeste par la production de conidiophores dressés en touffes, constituant un feutrage intense gris, le mycélium dans ce cas est dit « au stade de fructification » (Williamson et *al.*, 2007).

Les conidies ont une part importante dans la dissémination du champignon (Elad et *al.*, 2007). Elles sont produites dès le printemps dans le cas de culture en plein champ, et peuvent être produites continuellement dans le cas de cultures sous abris. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz et *al.*, 2003).

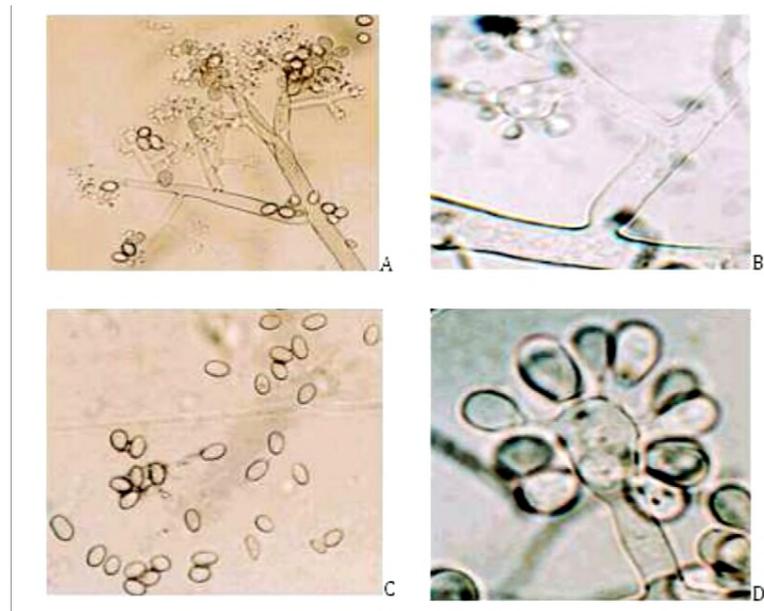


Figure 5 : Observation de *B. cinerea* (forme asexuée) au microscope optique (Elhadi, 2012).

Une autre voie de développement de la pourriture grise existe mais elle est très rare, même quasi inexistante, c'est la reproduction sexuée par la production des apothécies (Elad et *al.*, 2007).

L'infection par *B.cinerea* commence généralement sur les fleurs sénescentes puis se propage sur les fruits adjacents en développement (Elad et *al.*, 2007). Le Botrytis est surtout considéré comme un saprophyte qui s'attaque d'abord aux cellules altérées (blessures mécaniques ou d'insectes, dessèchement) pour ensuite envahir les tissus sains (Elmer et Michailides, 2004). Lorsque les conditions sont favorables ce champignon peut produire plusieurs millions de spores dans quelques jours sur des plantes malades. Ces spores sont facilement dispersées par les courants d'air et peuvent provoquer un développement rapide des épidémies (Leyronas et *al.*, 2015).

Une fois l'infection de l'hôte par *B.cinerea* est établie, une multitude de symptômes peut apparaître. Il s'attaque aux fleurs, aux pédoncules et aux fruits à toutes les étapes de la croissance de la plante, entraînant ainsi leur pourriture et la formation d'une couche uniforme de matière soyeuse épaisse et grise qui abrite les spores (Agrios, 2005).

Dans le cas de la tomate, la contamination aura lieu lorsque les conidies de *B.cinerea* entrent en contact avec celle-ci. Dans le cas où la cuticule de la tomate est intacte les conidies peuvent rester longtemps en surface de la tomate sans causer la maladie. En présence de lésions de surface ou de tissus sénescents, les conidies germent (Wills *et al.*, 2007).

II. Les facteurs influençant le développement de *B. cinerea*

De nombreux facteurs dans les systèmes de production en serre peuvent influencer le développement de *B.cinerea*.

II.1. facteurs abiotiques

II.1.1. les facteurs climatiques

La température et l'humidité relative (RH) ont toutes les deux un effet direct sur les épidémies de *B. cinerea*, mais dans les serres l'effet du climat constitue généralement un effet combiné des deux (Dik et Wubben, 2007).

II.1.1.1. La température

B. cinerea peut prospérer dans une gamme de température allant de 12 à 30°C. La température joue, donc, un rôle très important sur le comportement de ce pathogène, surtout sur la vitesse de croissance du mycélium et la formation des sclérotés (Dik et Wubben, 2007). La vitesse de croissance augmente proportionnellement à la température. Pour un développement optimal du champignon, les températures doivent s'étendre de 20 à 30°C (Shiraishi *et al.*, 1970 ; Ajouz, 2009). *B. cinerea* représente, donc, toujours une menace potentielle dans les cultures de serre à cause des conditions climatiques qui y règnent (Dik, 2007).

II.1.1.2. L'humidité

L'humidité relative (HR) est un facteur environnemental crucial pour *B. cinerea* (Lafon et Bulit, 1970). Le développement de ce pathogène est favorisé par un taux d'humidité élevé (Hygrométrie atmosphérique de 80 à 90%) (Corbez, 1994).

II.1.2. La lumière et le pH

B. cinerea est accommodant, il semble être tolérant vis-à-vis des variations du pH, et peut se développer à des valeurs de pH neutres, légèrement acides à légèrement alcalins. Quant à la lumière, elle favorise la germination et pourrait contribuer à la pénétration du champignon dans l'hôte (Lafon et Bult, 1970). La lumière, surtout UV augmente la sporulation de *B. cinerea* (Dik et Wubben, 2007), tandis que l'irradiation de la lumière bleu et violette inhibe la croissance de son mycélium (Nicot et al., 1996).

II.1.3. Exigences nutritives

Pour mieux se développer, *B. cinerea* nécessite la présence d'une source exogène de nutriment, que ce soit pour la germination des spores, le développement du mycélium, ou la formation des appressoria (Li et al., 2004). La présence du carbone est nécessaire à la germination (Blakeman, 1975). Quant à l'azote, sa présence dans le sol avec un taux élevé stimule le développement des plants de tomate et réduit l'incidence de l'infection par *B. cinerea* (Verhoeff, 1968).

II.2. Facteurs biotiques :**II.2.1. État physiologique de la plante hôte**

L'infection par *B. cinerea* est favorisée par la présence d'une porte d'entrée, d'une blessure sur la plante hôte, ou encore la présence de tissus faibles tels que les pétales des fleurs (Jarvis, 1977). Comme il se peut que le champignon pénètre dans la plante par le biais des ouvertures naturelles telles que les stomates (Wei, 1995).

II.2.2. L'irrigation

Dans les cultures denses telle que celle de la tomate, l'incidence de la moisissure grise peut être plus élevée. Le système d'irrigation de la tomate a été démontré pour influencer l'apparition et le développement de la moisissure grise sur les tiges. Lorsque l'irrigation a été effectuée du lever au coucher du soleil l'incidence de la maladie était beaucoup plus élevée que dans un régime avec la même quantité d'irrigation appliqué de 1 à 2 heures après le lever du soleil jusqu'à 1 ou 2 heures avant le coucher du soleil (Dik et Wubben, 2007).

Des études ont montrée que le type d'irrigation peut influencer le développement de la pourriture grise. Dans la production de tomate sous serre, le système d'irrigation goutte-à-goutte peut remplacé le système traditionnel à la rigole ce qui permettra d'avoir un effet bénéfique dans le contrôle de *B. cinerea* (Aissat et *al.*, 2008).

III. Méthodes de lutte

La lutte contre la pourriture grise nécessite une combinaison de plusieurs moyens. Les méthodes de lutte telles que les techniques culturales (Elad et *al.*,2007), la gestion du climat (Jeannequin et *al.*, 2011), et la lutte chimique sont développées (Billard et *al.*, 2011), tandis que la lutte biologique est abordée comme une perspective prometteuse (Hmouni et *al.*, 2005).

III.1. Lutte culturale

Dans les systèmes de production agricole, l'atténuation de l'incidence de la moisissure grise peut être réalisée à travers l'application d'un ensemble de pratique culturale (Williamson et *al.*, 2007).

Dans les serres de tomate, plusieurs démarches sont à préconiser :

- Une ventilation quotidienne est recommandée afin d'éviter ou limiter l'accumulation d'excès d'humidité résultant de la transpiration de la culture. Une bonne pratique est de procéder à l'ouverture manuelle ou automatisée des événements formés sur les cotés ou sur le toit de la serre (Jarvis, 1992).
- Il est préférable d'appliquer l'élagage en coupant les feuilles au ras de la tige sans laisser de fragments de pétioles; les plants de tomate, dans ce cas, sont moins susceptibles d'être infectées par *B. cinerea* (Martin et *al.*, 1994).
- l'utilisation de film absorbant les UV réduit l'incidence de la moisissure grise (Honda et *al.*, 1977).
- L'application des bonnes pratiques d'assainissement est très avantageuse dans la réduction de l'inoculum de ce champignon dans les serres (Dik et *al.*, 2007).
- Un effeuillage régulier est très bénéfique en assurant une bonne circulation d'air et une réduction de l'hygrométrie (Decognet et *al.*, 2009).

- Il est très important de contrôler la fertilisation afin de pouvoir limiter le développement de *B. cinerea* (Elad et al., 1992).

II.2. Lutte chimique

La lutte chimique constitue la principale méthode de contrôle pour réduire l'impact de la pourriture grise sur les cultures dans le monde (Leroux et al., 2004). Elle est définie par l'utilisation de fongicides pour tuer le champignon ou réduire sa nocivité.

En absence de variétés de tomates résistantes à ce pathogène, le contrôle de cette maladie est basé sur l'usage répété de ces fongicides, comme par exemple des benzimidazoles et des dicarboximides, qui n'empêchent pas des pertes considérables de rendement, surtout en cultures abritées (Hmouni et al., 2003).

Le mécanisme d'action de ces produits peut survenir à différents niveaux du fonctionnement de l'organisme, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stéroïdes ou la division cellulaire (Rocher, 2004). L'application du traitement sur les plantes peut se faire de manières différentes, la pulvérisation sur le feuillage est une méthode de lutte très fiable (Bhatt et Vaughan, 1962) ; bien que les souches de *B.cinerea* tendent à devenir résistantes aux substances chimiques habituellement utilisées (Hmouni et al., 2005), on a l'exemple des dicarboximides, relativement plus efficaces, ont été confrontés au phénomène de résistance (Hmouni et al., 2003).

L'application de la lutte chimique est devenue de plus en plus inapplicable, ceci est le résultat de plusieurs facteurs, tels que l'apparition de résistance dans les populations de champignons (Hmouni et al., 2003), le coût élevé des fongicides, leurs effets sur l'environnement, ainsi que leur incompatibilité avec l'agriculture durable (Mouden et al., 2010). De ce fait, les préoccupations environnementales et sanitaires résultantes de l'utilisation prolongée des pesticides exigent une bonne gestion de l'utilisation de ces produits (Wahab, 2015). La tendance actuelle est d'adopter d'autres alternatives (Saldajeno et al., 2014).

II.3. Lutte biologique

Une autre méthode utilisée pour lutter contre la pourriture grise est le contrôle via les méthodes biologiques (Monaco et al., 2009). L'application de certains agents, dit

antagonistes, est efficace et permettent de réduire le potentiel d'infection et de sporulation de ce pathogène sur plusieurs plantes (Hmouni et *al.*, 2005), comme il est possible d'utiliser des produits issus de ces mêmes organismes (Kasmi, 2017). Un autre intérêt a été accordé à l'utilisation des extraits aqueux de compost pour supprimer les maladies des plantes (Mouria et *al.*, 2013).

Ces antagonistes peuvent agir aussi par la sécrétion de substances volatiles capables de ralentir à distance le développement de l'agent pathogène ainsi que sa sporulation (Hassine et *al.*, 2013). Des résultats encourageants ont été obtenus d'après les études qui ont été menées au moyen de *Penicillium sp.* (Card, 2005), et *Gliocladium spp.* (Senthilkumar et *al.*, 2011).

II.4. Lutte intégrée

Le contrôle de la pourriture grise dans les serres de tomates est très compliqué. Par conséquent, l'application d'une seule méthode ne peut pas être assez suffisante pour éradiquer la maladie d'où la nécessité de l'adoption d'une approche intégrée (Nicot et Alain, 1996).

La lutte intégrée sous serre s'appuie sur la combinaison de plusieurs méthodes (prophylaxie, choix de variété résistante/tolérante, adaptation de l'itinéraire technique, introduction d'auxiliaires biologiques) (Jeannequin et *al.*, 2011), concourant à renforcer la résistance de la plante hôte ou à affaiblir le développement de l'agent pathogène (Nicot et Alain, 1996). Dans ce type d'intervention, l'emploi des produits phytosanitaires est impérativement limité au strict minimum (Jeannequin et *al.*, 2011).

Matériel et méthodes

I. Matériel fongique :

Des souches de *B.cinerea* ont été obtenues de la collection du laboratoire d'écologie microbienne (M. Adjebli A) et ont été isolées à partir des plantes de tomate cultivées sous serres dans la région de Bejaia durant la saison de culture de 2010.

Quinze souches, provenant d'endroit différent de la plante (feuilles, fleurs, tiges), ont été utilisées dans cette étude et énumérées dans le tableau I. Ces souches appartiennent à trois haplotypes différents.

Tableau I : Répartition des souches selon leur génotype

Haplotype	H ₃₀	H ₄₃	H ₂₀
Souche	ALG 56	ALG 163	ALG 19
	ALG 72	ALG 171	ALG 149
	ALG 75	ALG 174	ALG 167
	ALG 117	ALG 175	ALG 234
	ALG 252	ALG 193	ALG 301

ALG: Algérie.

II. Etude du développement des isolats de *B. cinerea in vitro* en présence de fongicide sur milieu PDA

II.1. Production des implants mycéliens

II.1.1. Revivification des souches de *B. cinerea*

La revivification consiste à un ensemencement par touche, à l'aide d'une coton tige, des souches de *B. cinerea* préalablement sélectionnées, sur un milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar). Les boîtes ont été mises à incubation à une température de 22° à l'obscurité pendant sept (07) jours (**figure 6 a**).

II.1.2. Purification des souches de *B. cinerea* :

Pour chaque souche, un disque mycélien (implant) de 5mm a été prélevé à la périphérie d'une culture jeune âgée de trois (03) jours et déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA, puis incubées dans les mêmes conditions de la culture

précédente. Une série de repiquage a été réalisée dans le but de l'obtention des cultures jeunes et purifiées (**figure 6 b**).

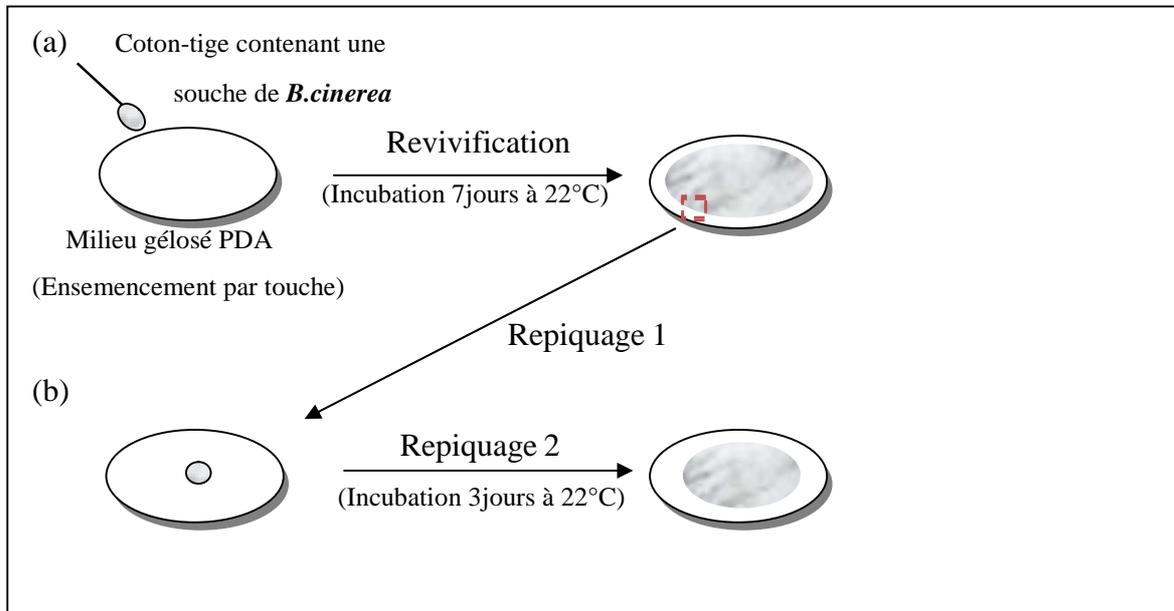


Figure 6 : Revivification et repiquage des isolats de *B.cinerea* sur le milieu PDA.

II.2. Fongicides utilisés

Trois types de fongicide ont été utilisés : Carbendazime, Methylthiophanate et Manèbe. Ces fongicides ont été appliqués aux concentrations rapportées dans le tableau II. Le choix des concentrations a été effectué en tenant comptes des doses discriminantes décrites dans la littérature (Hmouni et *al.*, 2003).. Pour le test de croissance mycélienne, une seule gamme de concentration a été utilisée : 0, 1 ; 5 ; 10 µg/ml.

Tableau II : Fongicides et concentrations retenues

Fongicide	Dose discriminante [µg/ml]	Concentrations utilisées [µg/ml]
Methylthiophanate	5	
Carbendazime	1	0 ; 1 ; 5 ; 10
Manèbe	6.7	

Les fongicides ont été mis en suspension dans l'eau distillée stérile, puis additionnés au milieu PDA en surfusion à 45°C. Les milieux ont été coulés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre. Après solidification, des disques mycéliens de 5 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à partir des cultures jeunes de *B. cinerea*. Ces disques ont été ensuite placés au centre d'une boîte de Petri contenant du milieu PDA additionné de fongicide et incubés à 22°C et à l'obscurité.

La mesure du diamètre de croissance a été effectuée le septième jour sur deux diamètres perpendiculaires. Deux boîtes de Pétri sont utilisées pour chaque isolat et chaque fongicide ainsi qu'un témoin a été préparé pour chaque isolat (**figure 7**).

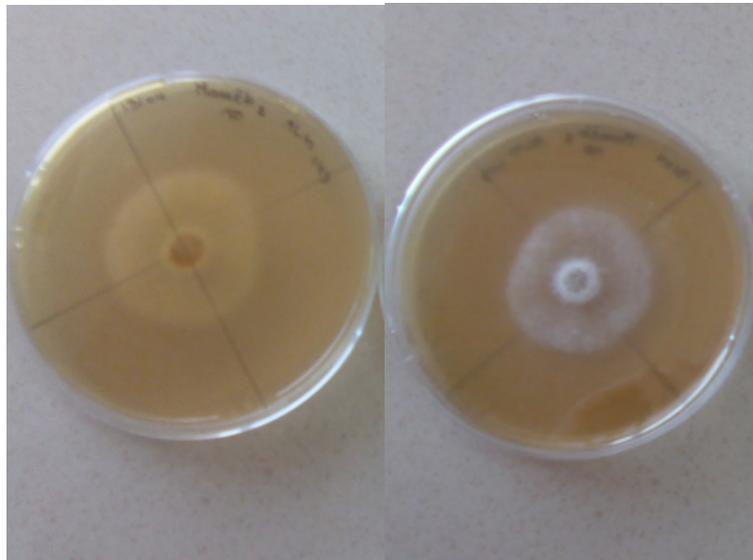


Figure 7 : Culture d'une souche de *B.cinerea* sur le milieu PDA après sept jours d'incubation en présence du fongicide.

II.3. Test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur des folioles détachés de tomate :

II.3.1. Inoculations des feuilles

Un prélèvement d'un implant mycélien (même diamètre pour tous les implants) a été effectué à partir de la zone de la croissance frontale d'une culture jeune âgée de trois jours puis déposé au centre de chaque foliole de tomate préalablement traité par pulvérisation avec chaque fongicide testé. Un nombre de trois feuilles est inoculé pour chaque souche. Pour le témoin, on a procédé à l'inoculation des folioles sans traitement préliminaire. Les boîtes sont mises à incubation 96h à température ambiante (**figure 8**).

II.3.2. Quantification des lésions

Le niveau d'agressivité en présence des fongicides testés consiste à estimer la surface des lésions causées par les isolats de *B. cinerea* sur les feuilles détachées. Chaque boîte a été photographiée après 96h d'Incubation à l'aide d'un appareil photo fixé sur un tripier. Les photos prises ont été analysées avec logiciel « ASSESS 2.0 » (APS Press, St Paul, Minnesota) après calibration pour déterminer la surface en mm² des lésions.

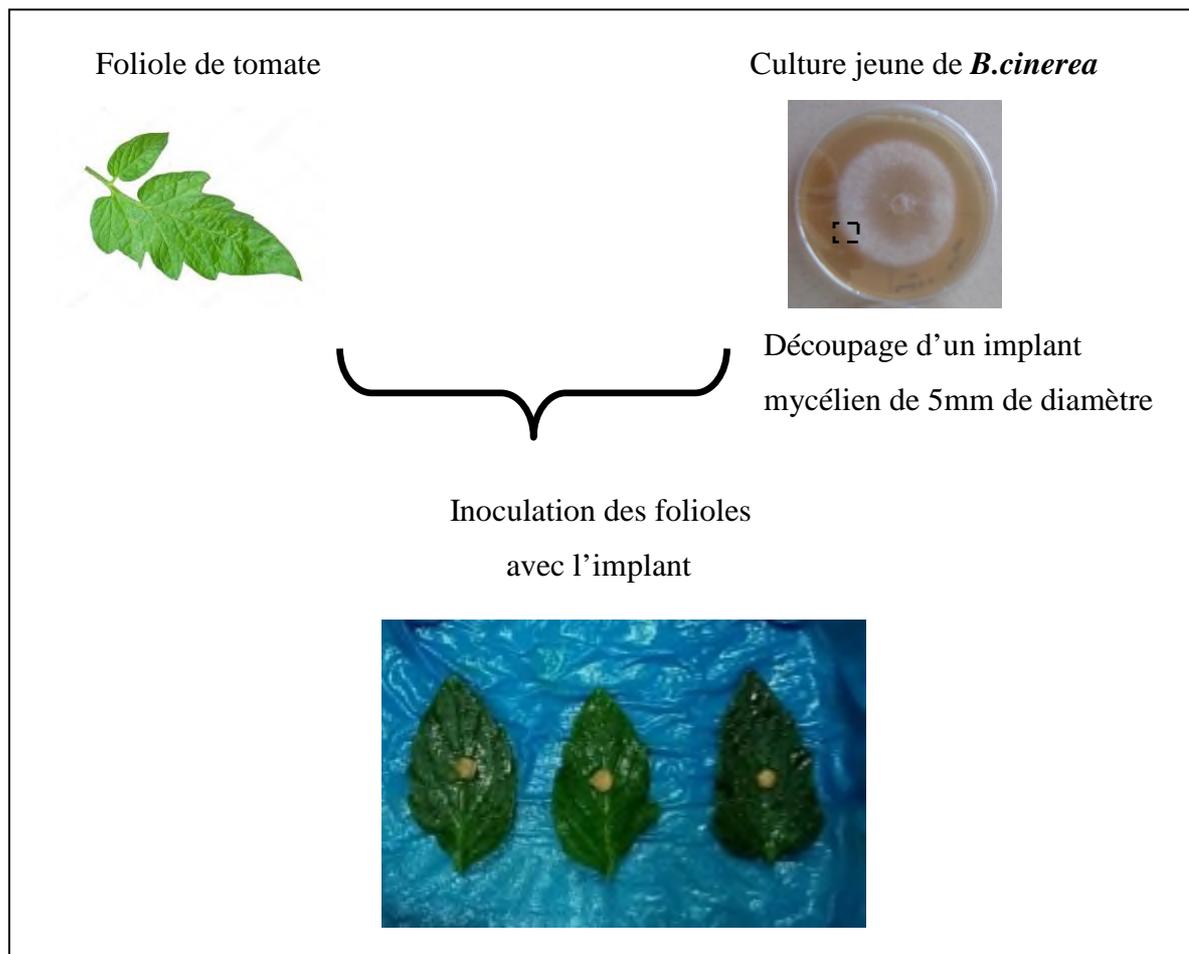


Figure 8 : Test d'agressivité des souches de *B. cinerea* sur les feuilles de tomate (Protocole INRA, Avignon. France).

VI. Traitement des données

Les résultats obtenus en présence des fongicides sur les boîtes de Petri et sur les feuilles détachées ont été transformés en pourcentage d'inhibition selon l'équation rapportée par Hmouni et *al.*, (1996) :

$$I\% = (D_{\text{témoin}} - D_{\text{test}}) / D_{\text{témoin}} * 100$$

I% : pourcentage d'inhibition

D_{témoin}: diamètre de la croissance (lésion) en absence de fongicide.

D_{test} : diamètre de la croissance (lésion) en présence de fongicide.

Résultats et discussion

I. Test de résistance des souches de *B. cinerea* *in vitro*

I.1. Effet du Méthylthiophanate sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*

La croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* testées en présence de trois concentrations de Méthylthiophanate a été très variable.

A des concentrations de 1 et 5 µg/ml, l'inhibition a été totale pour toutes les souches excepté les souches ALG 56, 72, 75, 117, 252 et 19 ou le Méthylthiophanate n'a eu aucun effet sur la croissance des souches de *B. cinerea*. Tandis qu'à 10 µg/ml toutes les souches ont été inhibées par le Méthylthiophanate excepté ALG 19 ou la croissance mycélienne n'a été inhibée qu'à 37% (**figure 9**).

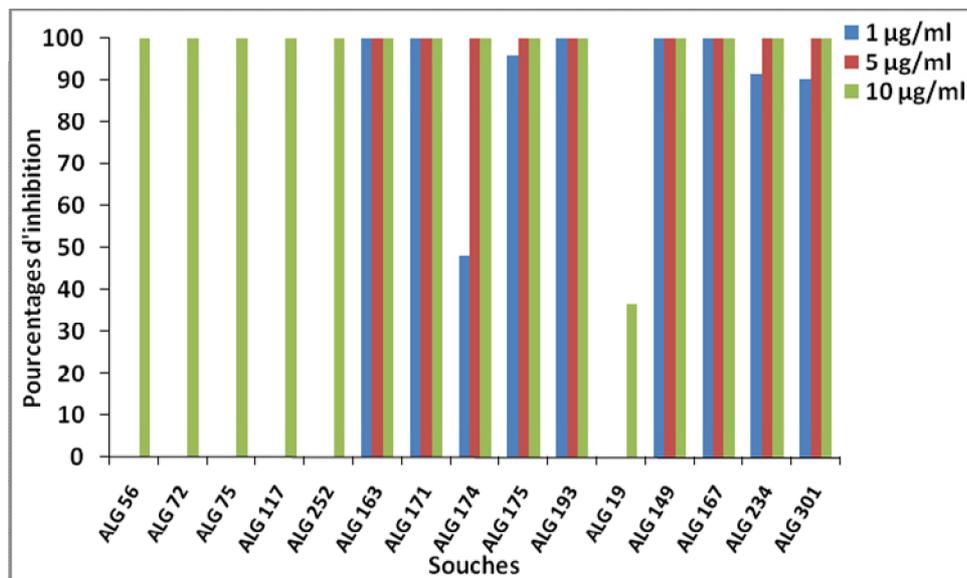


Figure 9: Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* par le Méthylthiophanate sur milieu PDA.

Pour la concentration 1 et 5 µg/ml, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été supérieur à 76% pour les deux haplotypes H20 et H43. L'haplotype H30 n'a pas été affecté par le Méthylthiophanate à 1 et 5 µg/ml. Cependant, à la concentration 10 µg/ml le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne obtenu pour les trois haplotypes a été supérieur à 87% (**Figure 10**). Ces résultats suggèrent l'existence d'une

relation entre la répartition des souches en haplotype et la capacité de résistance au Méthylthiophanate.

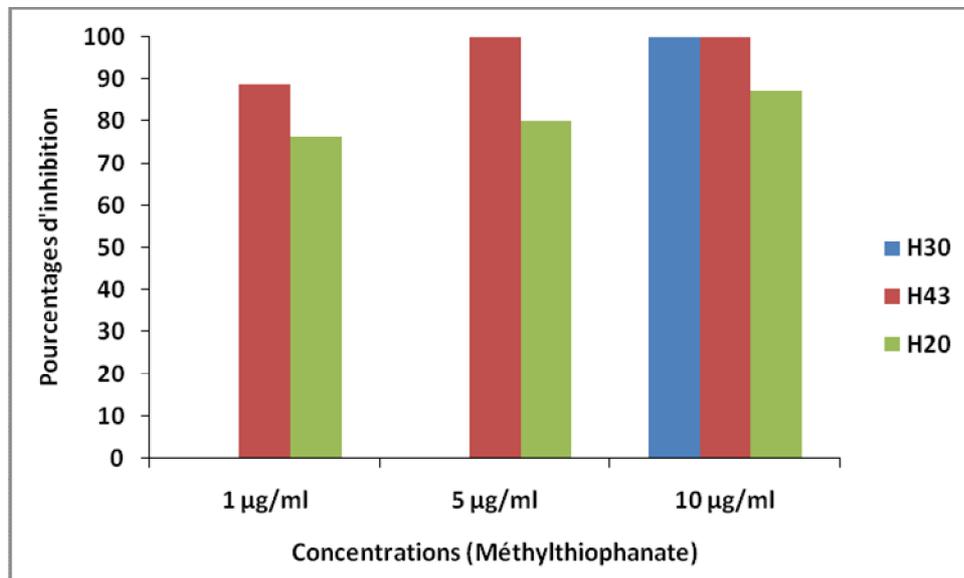


Figure 10 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de trois haplotypes de *B. cinerea* par le Méthylthiophanate.

I.2. Effet du Carbendazime sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*

La présence de trois concentrations de Carbendazime a affecté différemment la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* testées.

Les deux concentrations 1 µg/ml et 5 µg/ml ont entraîné l'inhibition de la croissance mycélienne de toutes les souches de *B. cinerea*. Une exception a été observée pour les souches ALG 56, 72, 75, 117, 252 et 19 qui n'ont pas été affectées par la présence du fongicide avec de telles concentrations. Lorsque la concentration de Carbendazime a été augmentée à 10 µg/ml toutes les souches de *B. cinerea* ont été complètement inhibées excepté les souches ALG 56, 72, 75, 117, 252, 163 et 19 qui ont été plus au moins résistantes, avec des pourcentages d'inhibition qui varient entre 10 % et 35% (**Figure 11**).

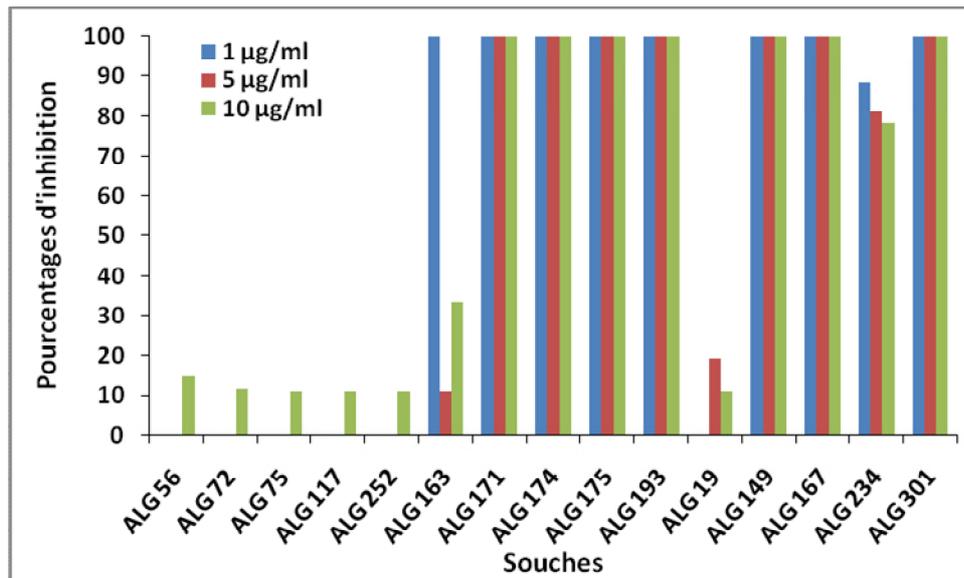


Figure 11: Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* par le Carbendazime sur milieu PDA.

Pour toutes les concentrations testées du Carbendazime (1, 5 et 10 µg/ml) le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été supérieur à 78% pour les deux haplotypes H20 et H43. Par contre, pour l'haplotype H30, aucune concentration étudiée de Carbendazime n'a pu inhiber totalement sa croissance mycélienne. Aucune action inhibitrice n'a pu être observée à la concentration de 1 µg/ml et 5 µg/ml. Tandis qu'à la concentration de 10 µg/ml, la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* composant cet haplotype a été faiblement inhibée avec des pourcentages d'inhibition inférieurs à 10 % ont été observés (**Figure 12**). Ces résultats confirment l'existence d'une relation entre l'haplotype et la résistance au Carbendazime.

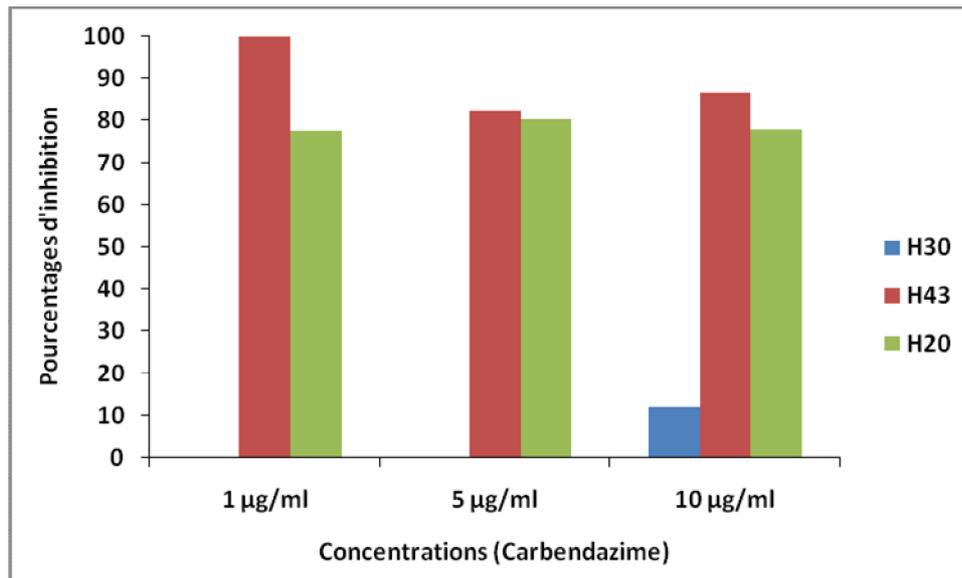


Figure 12 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de trois haplotypes de *B. cinerea* par Carbendazime.

I.3. Effet du Manèbe sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*

La croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* testées en présence de trois concentrations de Manèbe (1, 5 et 10 µg/ml) a été optimale. Aucune inhibition de la croissance mycélienne n'a été observée pour toutes les souches vis-à-vis des trois concentrations.

II. Test de résistance des isolats de *B. cinerea* aux fongicides sur les feuilles détachées de tomate

L'application des trois fongicides a révélé une variabilité entre les souches de *B. cinerea* en ce qui concerne l'apparition des lésions sur les feuilles détachées de tomate. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux traitements effectués avec le Méthylthiophanate et le Carbendazime séparément. La plupart des souches de *B. cinerea* testées ont provoqué peu ou pas de lésions sur les feuilles détachées de tomate. Les pourcentages d'inhibition de l'agressivité de toutes les souches de *B. cinerea* varient entre 18% jusqu'à l'inhibition totale (100 %), excepté pour les souches ALG 117, ALG 56 et ALG 167 où l'agressivité a été optimale en présence de l'un des deux fongicides.

L'agressivité des souches de *B. cinerea* sur les feuilles détachées de tomates traitées avec le Manèbe a été moins importante pour la plupart des souches testées. Seules les souches ALG 234 et ALG 149 ont été fortement inhibées par le traitement (Manèbe) avec

un pourcentage d'inhibition de 74 %. Les souches ALG 56, ALG 72, ALG 75, ALG 163, et ALG 167 ont été moyennement inhibées avec des pourcentages de croissance qui varient entre 21 et 49 % (**Figure 13**).

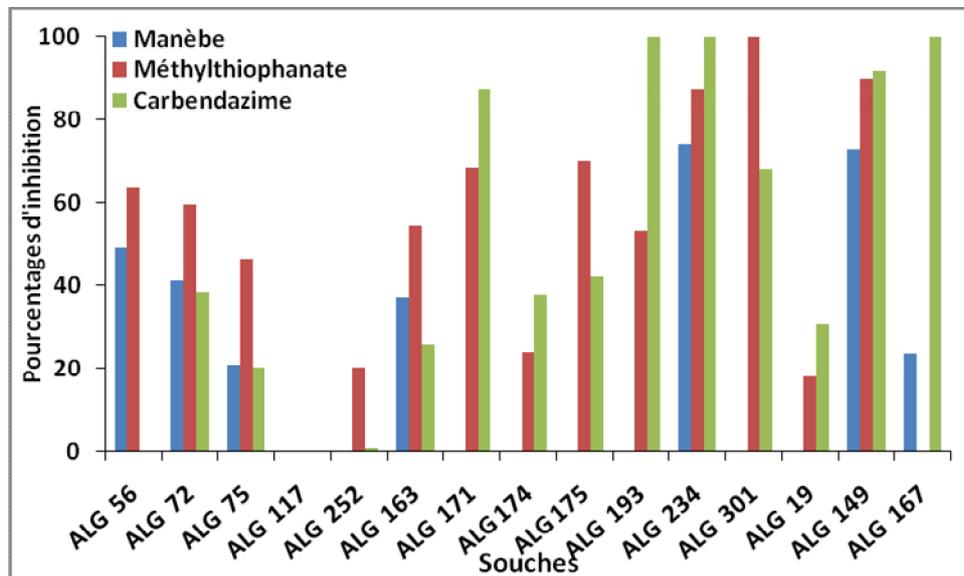


Figure 13: Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* par les trois fongicides sur feuilles de tomate.

Toutes les souches appartenant à l'haplotype H20 et H43 ont présentées globalement le même profil d'agressivité sur des feuilles détachées de tomate en présence de Méthylthiophanate et de Carbendazime. Les pourcentages d'inhibition de l'agressivité ont été supérieurs à 54%. Contrairement aux souches composant l'haplotype H30, l'agressivité a été faiblement inhibée par le Carbendazime le Méthylthiophanate avec des pourcentages d'inhibition de 12% et de 38% respectivement.

Les trois haplotypes ont provoqué des lésions sur les feuilles de tomates équivalentes aux témoins quand les feuilles de tomate ont été traitées avec 5 µg/ml du Manèbe. Le pourcentage d'inhibition le plus faible a été obtenu pour l'haplotype H43 avec 7% d'inhibition de l'agressivité comparé à l'haplotype H20 et H30 avec 22% et 34 % respectivement (**Figure 14**).

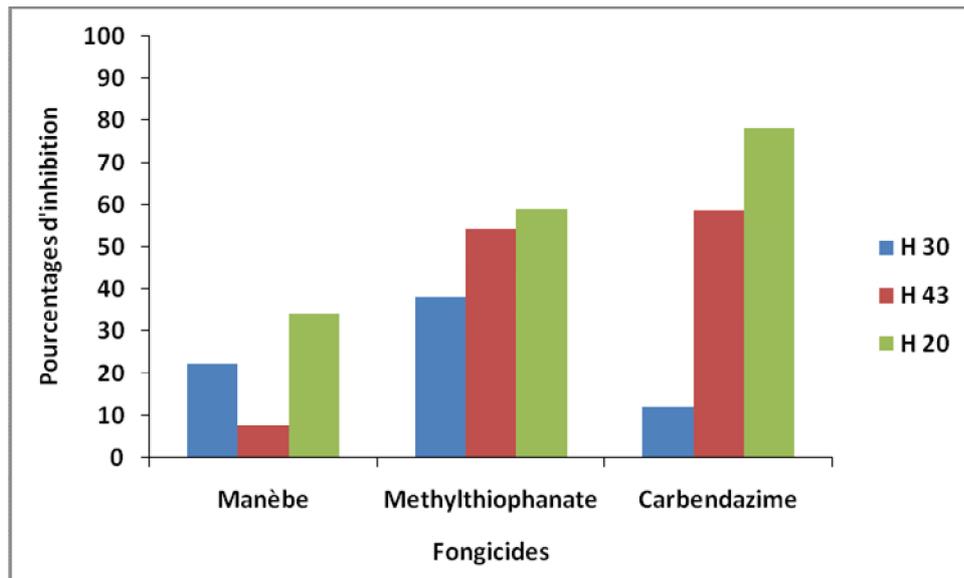


Figure 14 : Résultats de pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois haplotypes de *B. cinerea* par les trois fongicides.

III. Discussion :

La présente étude sur la résistance des souches de *B. cinerea* collectées à partir des plantes de tomate a été menée dans le but de vérifier les hypothèses émises dans l'introduction.

Une grande variabilité de la croissance mycélienne a été obtenue entre les souches de *B. cinerea* en présence des différentes concentrations des trois fongicides.

En présence du Méthylthiophanate, la croissance mycélienne de toutes les souches a été inhibée à une concentration de 10 μ g/ml. Nos résultats contredisent ceux obtenus par Hmouni et *al.*, (2003), ou ils ont obtenus des résistances au Méthylthiophanate lorsqu'il a été testé sur six isolats de *B. cinerea* collectés sur tomate même à des concentrations d'ordre de 500 ppm. Ils ont observé des pourcentages d'inhibitions en dessous de 50%. Cependant et compte tenu de la dose discriminante de la résistance qui est de 5 μ g/ml, les souches appartenant à l'haplotypes H30 ont pu croître à cette concentration ce qui implique leur résistance vis-à-vis de ce fongicide. D'autres études se sont penchées sur ce sujet par Besri et Diatta, (1985), en réalisant des tests de résistance de 83 isolats de *B. cinerea* isolés sur des tiges de tomate vis-à-vis du Méthylthiophanate. Les résultats obtenus ont montré la résistance des isolats à 500ppm de Méthylthiophanate (soit 0.5 μ g/ml) sur la croissance mycélienne ou un pourcentage d'inhibition de 13% a été enregistré. Des lésions ont été observées sur les folioles inoculées avec l'haplotype H30 ou des niveaux d'agressivité

faibles ont été enregistrés. L'agressivité des souches de *B. cinerea* a pu être contrôlée en présence du Méthylthiophanate.

L'étude menée sur le comportement des souches de *B. cinerea* en présence de Carbendazime a montrée une variabilité de réponses entre souche sensible et résistante. La forte inhibition observée entre les souches de *B. cinerea* (haplotype H43 et H20) affirme leur sensibilité vis-à-vis de Carbendazime appliqué aux trois concentrations (1, 5 et 10 µg/ml) avec un pourcentage d'inhibition atteignant les 100 %, ces résultats contredisent celles obtenues par Liu *et al.*, (2016) lorsqu'ils ont réalisé une étude sur la résistance de 263 souches de *B. cinerea* obtenues sur tomate en présence de 1 µg/ml de Carbendazime, une forte résistance a été observée avec un pourcentage de croissance de 89.4 % . Contrairement au profil de l'haplotype H43 et H20, l'haplotype H30 semble être le plus résistant avec une tolérance totale vis-à-vis du Carbendazime à la concentration 1 et 5 µg/ml, même à la concentration 10 µg/ml l'haplotype H30 a présenté une tolérance remarquable ou un pourcentage d'inhibition de 12% a été enregistré ce qui est en accord avec les résultats de Liu *et al.*, (2016). En Espagne, une étude similaire a été entreprise par Raposo *et al.*, (1996), trois souches sur quarante et une souches de *B. cinerea* ont été trouvées pour être résistantes au Carbendazime lorsque ce dernier a été utilisé à la concentration de 1 µg/ml, toutes les autres souches en ont été sensibles. Nos résultats corroborent ceux obtenus par Lerroux et Gredt, (1992), qui ont rapporté aussi des niveaux de tolérance élevés au Carbendazime dans les isolats de *B. cinerea* sur le concombre. Compte tenu de la dose discriminante de résistance qui implique l'inhibition de 50% de la croissance, les souches de l'haplotype H30 sont considérées comme étant résistantes au Carbendazime. Nos résultats contredisent ceux obtenus par l'étude menée par Wang *et al.* (2016), sur l'activité métabolique de cinq isolats de *B. cinerea* en présence de cinq fongicides. Ils ont enregistré une diminution des capacités métaboliques à une concentration de 0.05 et 1 µ/ml de Carbendazime.

La croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* en présence de Manèbe (Mancozèbe) a été optimale. Ceci est de même pour toutes les souches quel que soit leur répartition haplotypiques. Des pourcentages d'inhibitions nuls ont été enregistrés pour la totalité des souches utilisées pour toutes les concentrations testés. Les résultats obtenus avec l'application du Manèbe dans cette présente étude contredisent les résultats obtenus dans l'étude du comportement de quelques souches de *B. cinerea* vis-à-vis du Manèbe, menée par Hmouni *et al.*, (2003), sur un ensemble de six isolats collectés de plants de

tomate, qui a montré une grande variabilité de résistance. Le pourcentage d'inhibition s'est étalé entre 4.9 et 79 % lorsque le fongicide est appliqué à une concentration de 100 ppm. Les lésions causées par les souches de *B. cinerea* sur les folioles de tomates ont été spectaculaires. En présence de Manèbe le niveau d'agressivité du parasite a été très élevé.

Les tests d'agressivité réalisés sur les feuilles détachées de tomate ont montré la grande variabilité au niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea*. Les souches appartenant à l'haplotype H30 ont eu un comportement plus agressif en présence de Méthylthiophanate, Carbendazime et Manèbe avec des pourcentages d'inhibition de 48, 12 et 23 % respectivement. Une forte résistance a été notée chez la souche ALG 117. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Shen et *al.*, (2009), après avoir testé 26 souches de *B. cinerea* isolées à partir des feuilles de concombre ou une grande différences a été observées au niveau d'agressivité de ces souches.

L'apparition de souches résistantes peut avoir comme cause l'augmentation des fréquences d'application du Méthylthiophanate qui ont entraîné une importante pression de sélection sur les populations de *B. cinerea*. Ainsi, la biologie de *B. cinerea* peut aussi influencer l'apparition des souches résistantes par sa capacité de produire des spores qui peuvent se disséminer à courte et à longue distances.

Conclusion et perspectives

Conclusion

La pourriture grise, causée par *B.cinerea*, est l'une des maladies les plus redoutables et les plus destructives d'une grande variété de culture dans le monde.

Le contrôle de la pourriture grise repose essentiellement sur l'utilisation d'un ensemble de fongicides. Ces produits fongitoxiques présentent des difficultés liées à la résistance grandissante des souches aux principaux produits commercialisés.

L'objectif de ce travail est d'étudier le niveau de résistance de quinze souches de *B cinerea*, isolées de serres de tomate, vis-à-vis de trois fongicides, les plus utilisés pour contrôler l'incidence de la pourriture grise sur la tomate dans le monde.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré une grande diversité dans la croissance mycélienne entre les différentes souches de *B. cinerea* qui se manifeste par des réponses de faible, moyen à forte tolérance vis-à-vis les différentes concentrations des trois fongicides testés. Une résistance totale des souches testées vis-à-vis des trois concentrations des fongicides avec des pourcentages d'inhibitions qui ont été nuls ont été observés. Une efficacité du méthylthiophanate et Carbendazime (10 µg/ml) sur l'ensemble des souches de *B. cinerea* avec plus de 80% d'inhibition. Les souches de *B. cinerea* appartenant à l'haplotype H30 ont été résistantes à 1µg/ml, 5µg/ml en présence du Méthylthiophanate et Carbendazime. A 10 µg/ml du Carbendazime, seul les souches de l'haplotype H30 qui ont montré une résistance avec 12% d'inhibition de la croissance mycélienne. Sur les feuilles de tomate détachées pulvérisées avec 5µg/ml de chaque fongicide, les niveaux d'agressivité de *B. cinerea* étaient très différents avec un optimum de croissance qui a été enregistré pour les souches appartenant à l'haplotype H30 et un développement peu étendu pour les souches des deux haplotypes H43 et H20.

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de mieux connaître le profil de résistance de *B. cinerea* vis-à-vis des trois fongicides les plus utilisés par les agriculteurs pour lutter contre la pourriture grise de la tomate. Ils seront complétés à l'avenir afin de construire des initiatives pour pouvoir mieux gérer les dégâts causés par *B. cinerea* et minimiser les pertes au maximum, et ceci dans le cadre d'une agriculture respectueuse de l'environnement.

Pour se faire, il serait intéressant d'aborder les points suivants :

- Elargir l'échantillonnage afin de confirmer les résultats obtenus dans cette étude.
- Tester l'action des fongicides à des faibles concentrations en synergie avec d'autres molécules bioactives (huiles essentielles) vers une protection intégrée.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Agrios G. (2005). Plant Pathology. Elsevier Academic Press. Gainesville, U.S.A, 952p.

Aissat K., Nicot P. C., Guechi A., Bardin M., Chibane M. (2008). Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. Agronomy for sustainable development, Springer Netherlands, vol. 28, n° 3, pp. 403-409.

Ajouz S. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France, 179 p.

Aleid J. Dik, Jos P. Wubben. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. Botrytis: Biology, Pathology and Control, Edition Springer, Dordrecht. pp. 319-333.

B

Benbadji M. (1977). Etude expérimentale de la croissance et de la production de la tomate sous l'action des concentrations différentes de Nacl et d'apport d'amendement. Thèse de Magistère. Institut National d'Agronomie. Alger.69p.

Bergougnoux V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming, vol. 32, n° 14, pp. 170-189.

Besri M. el Diatta F. (1985). Resistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate, aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. EPPO Bulletin, vol. 15, pp. 379-386.

Bhatt D.D. and Vaughan E. (1962). Preliminary investigations on biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) of strawberries. Plant Disease Reporter Journal, vol. 46, n°, pp. 342-345.

Billard A., Fillinger S., Leroux P., Lachaise H., Beffa R. and Debieu D. (2011). Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains, Pest Management Science journal, vol. 68, n° 5, pp. 684-691.

Blakeman J. P. (1975). Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. T. Brit. Mycol. Soc, vol. 65, pp. 239-247.

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. (2009). Les maladies de la tomate. (Eds) Quae, Vairaille, France. 690p.

C

Card S. D. (2005). Biological control of *Botrytis cinerea* in lettuce and strawberry crops. Doctoral Thesis. Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 199p.

Causse M., Caranta C., Saliba Colombani V., Moretti A., Damidaux R., Rousselle P. (2000). Valorisation des ressources génétiques de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaires. Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures. INRA, France, vol. 9, n° 3, pp. 197-210.

Corbez, R. (1994). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. (Eds) Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Paris. 298 p.

D

Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, n° 4, pp. 414-430.

Dik A.J., Wubben J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edition Springer, Dordrecht. pp 319-333.

Dubos B. (2002), Maladies cryptogamiques de la vigne, champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. (Eds) Féret, Bordeaux. 207pp.

E

Eden M.A., Hill R.A., Stewart A. (1996). Biological control of *Botrytis* stem infection of greenhouse tomatoes. *Plant Pathology*, vol. 45, pp. 276-284.

Elad Y., Yunis H. and Katan T. (1992). Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. Vol. 41, pp. 41-46.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. M. (2007). *Botrytis* Biology pathology and control: botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. The Volcani Center, Bet Dagan, Israel, pp. 1-8.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Nafiz D. (2007). *Botrytis: Biology, pathology and control*. (Eds) Springer Science & Business Media. France. 428p.

Elmer P., Michailides T.J. (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 243-272.

F

Fournier E., Giraud T., Albertini C. and Brygoo Y. (2005). Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies, *Mycologia Journal*, vol. 97, pp. 1251-1267.

G

Giraud T., Fortini D., Levis C., Lamarque C., Leroux P., Lobuglio K. and Brygoo Y. (1999). Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology Journal*, vol. 89, n° 10, pp. 967-973.

Giraud T., Fortini D., Albertini C., Brygoo Y. (2005). Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia Journal*, vol. 97, n° 6, pp. 1251-1267.

H

Hassine M., Aydi r., Jabnoun-Khiareddine H., Ben Jannet H. & Daami-REMADI M. (2013); Effet des températures d'incubation et des méthodes de confrontation sur le pouvoir inhibiteur exercé par *Penicillium* sp. et *Gliocladium* spp. sur *Botrytis cinerea*. *Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products*, vol. 9, n° 1, p. 41-51.

Hennebert G. L. (1973). *Botrytis* and *Botrytis*-like genera, vol. 7, pp. 183-204.

Hmouni A., Hajlaoui M.R. and Mlaiki M., (1996). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP Bulletin*, vol. 26, pp. 697–705.

Références bibliographiques

Hmouni A., Oihabi L., A. Badoc, 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, vol. 142, p. 79-100.

Hmouni A., Mouria A. et Douira A. (2005). Etude de la réceptivité des feuilles de tomate à *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise, ne relation avec l'activité antagoniste de quelques isolats de *Trichoderma* et de *Gliocladium*. Journal AL AIWAMIA, vol. 2, n° 3, pp. 33-46.

Holz G., Coertze S., Williamson B. (2007). The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (Eds) Springer, Dordrecht, pp. 9-27.

I

Ibrahim Ghaleb A. M. (1990). s Le cycle sexué de *Botrytinia fuckeliana* (De Bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers.). These de Doctorat de Biologie et Physiologie Végétale. Université de Lille1 - Sciences et Technologies, France, 239p.

J

Jarvis W. R. (1980). Epidemiology. In: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R., Eds., The Biology of Botrytis. (Eds) Academic Press, London, pp. 219-250.

Jarvis W. R. (1992). Managing Diseases in Greenhouse Crops. (Eds) American Phytopathological Society. St Paul, MN, 288p.

Jeannequin B., Francoise D., Daniel P., Michel P., Chauvin J. E. (2011). Vers des cultures fruitières et légumières à hautes performances environnementales. Innovations Agronomiques Journal, vol. 12, pp. 73-85.

Jarvis W.R. (1977). Botrytinia and Botrytis species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. (Eds) Research Branch, Department of Agriculture, Ottawa, Canada, 195 p.

K

Kalogiannis S., Tjamos S. E., Stergiou A., Antoniou P. P., Ziogas B. N., and Tjamos E. C. (2006). Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of Tomato. European Journal of Plant Pathology. Vol. 116, n° 1, pp. 69–76.

Kasmi M., Aourach M., El Boukari M., Barrijal S., Essalmani H. (2017). Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc. Journal Comptes Rendus Biologique, vol. 340, n° 8, pp. 386-393.

L

- Lafon R. et Bullit J. (1970). Quelques aspects de la biologie du *Botrytis cinerea* Pers., agent de la pourriture grise des raisins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, vol. 2, pp. 159-174.
- Latorre B. A. and Torres R. (2012). Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection Journal*, vol. 40, pp. 49-52.
- Lerroux P. et Gredt M. (1980). Effets de divers herbicides sur la croissance mycelienne de souches de *Botrytis cinerea* pers et de *Penicillium expansum* Link, sensibles ou résistantes à certains fongicides. Vol. 20, pp. 249-254.
- Leroux, P. and Clerjeau M. (1985). Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Protection Journal*, vol. 4, n° 2, pp. 137-160.
- Leroux P.,Chapelet F., Desbrosses D., Gredt M.. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, vol.18, n° 10, pp. 687-697.
- Leroux P., Fritz R., le Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., and Chapeland F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*, vol. 85, n° 9, pp. 876-888.
- Leroux P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.195-222.
- Leroux P., Gredt M., Leroch M., Walker A. S. (2010). Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n° 19, pp. 6615-6630.
- Leyronas C., Bryone F., Duffaud M., Troulet C., Nicot P. (2015). Assessing host specialization of *Botrytis cinerea* on lettuce and tomato by genotypic and phenotypic characterization. *Plant Pathology*, vol. 64, n° 1, pp. 119-127.
- Li G.Q., Huang H.C., Acharya S.N., and Erickson, R.S. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant Disease*, vol. 88, pp. 1246-1251.

Liu, S., Z. Che, et al. (2016). Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Protection Journal*, vol. 84, pp. 56-61.

M

Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., and Fermaud M. (2003). Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 109, pp. 479-488.

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

Mekwilai, T. and Nalumpang, S. (2017). Evaluation of Carbendazime resistance levels of *Botrytis cinerea* causing gray mold of grape in Chiang Mai province, northern Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*, vol. 13, n° 2, pp. 169-182.

Melvin D. B., Bart P. H., Thomma J. and Berlin D. N. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology Journal*, vol. 7, n° 1, pp. 1-16.

Monaco C., Rollán M.C., Ronco L., Lampugnani G., Arteta N., Ambramoff C., Aprea A., Larran S. and Stocco M. (2009). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. *Archives of Phytopathologie and Plant Protection Journal*, vol. 42, n° 8, p. 729-737.

Mouden N., Benkiran 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. *Bull. Soc. Pharm Journal*. vol.149, pp. 85-102.

Muanga, J. M. M. (2017). Le polychloro-chitosane : potentiels bioactif et bioconservateur de la tomate contre la moisissure grise. Université LAVAL, Québec, CANADA. 86p.

N

Nicot P., Alain B. (1996). Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes., In: Morris C.E., Nicot P.C., Nguyen-The C. *Aerial Plant Surface Microbiology*. (Eds) Springer, Boston, MA, pp. 169-189.

O

O'Neill T. M., Shtienberg D. and Elad Y. (1997). Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Disease, vol. 81, n° 1, pp. 36–40.

P

Panebianco, A., Castello I., et al. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. Crop Protection Journal, vol. 77, pp. 65-73.

R

Raposo R., Delcan J., Gomez V. and Melgarejo P. (1996). Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. Vol. 45, pp. 497-505.

Romanazzi G., and Erica F. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In Postharvest Decay. (Eds) Elsevier Inc. Ancona, Italy, pp. 131-146.

S

Shen D., Li B., Li X., Song J., Shi Y., Wang H., Shen D., Li B.J., Li X. X., Song J. P., Shi Y. X., et Wang H. P. (2009). Pathogenicity analysis of different *Botrytis cinerea* strains in cucumber. China Vegetables, vol. 18, pp. 25-28.

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

Shtienberg D., Elad Y., Niv A., Nitzani Y., and Kirshner B. (1998). Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. European Journal of Plant Pathology, vol. 104, n° 8, pp. 753–763.

Schwinn F. J. (1992). Biological control of Botrytis-incited diseases and powdery mildews in. Pestic. Outlook Journal, vol. 3, pp. 18-28.

V

Verhoeff K. (1968). Studies on *Botrytis cinerea* in tomatoes. Effect of soil nitrogen level and of methods of deleafing upon the occurrence of *B. cinerea* under commercial conditions. Institute of Phytopathological Research (IPO), Wageningen, vol. 74, pp. 184-192.

W

Walker A. S. (2013). Diversité et adaptation aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Paris-sud, Ecole Doctorale : Sciences du végétal, France, 170p.

Wang H., Wang J., Li L., Hsiang T., Wang M., Shang S. and Yu Z. (2016). Metabolic activities of five botryticides against *Botrytis cinerea* examined using the Biolog FF MicroPlate. Vol. 6, pp 1-11.

Wei Y. (1995). Environmental control to prevent condensation on tomato plants in greenhouses. PhD Thesis, Granfield University, Silsoe College. 218pp.

Wills R. B. H., McGlasson W. B., Graham D. and Joyce D. C. (2007). Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruits, vegetables and ornamentals. New South Wales University Press, Sydney. USA, pp.28-129.

Y

Yao, S., Lu, Z., Jin, Z., Chen, L.,. (2011). Analysis of spreading regularity and impact factors of *Botrytis cinerea* in greenhouse in the spring. Chinese Agricultural Science Bulletin, vol. 27, pp. 194–19.

Résumé

B. cinerea est un phytopathogène qui s'attaque à une grande variété de plantes hôtes d'importance économique. Ce travail propose une étude de profil de résistance de quinze souches de *B. cinerea* collectées à partir des plantes de tomate sous serre vis-à-vis de trois fongicides (Méthylthiophanate, Carbendazime et manèbe). La croissance mycélienne a été évaluée *in vitro* en présence de trois concentrations de chaque fongicide (1 µg/ml, 5 µg/ml et 10 µg/ml). Les tests d'agressivité ont été estimés sur des feuilles détachées de tomate en présence de 5 µg/ml de chaque fongicide. Toutes les souches ont été sensibles à l'action du Méthylthiophanate et le Carbendazime à 10 µg/ml. Seules les souches de l'haplotype H30 ont été résistantes à 1 µg/ml et 5 µg/ml. Les souches de l'haplotype H30 ont été inhibées à 12% à 10 µg/ml du Carbendazime. Toutes les souches testées ont été résistantes à l'action du Manèbe. La plupart des souches de *B. cinerea* testées ont provoqué de lésions variables sur les surfaces des feuilles détachées de tomate. Les pourcentages d'inhibition de l'agressivité de toutes les souches de *B. cinerea* varient entre 18% jusqu'à l'inhibition totale (100 %) quand les feuilles ont été traitées avec 5 µg/ml du méthylthiophanate et Carbendazime séparément. Les souches des trois haplotypes ont causé des lésions sur les feuilles traitées avec 5 µg/ml du Manèbe équivalentes aux témoins. Ces résultats peuvent aider les agriculteurs avant d'envisager un traitement anti-Botrytis dans les cultures de tomates.

Mots-clés : *Botrytis cinerea*, Tomate, Résistance, Fongicide, Agressivité.

Abstract

B. cinerea is a phytopathogenic fungi that attacks a wide variety of economically important host plants. This work proposes a resistance profile of fifteen strains of *B. cinerea* collected from tomato greenhouses to three fungicides (Methylthiophanate, Carbendazim and Maneb). Mycelial growth was evaluated *in vitro* in the presence of three concentrations of each fungicide (1 µg/ml, 5 µg/ml and 10 µg/ml). Aggressiveness tests were estimated on detached leaves of tomato in the presence of 5 µg/ml of each fungicide. All strains were sensitive to the Methylthiophanate and Carbendazime at 10 µg/ml. Only the strains of H30 haplotype were resistant to 1 µg/ml and 5 µg/ml. Strains of haplotype H30 were inhibited at 12% at 10 µg/ml of Carbendazim. All strains tested were resistant to the action of Maneb. Most of the *B. cinerea* strains tested caused variable damage on detached tomato leaves. The percentages of inhibition of the aggressiveness of all strains of *B. cinerea* vary between 18% until the total inhibition (100%) when the leaves were treated with 5 µg/ml of Methylthiophanate and Carbendazim separately. The strains of the three haplotypes caused lesions on leaves treated with 5 µg/ml of Maneb equivalent to controls. These results can help farmers before considering anti-Botrytis treatment in tomato crops.

Key-words: *Botrytis cinerea*, Tomato, Resistance, Fungicide, Aggressiveness.

