

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Béjaïa

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*

**Etude du profil de résistance des souches de  
*Botrytis cinerea* isolées dans le vignoble à  
différents fongicides**

Présenté par :

**BENYAHIA Iméne & BRIKH Mehdi**

Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M. NOURI Hamid

MCB

Président

M. ADJEBLI Ahmed

MCB

Encadreur

M. LADJOUZI Rachid

MAA

Examineur

**Année universitaire : 2017 / 2018**

# *Remerciements*

Au terme de notre travail, nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Dieu tout puissant, de nous avoir donné, la santé, le courage et la patience pour réaliser notre travail dans les meilleures conditions.

Nous adressons tout d'abord nos sincères remerciements à **Mr ADJEBLI Ahmed**, pour nous avoir fait l'honneur d'être notre promoteur. Nous le remercions chaleureusement pour son aide, soutien, et précieux conseils,

Nous tenons à remercier **Mr NOURI Hamid** de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Nous tenons à remercier également **Mr LADJOUZI Rachid** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions l'ensemble de l'équipe du laboratoire de mycologie pour leurs orientations et leurs conseils tout au long de ce travail.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce document.

# *Dédicaces*

Que ce travail témoigne de mes respects à mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, mon père **BENYAHIA Kamal**,

Et à la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore **BENYAHIA Farida**, je la remercie de m'avoir donné tant d'amour et de tendresse

« Je suis très fière d'être votre fille » aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux,

A mon cher frère Ahcene et sa tendre épouse Lamia,

A mon cher petit frère Rédha, et douce petite sœur Yousra,

A ma grand-mère Ima Houria, à la mémoire de mon grand-père Jeddi Ahcene,

A mes grands-parents maternels, Mami Ferroudja, et Jeddi Mustapha,

A mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, a tous mes amis et mes collègues,

A mon binôme Mehdi,

A toute la promotion de microbiologie,

Enfin, à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

*Iméne*

# *Dédicaces*

En achevant ce travail, je tiens à le dédier à toutes les personnes qui me sont chers ;

En premier lieu, mes chers parents, qui ont contribué à ce que je deviens ce que je suis aujourd'hui,

A mes sœurs Nawel et Assia et leurs maris respectifs Djeloul et Hamid,

A ma chère sœur Amina, qui est loin, et avec qui j'aurais tant aimé partager ma soutenance,

A mon frère Wahid,

A Khalou Malik,

A tous mes amis,

A mon binôme Iméne,

Sans oublier ma petite nièce adorée Maria,

Et pour finir, spéciale dédicace à Nour El Houda <3 .

*Mehdi*

# *Liste des tableaux*

**Tableau I :** Taxonomie de *Botrytis cinerea* ..... 04

**Tableau II :** Caractéristiques morphologiques des isolats de *B. cinerea*  
sélectionnés ..... 13

# Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Cycle biologique du <i>B. cinerea</i> .....	5
<b>Figure 02</b> : Sclérotés de <i>Botrytis cinerea</i> observés sur milieu PDA en conditions de laboratoire.....	6
<b>Figure 03</b> : Observation sous microscope des conidiophores de <i>Botrytis cinerea</i> portant à leurs extrémités des conidies.....	7
<b>Figure 04</b> : Symptômes causés par l'agent pathogène <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes hôtes.....	8
<b>Figure 05</b> : Etapes du test d'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> sur les feuilles de vigne avec et sans fongicide.....	16
<b>Figure 06</b> : Inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>B. cinerea</i> par le Manèbe.....	17
<b>Figure 07</b> : Inhibition de la croissance mycélienne des trois morphotypes de <i>B. cinerea</i> par le Manèbe.....	18
<b>Figure 08</b> : Inhibition de la croissance mycélienne des isolats <i>B. cinerea</i> par le Méthylthiophanate.....	18
<b>Figure 09</b> : Inhibition de la croissance mycélienne des trois morphotypes de <i>B. cinerea</i> au Méthylthiophanate.....	19
<b>Figure 10</b> : Inhibition de la croissance mycélienne des isolats <i>B. cinerea</i> au Carbendazime.....	20
<b>Figure 11</b> : Inhibition de la croissance mycélienne des trois morphotypes de <i>B. cinerea</i> au Carbendazime.....	20
<b>Figure 12</b> : Symptômes causés par un isolat de <i>B. cinerea</i> autour des points d'infection sur feuilles de vigne.....	21
<b>Figure 13</b> : Agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> sur feuilles détachées de vigne en présence des trois fongicides.....	22
<b>Figure 14</b> : Agressivité des morphotypes de <i>B. cinerea</i> sur feuilles détachées de vigne en présence de trois fongicides.....	22

# Liste des abréviations

**BCV** : *Botrytis cinerea* sur vigne.

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

**OILB** : Organisation International de Lutte Biologique.

**OILB-SROP** : Organisation Internationale de la Lutte Biologique-Section Régionale  
Ouest Paléarctique

**OIV** : Organisation internationale de la vigne et du vin.

**PDA** : Potatoes Dextrose Agar.

**SAU** : Surface Agricole Utile.

# Glossaire

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

**Hôte :** Individu (plante-hôte) ou population (population-hôte) susceptibles d'être contaminés par un agent pathogène.

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

**Résistance :** Caractéristique génétique d'un agent pathogène qui l'empêche d'être éliminé ou ralenti dans sa croissance et/ou son développement par une matière active donnée

**Souche :** Isolat caractérisé (génétiquement ou phénotypiquement).

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
I- Présentation du modèle <i>Botrytis cinerea</i> .....	3
I-1. Historique, cycle de développement .....	3
I-2. Gamme d'hôte .....	8
I-3. Paramètres influençant l'infection .....	9
I-3.1. Facteurs climatiques .....	9
I-3.2. Demandes nutritives .....	9
I-3.3. Qualité de la lumière.....	9
I-3.4. L'irrigation .....	10
II- Méthodes de lutttes .....	10
II-1. Méthodes chimiques .....	10
II-2. Méthodes culturales .....	11
II-3. Méthodes biologiques .....	11
II-4. Protection intégrée.....	12
<b>Matériel et méthodes</b>	
Choix des isolats.....	13
I- Test de résistance des isolats de <i>B. cinerea vis-à-vis</i> de trois fongicides.....	13
I-1. Revivification des isolats .....	13
I-2. Repiquage .....	14
I-3. Préparation des solutions fongicides.....	14
II. Evaluation de l'agressivité de <i>B. cinerea</i> en présence des fongicides sur feuilles détachées de vigne .....	15
II-1. Inoculation .....	15
II-2. Lecture des résultats .....	16
III. Traitement des données .....	16
<b>Résultats et discussions</b>	
I- Résultats du test de résistance des isolats de <i>B. cinerea vis à vis</i> de trois fongicides.....	17

I-1. Résultat de l'effet du Manèbe (Dithiocarbamate de manganèse) sur la croissance de <i>B. cinerea</i> .....	17
I-2. Résultat de l'effet du Méthylthiophanate sur la croissance de <i>B. cinerea</i> .....	18
I-3. Résultats de l'effet du Carbendazime sur la croissance de <i>B. cinerea</i> .....	19
II- Résultats du test d'agressivité sur les feuilles détachées de vigne en présence des fongicides .....	21
Discussion .....	23
<b>Conclusion</b> .....	26

***Références bibliographiques***

***Liste des annexes***

***Résumé***

# Introduction

Datant de l'antiquité, la vigne est l'une des cultures les plus anciennes, de l'Afrique du Nord et de l'Algérie en particulier. La vigne (*Vitis vinifera*) est une plante grimpante pérenne à croissance indéterminée, capable de se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage (**Gary et al., 2003**). La vigne est cultivée pour ses fruits charnus : les baies de raisin. Ces dernières permettent la préparation de jus de raisin, l'élaboration de vins, la distillation de liqueurs ou peuvent être consommées comme fruits frais ou secs. La constitution d'un vignoble nécessite du temps : il faut attendre 3 ans pour obtenir les premiers fruits, 10 à 12 ans pour avoir un rendement significatif, et 25 ans pour arriver à la pleine production (**Florence Ackermann et al, 2002**).

La vigne se trouve dans des zones très chaudes (Sahara) comme dans des zones fraîches et il n'y a que les climats trop excessifs qui empêchent sa culture. Ces conditions climatiques favorables se rencontrent dans de très nombreux terrains, aussi bien en plaines que sur les montagnes. Elle est considérée comme étant la plante la plus cultivée dans le monde avec une superficie de 7,1 millions d'hectares et une production en raisins 77,4 millions de tonnes (**OIV, 2017**). La Chine occupe la première place suivie par l'Italie, les Etats-Unis d'Amérique puis la France, l'Espagne et la Turquie en termes de production (**Faostat, 2016**).

La viticulture en Algérie occupe une superficie de 66 000 ha et représente 12% de la SAU (Surface Agricole Utile) occupée par les plantations. Elle constitue la 4ème culture pérenne sur le plan de la surface et représente le 2ème poste à l'exportation (**Amarni, 2009**).

De même que toutes les autres plantes cultivées, la vigne est sujette à de nombreux problèmes sanitaires. Les parasites, les pathogènes ainsi que les conditions climatiques provoquent d'importantes pertes de récoltes chaque année. Les champignons sont des agents qui causent les plus importants dégâts sur les vignes. Les maladies qu'ils provoquent sont très redoutées car ils peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante en occasionnant les diminutions sensibles du volume des récoltes ainsi que l'altération considérable de la qualité des produits (**Magnin-Robert, 2007**). *Botrytis cinerea* pers est l'un des champignons les plus répandus dans les cultures. Il est très polyphage et s'attaque à plus de 586 espèces de plantes cultivées et sauvages (**Porquier, 2016**). Il est entre autres l'agent responsable de la pourriture grise de la vigne (**Dean et al., 2012**).

*B. cinerea* peut causer d'importants dégâts sur toutes les cultures attaquées car il a la capacité de se développer aussi bien en parasite qu'en saprophyte sur les débris végétaux. Il provoque ainsi des pertes correspondant à 20% des récoltes mondiales des

cultures sensibles et dont le coût a été estimé à plus de 100 milliards d'euros par an. Dans les vignobles français, les pertes occasionnées peuvent atteindre 40% des récoltes (**Anonyme., 2008**).

Pour une meilleure gestion des dégâts causés par ce pathogène, plusieurs méthodes de lutte sont entreprises, ces dernières sont limitées par l'importante variabilité génétique et phénotypique de *B. cinerea*. Cette variabilité est due aux fongicides, au mode de culture et à la pression des facteurs cultureux et environnementaux (**Agrios, 2005**). Malgré les efforts consacrés au contrôle de la maladie, les pertes de cultures et de productions sont susceptibles d'être beaucoup plus élevées (**Dean et al., 2012**).

Le secteur viticole est devenu le premier consommateur de produits phytosanitaires par unité de surface agricole pour lutter essentiellement contre la pourriture grise. Depuis plus de cinquante ans, les problèmes phytosanitaires qui affectent la vigne ont été gérés essentiellement par des procédés chimiques avec des stratégies d'assurance visant à éviter tout risque de maladies. Ceci explique qu'actuellement un tiers des fongicides utilisés en Europe et en France sont au service de la viticulture. Cette lourde utilisation de produits chimiques génère des résidus qui peuvent polluer les eaux de surface et souterraines, et mettre en danger la santé humaine ainsi que la flore et la faune (**Aubertot et al., 2005**). Elle génère également des résistances à la majorité des familles de fongicides utilisées contre *B. cinerea* (**Couderchet, 2003; Leroux, 2004**).

De ce fait, dans le cadre de notre projet de mémoire de fin de cycle, nous nous sommes penchées sur l'étude du profil de résistance aux fongicides des isolats de *B. cinerea* collectés à partir de vigne dans une exploitation agricole de la wilaya de Bejaia (Amizour). Nous avons étudié l'influence de trois fongicides sur la croissance mycélienne de quelques isolats de *B. cinerea*, et évalué l'agressivité de ces isolats sur des feuilles détachées de vigne. Pour se faire, nous avons choisis trois Morphotypes différents. Un ensemble de trois fongicides ont été sélectionnés pour notre étude sur la base de leur utilisation fréquente en agriculture et c'est à partir de là que nous avons émis les hypothèses suivantes :

-La croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés, présentent-elle le même profil de résistance face aux fongicides sélectionnés ?

-Existe-il une relation entre le profil de résistance des isolats de *B. cinerea* et le morphotype ainsi que le niveau d'agressivité sur des feuilles détachées de vigne ?

# **Synthèse bibliographique**

## I- Présentation du model *Botrytis cinerea* :

*Botrytis cinerea*, un champignon phytopathogène ubiquiste, responsable de la pourriture grise, maladie cryptogamique redoutable et importante économiquement touchant près de 586 de genre de végétaux et engendrant de sérieux dégâts avant et après la récolte (Porquier, 2016). En vigne, il représente la 3<sup>ème</sup> maladie pour son importance économique, après le mildiou *Plasmopara viticola* et l'oïdium *Erysiphe necator*. Son nom fait référence à sa morphologie, le terme *Botrytis* est d'origine grec ; *botrus*- désigne la forme de « grappe de raisin », le suffixe *-itis* indique les maladies. Par contre le terme *cinerea* vient du latin qui a été tiré du mot « cendre » en raison de la couleur cendrée des spores (Walker, 2013).

### I-1. Historique, cycle de développement :

En 1729, Pier Antonio Micheli reconnaît *Botrytis* comme un genre, et il l'a répertorié dans son livre «Nova Plantarum Genera». En 1801, Persoon attribue le nom *Botrytis cinerea* à un agent pathogène de la vigne. Par la suite, certaines confusions sont apparues au tout début entre *Botrytis* et *Sclerotinia spp* (83 % d'identité protéique moyenne entre les deux génomes) (Walker, 2013). Puis en 1900 Smith rapporte des précisions et en 1945 la confusion fut dissipée par Whetzel. En 1973, Hennebert redéfinit le genre en le limitant à 22 espèces dont la majorité a une zone d'hôtes spécifiques, citant en exemples *B. tulipae* qui s'attaque aux tulipes, *B. fabae* sur les légumineuses. A l'inverse, *B. cinerea* est très ubiquiste et on compte de nombreuses espèces de plantes sur lesquelles il peut provoquer des dégâts importants. (Ajouz, 2009).

Le nom *B. cinerea* désigne la forme imparfaite (anamorphe) de nature asexuée (Deuteromycete). La forme parfaite (téléomorphe) et sexuée, qu'on observe rarement dans la nature, peut être obtenue en conditions contrôlées en laboratoire s'appelle *Botryotinia fuckeliana* qui est un Ascomycète (Walker Anne-Sophie et al., 2013). Il a été proposé par des taxonomistes des champignons d'abandonner la double nomenclature (anamorphe vs téléomorphe), au profit du « One fungus, one name ». Dans le cas de *B. cinerea*, le nom définitif de l'espèce n'a pas encore été choisi par la communauté (Wingfield et al., 2012).

*B. cinerea* a été classé comme suit :

**Tableau I. Taxonomie de *Botrytis cinerea* (Source : Card 2005).**

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Leotiomycetes
Ordre	Helotiales
Famille	Sclerotiniaceae
Genre	<i>Botryotinia</i>
Espèce	<i>Botrytis cinerea</i>

Le cycle du *Botrytis* est présenté en **Figure 01**, il est assez commun, mais se démarque toutefois au niveau de ses contaminations qui peuvent être de plusieurs types. Après une présence généralement discrète en début de saison, il peut se développer sur les grappes à maturité de façon exponentielle et causer d'importants dégâts en quelques jours.

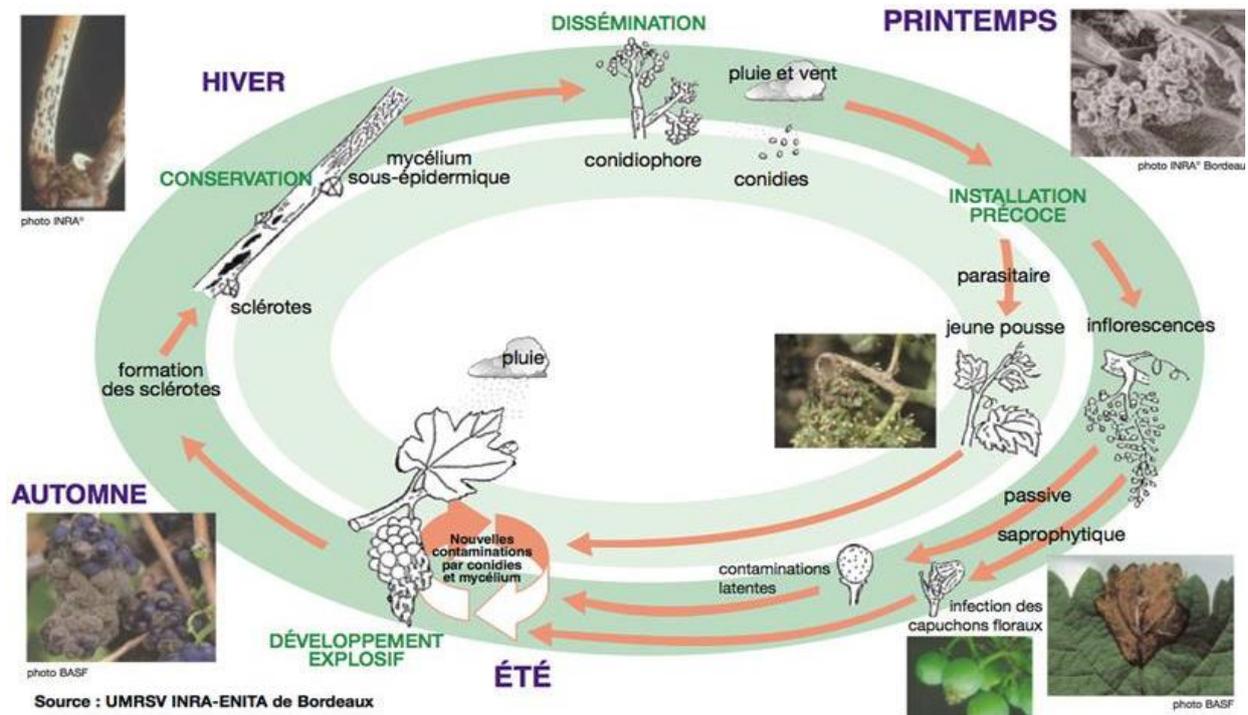


Figure 01 : Cycle biologique du *B. cinerea*.

La conservation hivernale du *B. cinerea* a principalement lieu sous forme de sclérotés (**Figure 02**) au niveau des rameaux et de mycélium sous les écorces et dans les bourgeons. Mais il faut aussi noter sa capacité, en tant que saprophyte à se conserver sur des résidus de cultures ou toute autre matière organique, notamment au sol. (**Amselem et al., 2011**).



**Figure 02 :** Sclérotes de *B. cinerea* observés sur milieu PDA, en conditions de laboratoire.  
Source : INRA

Au printemps, les conidiophores (**Figure 03**) formés vont libérer les conidies qui sont véhiculées par le vent, la pluie et les insectes jusqu'au site d'infection. Bien que les sclérotes soient le principal mode de conservation et donc, les conidies la première source d'inoculum (**Holz et al., 2004**). 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 mais plus rarement (**Williamson et al., 2007**), de même que les insectes (**Holz et al., 2004**). Lorsqu'une conidie atteint un site d'infection, le tube germinatif est initié, la pénétration peut avoir lieu de diverses manières, par pénétration directe au travers de la cuticule de l'épiderme, dans des microfissures, ou par des plaies occasionnées par des insectes ou des blessures mécaniques (**Doehlemann et al., 2006**). Après une quinzaine d'heure en présence d'humidité et à une température comprise entre 15 et 20°C, le *Botrytis* envahit les tissus (**Elad et al., 2004**).



**Figure 03** : Observation sous microscope de conidiophores de *B. cinerea*, portant à leurs extrémités des conidies. Source : INRA

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 en permettant la fécondation des sclérotés. Suite à une exposition prolongée au froid, les sclérotés fécondés produisent des structures sexuées nommées apothécies (Messiaen et al., 1991). Ces organes de fructifications libèrent par la suite des asques comprenant 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.

Une fois les contaminations installées, le développement se fait ensuite grâce au mycélium, par contact direct entre les tissus qu'il fait pourrir par hydrolyse des substances peptiques, et/ou par la production de nouveaux conidiophores qui libèrent des conidies disséminées par le vent ou plus rarement la pluie vers les nouveaux sites d'infection. Ces cycles sont relativement courts (4 jours) et peuvent débuter dès le troisième jour suivant la contamination primaire donnant son caractère explosif à cette maladie (Blancard, 2014). On considère en général que la part des infections latentes et la part des contaminations secondaires de même importance dans la contamination des grappes matures (Elmer and Michailides, 2004).

Les conidies, les sclérotes, les ascospores ou encore les fragments de mycélium représentent tous une source éventuelle d'inoculum pouvant entraîner un nouveau cycle d'infection. Au cours d'une saison, plusieurs cycles peuvent être accomplis : la maladie est dite polycyclique (Williamson *et al.*, 2007).

### I-2. Gamme d'hôte :

De nombreuses productions végétales peuvent être affectées par le champignon *B. cinerea* (Elad *et al.*, 2004), ceci est dû à sa polyphagie, sa variabilité génétique ainsi qu'au développement rapide des souches résistantes (Porquier, 2016). Il peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte (Williamson *et al.*, 2007). La résistance de ce champignon entraîne une grosse perte économique sur plusieurs cultures, sous serre ou en plein champ (Dean *et al.*, 2012; Walker, 2013), (Figure 04).

Sous certaines conditions climatiques et de physiologie de la vigne, *B. cinerea* délaisse le faciès « gris » pour le faciès dit « noble » (pourriture noble). (Walker, 2013)



**Figure 04 :** Symptômes causés par l'agent pathogène *B. cinerea* sur différentes hôtes.

Source : INRA

Sur une vigne, le développement de *B. cinerea* occasionne des dégâts sur feuilles (taches brunes), les rafles se nécrosent et les baies pourrissent et flétrissent. Les attaques de *B. cinerea* apparaissent majoritairement après la véraison, période au cours de laquelle le raisin devient sensible à cette maladie.

### **I-3. Paramètres influençant l'infection :**

Pour *B. 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 sporulation du champignon (Elad and Yunis, 1993; Yunis et al., 1990).

#### **I-3.1. Facteurs climatiques :**

L'infection et le développement de la maladie par *B. cinerea* au sein de la plante dépend essentiellement de :

- La température optimale comprise entre 15 et 25 °C (Jarvis, 1977).
- Un taux d'humidité relative d'environ 95% (Jarvis, 1977).

#### **I-3.2. Demandes nutritives :**

D'après Blakeman, (1975); Li et al. (2004), les conidies de *B. cinerea* sont pauvres en réserves énergétiques, donc une source exogène de nutriments tels que le carbone et l'azote sont indispensables à la germination des spores, au développement du mycélium, et à la formation des appressoria. Dans une solution nutritive, la germination des conidies est plus efficace que dans l'eau, ce dernier quand il émerge le filament germinatif provoque immédiatement l'arrêt de sa croissance (Clark and Lorbeer, 1977).

#### **I-3.3. Qualité de la lumière :**

Les conidies de *B. cinerea* peuvent germer en présence et en absence de la lumière, cela nécessite de l'eau et des nutriments en quantité suffisante (Ajouz, 2009). La sporulation dépend de la qualité de la lumière notamment des UV, en leur absence, celle-ci est inhibée (Nicot et al., 1996).

### **I-3.4. L'irrigation :**

L'apparition de la pourriture grise peut être aussi causée par le type d'irrigation, d'après **Aissat et al., 2008**, le système goutte à goutte est plus efficace que les autres systèmes utilisés, car les symptômes de la pourriture grise sont faibles voir absents.

L'état physiologique de la plante est aussi un facteur important dans le développement de *B. cinerea*. D'après **Pitchay et al., (2007)**, un apport excessif en azote augmente la croissance de la plante mais ce dernier la rend sensible à ce champignon responsable de la pourriture grise.

## **II- Méthodes de lutttes :**

Le contrôle de la maladie de la pourriture grise touchant une grande variété commerciale exposée aux maladies fongiques (**Dik and Wubben, 2004**), peut se réaliser par différentes méthodes, principalement sur l'application des pesticides, mais l'emploi répété de ces substances engendre l'apparition des souches résistantes (**Vasquez, 2017**). C'est pourquoi, l'application de mesures plus saines semble alors s'imposer, telle que la pratique culturale permettant la réduction de l'inoculum en éliminant les déchets végétaux (**Walker, 2013**). La lutte biologique se basant sur l'application des agents antagonistes, permet aussi de réduire le potentiel d'infection et de sporulation de *B. cinerea* sur plusieurs plantes hôtes (**Elad et al., 1994 a et b**). De nos jours, la protection totale des cultures contre ce pathogène reste toujours impossible et cela même en utilisant toutes les méthodes citées précédemment (**Ajouz, 2009**).

### **II-1. Méthodes chimiques :**

Elle est définie par l'utilisation des fongicides en quantités suffisantes à différents stades de croissance des plantes où le risque épidémiologique est important (**Cecchini, 2003; Walker 2013**), et cela afin d'éradiquer ou d'affaiblir les phytopathogènes essentiellement les champignons responsables des maladies fongiques des plantes (**Leroux, 2003**).

Actuellement, cette méthode reste un outil indispensable pour lutter contre *B. cinerea*, l'agent causal de la pourriture grise (**Ajouz, 2009**). En affectant de manière directe les fonctions essentielles telles que la biosynthèse des stérols, la division cellulaire ou la

respiration par inhibition du complexe succinate déshydrogénase dans la chaîne respiratoire (Cecchini, 2003; Leroux, 2003).

## II-2. Méthodes culturales :

La pourriture grise sur une vigne causée par *B. cinerea* peut être réduite d'une façon drastique par des techniques culturales ou des méthodes de culture adaptées. Ces techniques visent à défavoriser le développement des parasites et des adventices en modifiant leur environnement naturel et en perturbant leur cycle biologique (Vasquez, 2017). Elles peuvent en outre inclure :

- L'élimination des restes des végétaux, les équipements et le matériel agricole pourrait maîtriser l'entrée et l'accumulation de l'inoculum (Navarette et al., 2010).

- Un ébourgeonnage bien mené en dehors des jours pluvieux permet la réduction de la densité des plantes et assure une aération afin de limiter les zones de confinements pouvant entraîner l'accroissement de l'humidité relative et la condensation dans les serres (Decognet et al., 2009).

- Le palissage est une autre pratique permettant la diminution de l'entassement de la végétation et ainsi éviter la formation d'un microclimat favorable au développement de *B. cinerea* (Dik and Wubben, 2004).

- Raisonnement la fertilisation en évitant un apport excessif d'engrais azotés pour limiter le développement de *B. cinerea* (Pitchay et al., 2007).

La lutte culturale est intéressante dans la mesure où elle n'implique pas de coûts supplémentaires et où elle peut s'intégrer dans les objectifs économiques de l'exploitation.

## II-3. Méthodes biologiques :

La définition officielle (de l'OILB-SROP: Organisation Internationale de la Lutte Biologique-Section Régionale Ouest Paléarctique) stipule que la lutte biologique est : « l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ». L'objectif n'est pas de stopper totalement les maladies, mais plutôt de réguler leur progression de manière à les maintenir au-dessous d'un seuil acceptable (Vasquez, 2017).

La lutte biologique contre *B. cinerea* peut être effectuée par différents agents ayant une activité antagoniste vis-à-vis de ce champignon. Sur une vigne, un extrait de Renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis*, nom commercial Milsana) est un moyen de défense efficace contre *B. cinerea* entraînant un meilleur contrôle de la pourriture grise

(**Ajouz, 2009**). Ce produit est d'ailleurs homologué aux Etats-Unis sur cultures ornementales, en tant que biofongicide. Les composés minéraux et organiques tels que : la carbonate de potassium ( $K_2CO_3$ ), le bicarbonate de sodium ( $NaHCO_3$ ), etc. réduisent la croissance mycélienne de *B. cinerea* et l'incidence de la pourriture grise sur baies de raisins (**Nigro et al., 2006**).

D'autres produits sont homologués tels que le Binab à base de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma polysporum*, ainsi que le champignon *Microdochium dimerum*, souche L13, qui est efficace dans la protection des plaies d'effeuillage (**Mahmoudi and Louanchi., 2012**) L'utilisation du produit Serenade à base de *Bacillus subtilis* est également une bonne alternative dans le contrôle de *B. cinerea* en traitement post-récolte (**Vasquez, 2017**).

#### **II-4. Protection intégrée :**

Selon l'OILB la protection intégrée est définie par: « *L'utilisation de méthodes justifiables sur le plan économique, écologique et toxicologique pour maintenir les organismes nuisibles en dessous du seuil de tolérance économique tout en exploitant et en mettant à profit les facteurs de contrôle naturel* ».

La vigne est attaquée par plusieurs maladies principalement celles causées par *B. cinerea* en affectant les racines, le bois, les feuilles et les baies. Cette lutte consiste à intégrer plusieurs méthodes de lutte biologique, physique et chimique. Ces méthodes sont utilisées de façon préventive (prophylaxie) ou réactive (utilisation rationnelle des fongicides) (**Decognet, 1997**). Ce programme est basé sur la prévention des maladies et exige une bonne planification et ce, avant même la plantation du vignoble.

La protection intégrée nécessite le respect d'un certain nombre de conditions. Assurer un environnement sain à la culture, maîtriser le climat, observer les plantes afin de détecter très tôt les anomalies, raisonner les interventions chimiques et introduire des auxiliaires de qualité en quantité suffisante représentent des conditions indispensables à sa réussite (**Nicot, 1997**). Ceci demande l'implication de tous les acteurs de la protection intégrée.



# **Matériels et méthodes**

**Choix des isolats :**

Les échantillons fongiques ont été collectés à partir des chancres sporulés de différentes parties aériennes de la vigne (feuilles, baies,...) durant la saison culturale 2014 dans la région agricole d'Amizour, Bejaïa. Les échantillons prélevés ont été purifiés par la technique d'isolement monospore, caractérisés morphologiquement puis conservés à (-20°C) (Khelifa, 2017).

Un total de 15 isolats a été sélectionné sur la base des résultats de la caractérisation morphologique (Khelifa, 2017) à raison de 5 isolats par morphotype (Tableau II).

**Tableau II :** Caractéristiques morphologiques des isolats de *B. cinerea* sélectionnés.

Morphotype	Codes	Mycélium	Sporulation	Sclérote
M2	BCV 2, BCV 4 BCV 11, BCV 16 BCV 18	Aérien	1 ou 2	0
M4	BCV 8, BCV 9 BCV 13, BCV 21 BCV 42	Epais et dense	1	0
S2	BCV 3, BCV 10 BCV 14, BCV 29 BCV 49	Plutôt rasant	1	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles

- **Sporulation** : 0 : absence ; 1 : sporulation peu abondante ; 2 : sporulation très abondante

- **Sclérotés** : 0 : absence ; 1 : rares ; 2 : très abondantes

**I- Test de résistance des isolats de *B. cinerea* vis-à-vis de trois fongicides :****I-1. Revivification des isolats :**

Chaque prélèvement sporale a été ensemencé par touche sur la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA (**Potatoes Dextrose Agar, Annexe I**). Les boîtes ont été incubées sept jours dans une étuve réglée à 22 °C et à l'obscurité.

**I-2. Repiquage :**

Les colonies développées ont été repiquées en condition stérile et mises en culture dans les mêmes conditions, le temps qu'elles sporulent (environ 07 jours). Dans une boîte de Pétri, pour chaque isolat et à l'aide d'un scalpel, un disque mycélien de 5 mm a été découpé et déposé au centre de la boîte de Pétri contenant du milieu PDA, puis les boîtes sont incubées à 22 °C pendant 7 jours.

**I-3. Préparation des solutions fongicides :**

Comme il a déjà été rapporté dans les différentes recherches menées dans ce domaine, la dose discriminatoire des trois fongicides avec lesquels nous avons travaillé est de 5 µg/ml. Pour chaque fongicide trois dilutions ont été préparées 0, 1 et 5.

La préparation des solutions de fongicides se fait de la même manière pour les trois fongicides (Carbendazime, Méthyl-thiophanate et le Dithiocarbamate de manganèse "Manèbe"). Dans un bécher, 10 mg de fongicide sont mélangés à 100 ml d'eau distillée, chauffés à 60 °C et mis sous agitation pendant 2 heures. Après avoir obtenu une solution bien homogénéisée, une filtration de la solution avec du papier filtre 30 µm a été réalisée afin d'éliminer les impuretés. Les solutions fongicides sont par la suite conservées dans des tubes stériles dans le frigo.

Calcul des volumes à ajouter de chaque fongicide :

$$[ 0 ] \quad V_{01} = C_2 \cdot V_2 / C_1 = 0 \times 100 / 0,1 \cdot 10^3 = 0 \text{ ml}$$

$$[ 1 ] \quad V_{11} = C_2 \cdot V_2 / C_1 = 1 \times 100 / 0,1 \cdot 10^3 = 1 \text{ ml}$$

$$[ 5 ] \quad V_{51} = C_2 \cdot V_2 / C_1 = 5 \times 100 / 0,1 \cdot 10^3 = 5 \text{ ml}$$

**C1** : concentration du fongicide

**V1** : volume de la solution fongicide a ajouté au milieu PDA

**C2** : concentration des dilutions

**V2** : volume du milieu PDA contenu dans le flacon

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par **Leroux et al. (1999)**. Différentes dilutions ont été préparées ;

- La dilution 0 : correspond au témoin où le flacon contient que le milieu PDA.
- La dilution 1: 1 ml de la solution fongicide a été ajoutée dans 100 ml de milieu PDA.
- La dilution 5 : 5 ml de la solution fongicide ont été ajoutées dans 100 ml de milieu PDA.

Un disque mycélien de 5 mm a été prélevé d'une culture jeune âgée de 3 jours et déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA additionnée d'une solution de fongicide à tester puis les boîtes ont été incubées à l'obscurité à 22 °C. La mesure du diamètre de croissance mycélienne a été effectuée le septième jour sur deux diamètres perpendiculaires. Deux boîtes de Pétri ont été utilisées pour chaque concentration de fongicide et pour chaque isolat ainsi qu'un test témoin a été préparé pour chaque isolat.

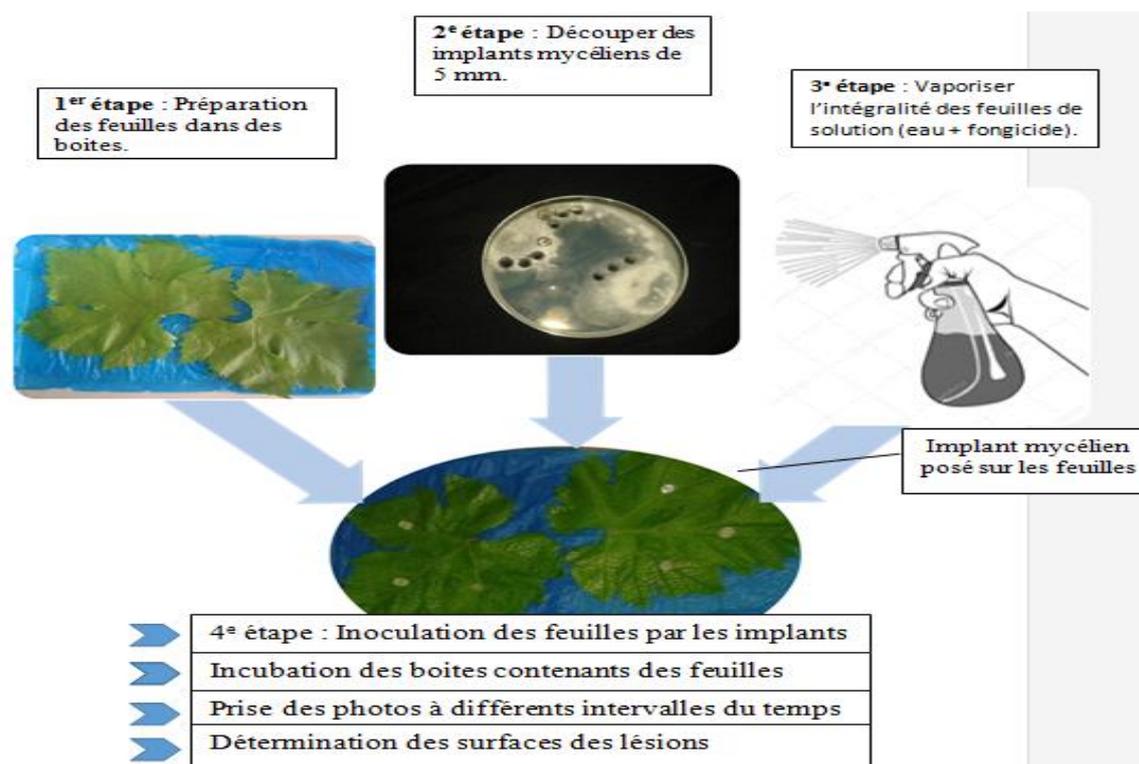
## **II. Evaluation de l'agressivité de *B. cinerea* en présence des fongicides sur feuilles détachées de vigne :**

L'agressivité constitue un trait de caractérisation très important. Il permet de déterminer le niveau d'agressivité des isolats sélectionnés sur les feuilles de vigne.

Le test a été effectué sur les feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv. Seedless) qui proviennent de la ville de Bejaïa. Des feuilles âgées de deux mois, n'ayant subi aucun traitement fongicide, de taille uniforme ont été recueillies. Les feuilles ont été placées dans des boîtes en plastique transparentes contenant du papier absorbant de couleur bleu humidifié à l'eau distillé stérile. (**Protocole INRA AVIGNON France**).

### **II-1. Inoculation :**

L'inoculation des feuilles s'est faite après trois jours d'incubation ; trois implants mycéliens de 5 mm de diamètre de chaque isolat ont été prélevés de culture jeune, et déposés au centre de chaque feuille (trois implants mycélien par feuille et par isolat préalablement traités par pulvérisation avec l'un des fongicides testé) (**Figure 05**). Des boîtes témoin ont été préparées avec des feuilles inoculées uniquement avec les implants mycéliens de chaque isolat sans le fongicide. L'ensemble des boîtes ont été incubées à une température ambiante du laboratoire pendant 96 heures.



**Figure 05 :** Etapes du test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur les feuilles de vigne avec et sans fongicide.

## II-2. Lecture des résultats :

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 à 96 heures 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 mm<sup>2</sup> des lésions (Annexe II).

## III. Traitement des données :

Les résultats obtenus en présence des fongicides sur les boîtes de Pétri et sur les feuilles détachées ont été transformés en pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante :

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

**I%** : pourcentage d'inhibition

**D<sub>témoin</sub>** : diamètre de la croissance (lésion) en absence de fongicide.

**D<sub>test</sub>** : diamètre de la croissance (lésion) en présence de fongicide.



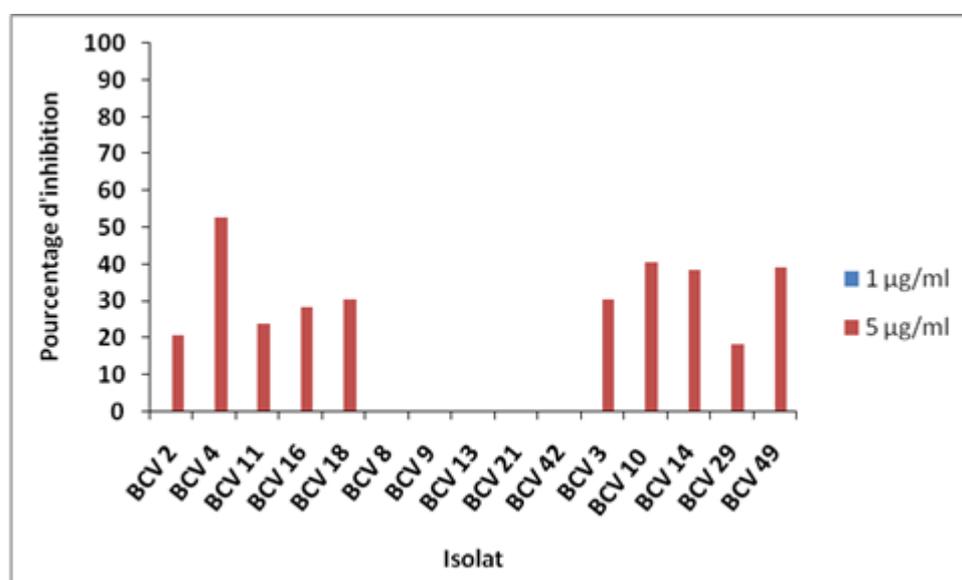
# Résultats et discussion



## I- Résultats du test de résistance des isolats de *B. cinerea* vis à vis de trois fongicides :

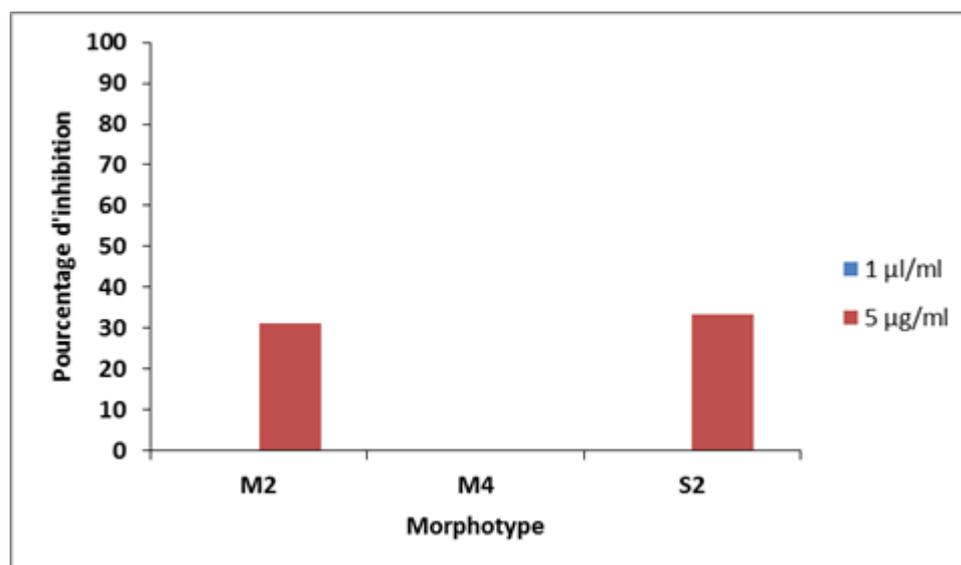
### I-1. Résultat de l'effet du Manèbe (Dithiocarbamate de manganèse) sur la croissance de *B. cinerea* :

La croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés a été variable selon la concentration du fongicide. Tous les isolats ont été résistants à la concentration de 1 µg/ml. Tandis qu'à 5 µg/ml, la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* a été affectée d'une manière différente. Aucun effet n'a été observé pour les isolats BCV 8, BCV 9, BCV 13, BCV 21 et BCV 42, tandis que le reste des isolats ont montré une croissance qui varie entre 21% et 50 % (**Figure 06**).



**Figure 06 :** Inhibition de la croissance mycélienne des isolats *B. cinerea* par le Manèbe.

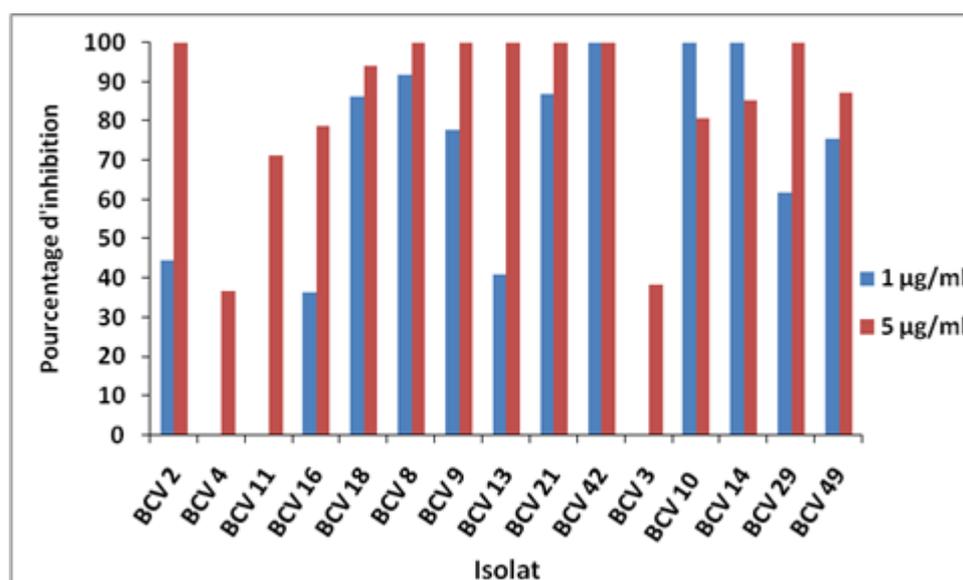
La croissance mycélienne des groupes (morphotype) de *B. cinerea* en présence de 1 µg/ml n'a montré aucune différence entre les morphotypes (résistance de tous les isolats). Seul le morphotype M4 a montré une croissance optimale à 5 µg/ml. Parallèlement, les morphotypes M2 et S2 ont été inhibé par le Manèbe à 31 % et 33 % respectivement (**Figure 7**), ce qui suggère l'existence d'une relation entre le morphotype et la résistance au Manèbe.



**Figure 07** : Inhibition de la croissance mycélienne des trois morphotypes de *B. cinerea* par le Manèbe.

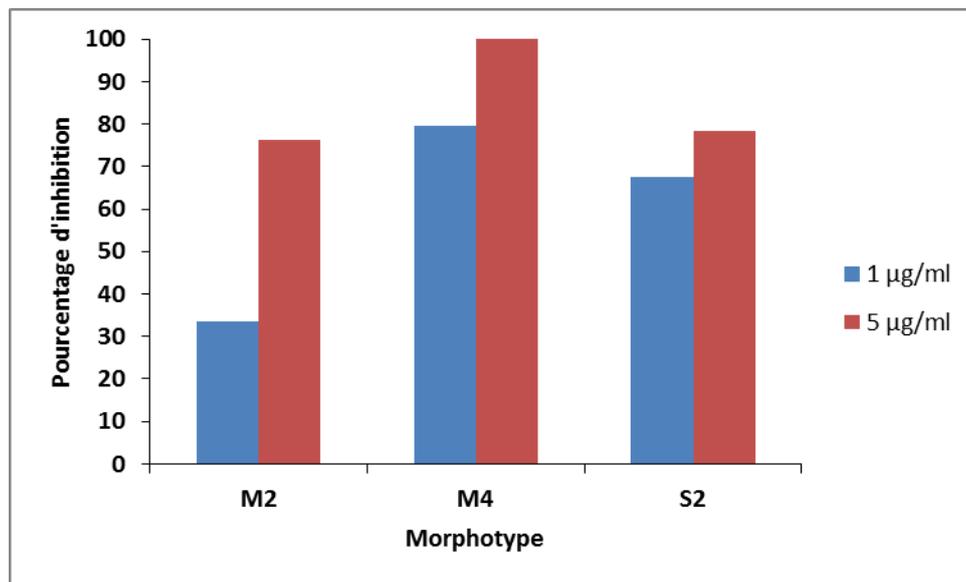
### I-2. Résultat de l'effet du Méthylthiophanate sur la croissance de *B. cinerea* :

La croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés a été variable selon la concentration du fongicide. A 1 µg/ml, BCV 3, BCV4 et BCV 11 ont été les isolats les plus résistants. Une inhibition complète de la croissance a été observée pour les isolats BCV 10, BCV 14 et BCV 42. En revanche le reste des isolats ont montré une croissance qui varie entre 36% et 92%. Tandis qu'à 5 µg/ml, tous les isolats ont été affectés d'une façon différente avec des taux d'inhibition compris entre 37% et 100% (**Figure 08**).



**Figure 08** : Inhibition de la croissance mycélienne des isolats *B. cinerea* par le Méthylthiophanate.

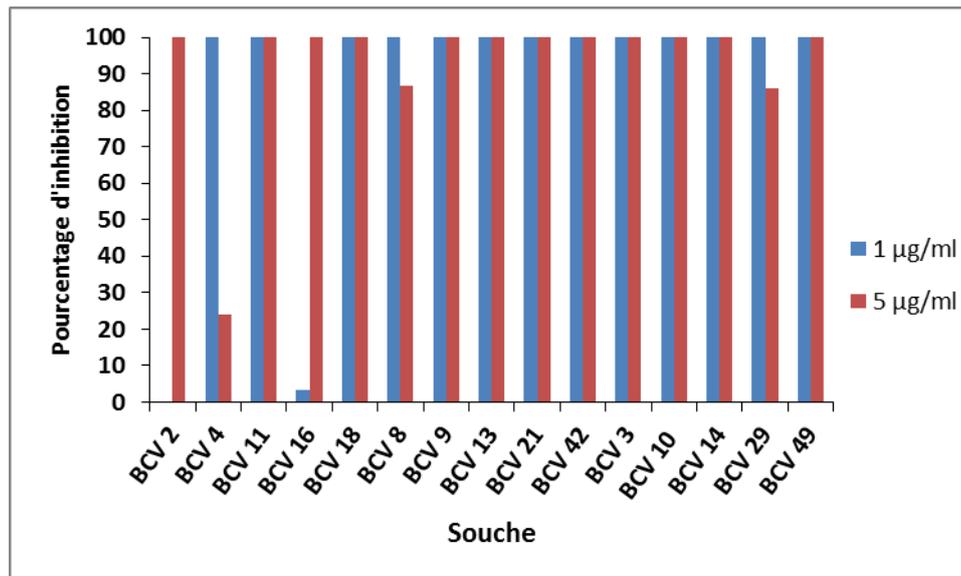
La comparaison entre croissance mycélienne des groupes (morphotype) de *B. cinerea* en présence de 1 µg/ml a montré une variabilité de résistance entre les morphotypes allant de 33% à 79%. Seul le morphotype M2 a montré une résistance avec une inhibition de croissance de 33% comparé au deux autre morphotypes M4 et S2 avec 79% et 68% d'inhibition respectivement. A une concentration de 5 µg/ml, le morphotype M4 a été complètement inhibé. Le fongicide a pu inhiber la croissance mycélienne des morphotypes M2 et S2 à 76% et 78% respectivement (**Figure 09**).



**Figure 09** : Inhibition de la croissance mycélienne des trois morphotypes de *B. cinerea* au Méthylthiophanate.

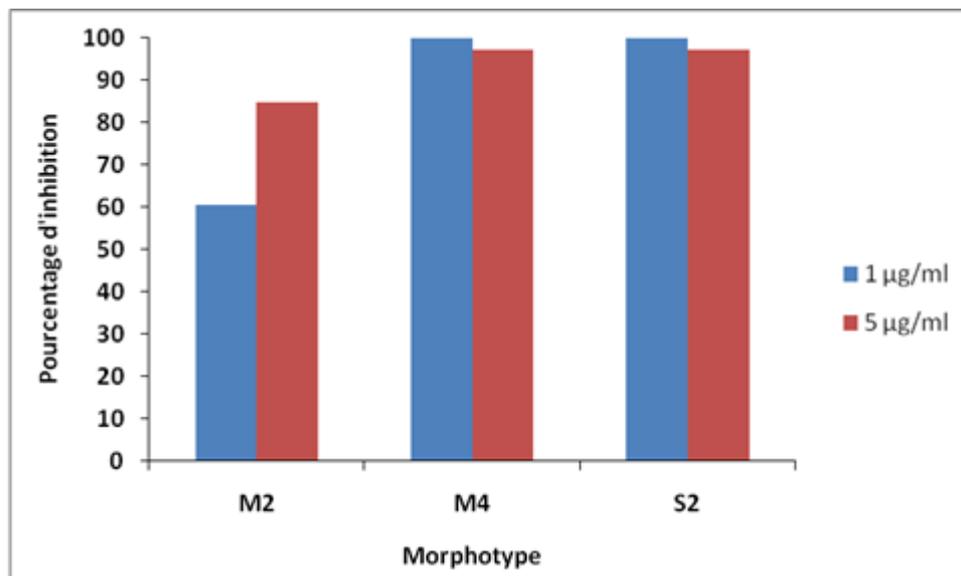
### I-3. Résultats de l'effet du Carbendazime sur la croissance de *B. cinerea* :

La croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés a été similaire en présence des deux concentrations du fongicide. A 1 µg/ml, seuls les deux isolats BCV 16 et BCV 2 ont montré une résistance avec des pourcentages d'inhibition qui varient entre 3% et 0%. Absence totale de la croissance mycélienne a été observée pour les autres isolats. A la concentration de 5 µg/ml, une inhibition de croissance quasi totale a été constatée pour tous les isolats excepté BCV 4, BCV8 et BCV 29 ayant un taux d'inhibition compris entre 24% et 87% (**Figure 10**).



**Figure 10 :** Inhibition de la croissance mycélienne des isolats *B. cinerea* au Carbendazime.

La croissance mycélienne des groupes (morphotype) de *B. cinerea* en présence de 1 µg/ml a été stoppée pour les deux morphotypes M4 et S2, tandis que le morphotype M2 n'a été inhibé qu'à 61%. La même situation a été observée pour la concentration de 5 µg/ml de Carbendazime (**Figure 11**), ce qui suggère l'existence relation entre morphotype et résistance à Carbendazime.



**Figure 11 :** Inhibition de la croissance mycélienne des trois morphotypes de *B. cinerea* au Carbendazime.

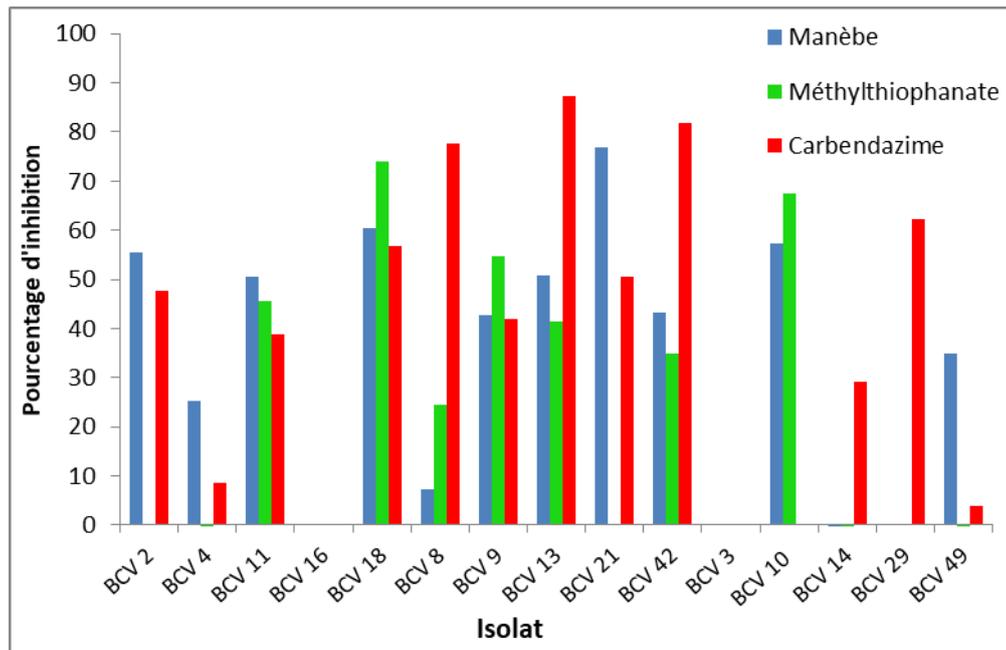
## II- Résultats du test d'agressivité sur les feuilles détachées de vigne en présence des fongicides :

Une grande variabilité de diamètres de lésions sur les feuilles détachées de vigne a été observée entre les isolats de *B. cinerea* en présence des trois fongicides (**Figure 12**).



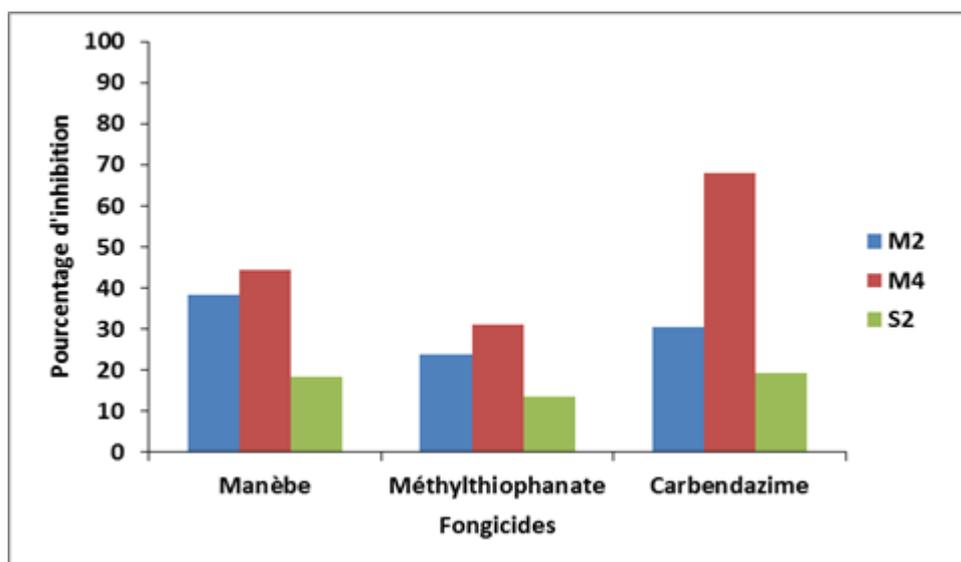
**Figure 12** : Symptômes causés par un isolat de *B. cinerea* autour des points d'infection sur feuilles de vigne.

En présence de 5 µg/ml du Manèbe, les isolats BCV 3, BCV 14, BCV 16 et BCV 29 ont été les plus agressifs, l'isolat BCV 21 a été le moins agressif avec un pourcentage d'inhibition de 77%. La même situation a été observée en présence de 5 µg/ml de Méthylthiophanate, avec la présence des isolats très agressifs à savoir les isolats BCV 3, BCV 14, BCV 16, BCV 2, BCV 29, BCV 4, BCV 49 et BCV 21. Par contre en présence de 5µg/ml de Carbendazime, la majorité des isolats testés ont causé peu ou pas de lésions à l'exception des isolats BCV 3, BCV 10, BCV 16 qui ont causé des lésions équivalentes au témoin (**Figure 13**).



**Figure 13 :** Agressivité des isolats de *B. cinerea* sur feuilles détachées de vigne en présence des trois fongicides.

La comparaison de l'agressivité des groupes d'isolats de *B. cinerea* (morphotype) en présence de 5 µg/ml de chaque fongicide a montré que le morphotype S2 a été le morphotype le plus agressif des trois morphotypes, avec des pourcentages d'inhibition de 13%, 18% et 19% sur Méthylthiophanate, Manèbe et Carbendazime respectivement (**Figure 14**).



**Figure 14:** Agressivité des morphotypes de *B. cinerea* sur feuilles détachées de vigne en présence de trois fongicides.

## Discussion :

La présente étude sur la résistance des isolats de *B. cinerea* collectés à partir des feuilles de vigne 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 isolats de *B. cinerea* en présence des différentes concentrations de trois fongicides. L'étude effectuée au laboratoire concernant la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* en présence de 1 µg/ml du Manèbe a montré que les 15 isolats testés ont été résistants. A une concentration de 5 µg/ml, le champignon a continué de se développer avec des pourcentages d'inhibition inférieurs à 54%. Seuls les isolats du morphotype M4 ont été résistants à cette concentration. 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 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 isolats de *B. cinerea* ont réagi différemment vis-à-vis des deux autres fongicides testés. Le traitement avec le Méthylthiophanate a révélé qu'à 1 µg/ml, une variabilité de croissance a été enregistrée pour tous les isolats avec des pourcentages d'inhibition qui ont varié entre 36% et 100%. Les isolats : BCV 4 et BCV 11 du groupe « M2 » ont été les plus résistants ainsi que le BCV 3 du groupe « S2 » avec une croissance optimale à cette concentration. La plupart des isolats ont été inhibés à 5 µg/ml avec des taux d'inhibitions de 38% à 100%. Ces résultats corroborent ceux obtenus 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 une sensibilité des isolats à la concentration supérieure à 2 ppm de Méthylthiophanate sur la croissance mycélienne. Contrairement à ce que **Hmouni et al., (1996)**, ont mené comme étude sur 10 isolats de *B. cinerea* avec traités du Méthylthiophanate qui ont continué à se développer, et ceci même à des concentrations de 1000 ppm ; une autre recherche a été menée par **Hmouni et al., (2003)**, et qui a montré une variabilité de résistance aux

différents fongicides utilisés dont le Méthylthiophanate à 100 ppm, et cela après avoir inoculé 6 isolats de *B. cinerea* recueillis de Tomate.

En présence du Carbendazime, les isolats de *B. cinerea* ont été plus sensibles où la croissance mycélienne de tous les isolats a été inhibé avec 1 µg/ml. Seul les isolats : BCV 2 et BCV 16 du morphotype « M2 » qui ont été résistants. La même situation a été obtenue avec 5 µg/ml, mis à part l'isolat BCV 4 pour laquelle la croissance mycélienne a été inhibée seulement à 24%. Les autres isolats des trois morphotypes ont été sensibles. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Latorre et al., (2012)**, qui ont réalisé une étude sur 214 isolats de *B. cinerea* obtenus à partir des échantillons de raisin recueillis dans un total de 36 vignobles commerciaux, le Carbendazime à 1 µg/ml a montré une efficacité élevée avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 65%. Nos résultats contredisent ceux obtenus par **Panebianco et al., (2015)**, qui ont également réalisé une étude sur 302 isolats de *B. cinerea* recueillis et traités avec le Carbendazime 50 ppm. Cette étude a révélé une importante variabilité de résistance de ces isolats à ce fongicide. Le même a été observé dans l'étude de **Liu et al., (2016)** qui ont également suivis la croissance mycélienne de 263 isolats de *B. cinerea* prélevés à partir de tomate, après traitement avec le Carbendazime à 1 µg/ml, ils ont obtenu une forte résistance du champignon avec un pourcentage de croissance 89,4 %. De même **Mekwilai et Nalumpang (2017)** ont signalé des cas de résistance au Carbendazime après avoir inoculés sur un milieu PDA 50 isolats de *B. cinerea* isolés du vignoble à une concentration de 100 ppm,

Les tests d'agressivité réalisés sur les feuilles de vigne ont montré que les isolats des trois morphotypes de *B. cinerea* ont une agressivité très variable. Les isolats appartenant au morphotype « S2 » ont été les plus agressifs sur Méthylthiophanate, Manèbe et Carbendazime respectivement avec des pourcentages d'inhibition de 13, 18 et 19 %. On note que les isolats les plus résistants ont été : BCV 3 « S2 » et BCV 16 « M2 ». Cela nous a permis de mettre en évidence une grande diversité du niveau d'agressivité des isolats de *B. cinerea* étudiés. Notre résultat concorde avec celui obtenu par **Shen et al. (2009)**, qui ont réalisé une étude sur la pathogénicité de 26 souches de *B. cinerea* sur les feuilles de concombre. Ces auteurs ont remarqué une différence importante de pathogénicité entre les souches testées. C'est ce qui a été démontré par **Leroux et al., (1985)** en réalisant des tests d'agressivité. Ils ont étudié des souches de *B. cinerea* recueillis du vignoble français, qui ont montré une augmentation d'apparition des isolats

résistants dans les vignobles français au Carbendazime et Méthylthiophanate avec des facteurs de résistance supérieurs à 1000.

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



# Conclusion

*B. cinerea* responsable de la pourriture grise a été désigné comme modèle d'étude dans le cadre de notre projet de recherche des profils de résistance de la croissance mycélienne des isolats aux fongicides (Méthylthiophanate, Manèbe et le Carbendazime), isolés dans le vignoble.

La croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés a été variable selon la concentration du fongicide. Tous les isolats ont été résistants à la concentration de 1 µg/ml du Manèbe. Tandis qu'à 5 µg/ml des pourcentages d'inhibitions inférieurs à 50% ont été enregistrés pour la plupart des isolats. Une inhibition progressive de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés en fonction de la concentration du Méthylthiophanate. Une forte inhibition de la croissance mycélienne a été obtenue en présence de 5µg/ml du Carbendazime avec des pourcentages d'inhibition équivalents à 100% pour la plupart des isolats. La comparaison de la croissance mycélienne entre les morphotypes ne montre aucune différence entre les trois morphotypes en présence de 5µg/ml des trois fongicides testés. Nous avons noté une résistance totale des trois morphotypes au Manèbe, et une sensibilité supérieure à 76% et 85% aux Méthylthiophanate et Carbendazime respectivement.

L'agressivité de 15 isolats de *B. cinerea* a été évaluée sur les feuilles détachées de vignes traitées avec 5µg/ml des trois fongicides (Méthylthiophanate, Manèbe et Carbendazime). Les résultats obtenus ont montré une diversité entre les isolats de *B. cinerea* à causer des lésions sur les feuilles détachées de vigne. Le morphotype S2 du type sclérotien a été le plus agressif avec des pourcentages d'inhibition inférieurs à 19% pour les trois fongicides. Tandis que les deux autres morphotypes de type mycélien M2 et M4 ont été les moins agressifs avec des taux d'inhibition inférieurs à 68% pour les trois fongicides. Ces résultats ont montré que le Carbendazime a été le plus efficace sur les isolats de *B. cinerea* testés.

Les résultats obtenus lors de 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 vigne. Il serait intéressant de compléter cette étude par :

- Elargir l'échantillonnage afin de confirmer les résultats obtenus dans cette étude,
- Réaliser des tests d'agressivité sur la plante entière traitée avec des fongicides,
- Etudier le profil de résistance de *B. cinerea* aux fongicides sur d'autres plantes,

- Utiliser d'autres fongicides pour mieux comprendre le profil de résistance de *B. cinerea*,
- Tester l'action des fongicides à des faibles concentrations en synergie avec d'autres molécules bioactive vers une protection intégrée.

# **Références bibliographiques**

A

Agrios G.N. (2005). Plant pathology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, 922p.

Aissat Kamel, Nicot Philippe C, Guechi Abdelhadi, Bardin Marc, Chibane Mohamed. Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. Agron. Sustain. Dev Vol.28, n°3, p.403- 409. Disponible sur : <https://doi.org/10.1051/agro:2008016>

Ajouz, Sakhr. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Université d'Avignon et Des Pays de Vaucluse Faculté des Sciences. 212p

Amarni, Badiaa. Perspectives prometteuses pour la viticulture. Djazaïress, la Tribune. (2009). Disponible sur : <https://www.djazairress.com/fr/latribune/18278>

Amselem, J., Cuomo, Ca., Van Kan, Jal., Viaud, M., Benito Ep., *et al.* Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet*, (2011), vol. 7, n°8, p.1-27. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876677>

Anonyme, 2008 ([www.genoscope.cns.fr](http://www.genoscope.cns.fr))

Aubertot J N., Barbier J M., Carpentier A., Gril J J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I and Voltz M. (2005) Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. . In Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France) : 68p.

## B

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

Blakeman, J.P. Germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. Transactions of the British Mycological Society, (1975), vol.65, n° 2, p. 239-247.

Blancard, D., Sorel, M., Fermaud, M. *Moisissure grise (Botrytis cinerea) : Biologie, épidémiologie*. in site e-phytia, [en ligne]. <[ephytia.inra.fr/fr/C/6089/Vigne-Moisissure-grise-botrytis-cinerea](http://ephytia.inra.fr/fr/C/6089/Vigne-Moisissure-grise-botrytis-cinerea)>.

## C

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

Cecchini,G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. Annu. Rev.Biochem, (2003), n°72, p.77–109.

Clark, C.A., and Lorbeer, J.W. Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. Phytopathology, (1977); vol.67, p. 212-218. (Article)

Couderchet, M. Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne. Vitis, (2003); vol.42, n°4, p.165-171.

## D

Daugaard, H., Sorensen, L., and Loschenkohl, B. Effect of plant spacing, nitrogen fertilisation, post-harvest defoliation and finger harrowing in the control of *Botrytis cinerea* Pers. in strawberry. *European Journal of Horticultural Science*, (2003), n° 68, p.77-82.

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*, (2012); vol.13, n°4, p.414–430. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22471698>

Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y., Nicot, P.C. Rapid change in the genetic diversity of *B. cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathol*, (2009); vol.99, n°2, p.185-193.

Decognet, V., Nicot, P., Trottin-Caudal, Y., and Fournier, C. 1997. Biocontrol of *Botrytis cinerea* stem infection on greenhouse tomatoes with an antagonistic strain of *Fusarium*. 10th congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Montpellier, France, 1997/06/1-5, p. 695-699

Dik, A.J., Wubben, J.P. Epidemiology of *B. cinerea* diseases in greenhouses. In *Botrytis: biology, pathology and control*, (2004), p. 319-333.

Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. (2006). Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology*, (2006); vol.152, p. 2625-2634.

## E

Elad, Y., Köhl, J., and Fokkema, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, (1994a); vol.100, p. 315-336.

Elad, Y., Shtienberg, D., and Niv, A. *Trichoderma harzianum* T39 integrated with fungicides: improved biocontrol of grey mould, in: Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, (1994b); vol.3, British Crop Protection Council, Farnham, UK., p. 1109-1113

Elad, Y., Williamson, B., P.Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. Jarvis, R. W. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Canada Department of Agriculture, Ottawa.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. (2004). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, edition Springer, Kluwer academic publisher. Netherlands: 412 p.

Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen. (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands. Disponible sur : [https://books.google.dz/books?id=XjK\\_BAAAQBAJ](https://books.google.dz/books?id=XjK_BAAAQBAJ).

Elad, Y., and Yunis, H. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica*, (1993); vol. 21, p.257-268.

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

Elmer, P., and Michailides, T. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. 243p

## F

FAOstat, (2016). Food and Agriculture. Organisation. Statistics database, 2016.

Florence Ackermann et al, Guide régional pour la plantation de vigne, 2002 : Plantation de la VIGNE - IFV Sud-Ouest <https://www.vignevin-sudouest.com/.../classeur-regional-plantation-vigne-web.pdf>

### G

Gary, C., Brisson, N., Gaudillere, JP., Duarte, M. Modélisation d'une espèce ligneuse pérenne à fruits charnus : la Vigne. *Séminaire STICS, Arles*, (2003), p.36-37.

### H

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

Hmouni, A., Oihabi, L., Badoc, A. et Douira, A. Étude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc). *Bulletin - Société de Pharmacie de Bordeaux*, (2003); vol.142, p.79-100.

Holz, G., Coertze, S., and Williamson, B. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, , in: *Botrytis: biology, pathology and control*, (2004), p.9-27.

### J

Jarvis, R. W., 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Canada Department of Agriculture, Ottawa.

## K

Khelifa Katia, Adjebli Ahmed. (2017). Isolement et Caractérisation Des Souches de *Botrytis Cinerea* Sur Le Vignoble Dans La Region de Bejaia. Abderrahmene Mira Bejaia.

## L

Latorre, B. A. and R. Torres (2012). "Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards." Crop Protection **40**: 49-52.

Leroux, P. "Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes." Comptes Rendus Biologies, (2003); vol.326, n°1, p.9-21.

Leroux, P. 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, (2004), p.195-222.

Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and 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. and M. Clerjeau (1985). "Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards." Crop Protection **4**(2): 137-160.

Li, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N., and Erickson, R.S. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. Plant Disease, (2004); vol. 88, p.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 **84**: 56-61.

## M

Mahmoudi Mohamed El Hadi., and Louanchi M. (2012). Contribution à l'étude de *Botrytis Cinerea* Pers Agent de La Pourriture Grise : Variabilité Biologique et Essais de Lutte Chimique et Biologique. ENSA : département de Botanique, 89p.

Magnin-Robert M, P. Trotel-Aziz, D. Quantinet S, Biagianti Aziz, Aziz. (2007). Biological control *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\alpha$ -1,3-glucanase activities under field conditions. Eur J Plant Pathol.

Martinez F, Corio-Costet Mf, Levis C, Coarer M and Fermaud M, 2008. New PCR primers applied to characterize distribution of *Botrytis cinerea* populations in French vineyards. *Vitis*, 47, 217-26.

Messiaen C.M., Blancard A., Rouxel F., Et Lafon R. (1991). Les maladies des plantes maraîchères. 3ème édition. I.N.R.A, 546p.

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

Mireille Navarrete, M. Tchamitchian, C. Aissa Madani, B. Collange, C. Taussig. Elaborating Innovative Solutions With Experts Using A Multicriteria Evaluation Tool. The Case Of Soil Borne Disease Control In Marketgardening Cropping Systems. Emilie Coudel, Hubert Devautour, Christophe-Toussaint SOULARD, Bernard HUBERT. ISDA 2010, Jun 2010, Montpellier, France. Cirad-Inra-SupAgro, 10 p., 2010.

## N

Navarrete, M., Tchamitchian, M., Madani, C.A., Collange, B. and Taussig, C. (2010). Elaborating innovative solutions with experts using a multicriteria evaluation tool. The case of soil borne disease control in market gardening cropping systems. In ISDA 2010- Innovation and Sustainable Development in Agriculture and Food, Montpellier, France, Cirad-Inra-SupAgro. 10 p.

Nicot, P. "Perspectives de lutte raisonnée et biologique". Fruits et légumes, (1997), n° 157, p. 39-42.

Nicot, PC., Mermier, M., Vaissiere, BE., Lagier, J. Differential spore production by *B.cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. Plant Disease, (1996); vol. 80, p. 555-558.

Nigro, F., Schena, L., Ligorio, A., Pentimone, I., Ippolito, A., and Salerno, M.G. Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. Postharvest Biology and Technology, (2006); vol.42, p. 142-149.

## O

OIV (2017), Organisation internationale de la vigne et du vin. Disponible sur : <http://www.oiv.int/fr/organisation-internationale-de-la-vigne-et-du-vin>

## P

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

Pitchay, D.S., Frantz, J.M., Locke, J.C., Krause, C.R. et Fernetz, G.C.J. Impact of applied nitrogen concentration on growth of *Elatior begonia* and New Guinea impatiens and susceptibility of *begonia* to *B.cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural science*, (2007); vol.132, p. 193-201.

Porquier, Antoine. (2016). Etude Des Mécanismes de Régulation Du Métabolisme Secondaire Chez *Botrytis Cinerea*. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2016SACLS480/document>.

## 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*. 25-28.

## V

Vasquez Hilarion. Stimuler les défenses des plantes contre *Botrytis cinerea* par des rayonnements UV-C. *Sciences agricoles*. Université d'Avignon, 2017. Français. ⟨NNT : 2017AVIG0695⟩ . ⟨tel-01755100⟩

## W

Walker, Anne-sophie. (2013). Diversité et Adaptation Aux Fongicides Des Populations de *Botrytis Cinerea*, Agent de La Pourriture Grise. 213p. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2013PA112067/document>.

Walker, Anne-Sophie., Micoud, Annie., Rémuson, Florent., et al. French Vineyards Provide Information That Opens Ways for Effective Resistance Management of *Botrytis*

*Cinerea* (Grey Mould). Pest Management Science, (2013); vol.69, n°6, p.667–678.  
Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/ps.3506>, accessed April 14, 2018.

Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan JAL. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Mol. Plant Pathol, (2007); vol.8, p.561–580.

Wingfield MJ, De Beer ZW, Slippers B, Wingfield BD, Groenewald JZ, Lombard L, Crous PW, 2012. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. Molecular Plant Pathology 13: 604e613.

## Y

Yunis, H., Elad, Y., and Mahrer, Y. Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on gray mold of cucumbers in unheated greenhouses. Phytoparasitica, (1990); vol.18, p. 203-215.



# Liste des annexes

## Annexe I : Milieu de culture

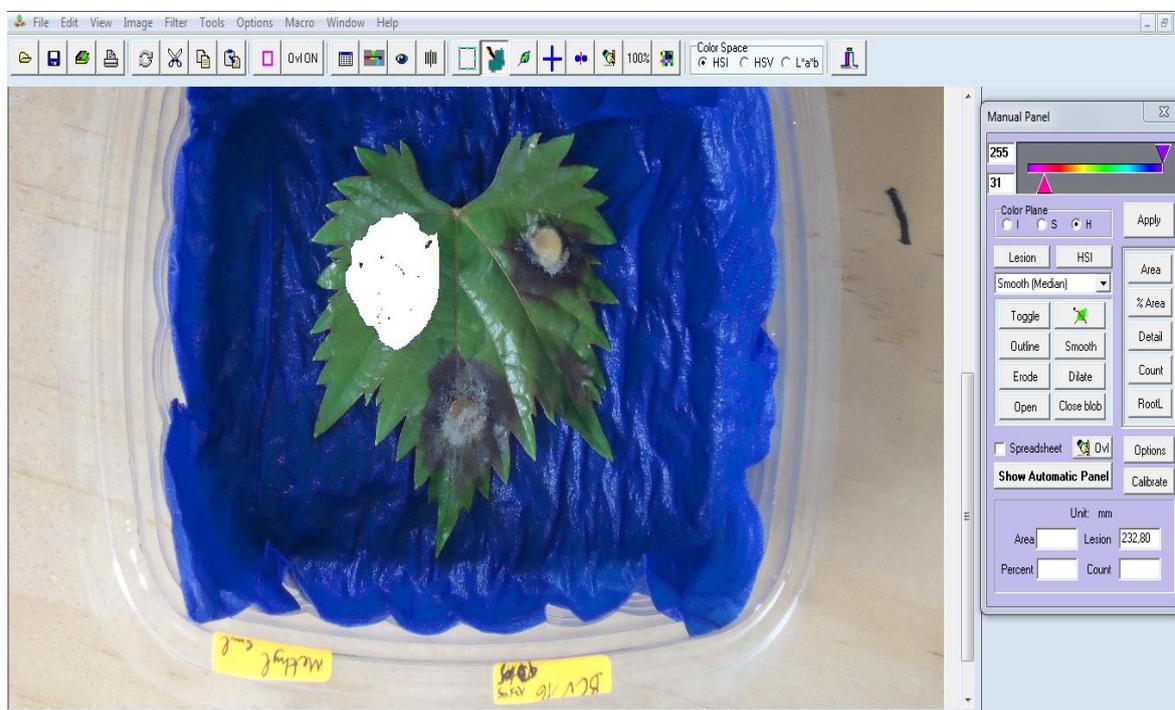
### Milieu PDA

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar .....	15g
Eau distillée .....	1l
pH.....	5,40±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

## Annexe II : Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0



## Annexe II : Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0



## Annexe II : Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0



## Résumé

*Botrytis cinerea* est un champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise qui atteint plusieurs cultures d'intérêt agronomique. Le présent travail œuvre pour l'étude du profil de résistance de 15 isolats de *B. cinerea* répartis en trois morphotypes (S2, M2 et M4) vis-à-vis de trois fongicides (Méthylthiophanate, Carbendazime et Manèbe). La croissance mycélienne des différents isolats en présence de deux concentrations (1 µg/ml et 5 µg/ml) de chaque fongicide a été estimée sur le milieu PDA. L'agressivité des isolats en présence de 5 µg/ml de chaque fongicide a été évaluée sur des feuilles détachées de vigne. Une résistance quasi-totale de tous les isolats en présence de 1 µg/ml et 5 µg/ml du Manèbe. Une inhibition graduelle de la croissance mycélienne a été observée en présence des deux concentrations de Méthylthiophanate. Une forte sensibilité de tous les isolats a été enregistrée en présence du Carbendazime. On note une relation entre le profil de résistance en fonction du morphotype. Une grande variabilité d'agressivité des isolats de *B. cinerea* en présence de 5 µg/ml de chaque fongicide. Les isolats du morphotype S2 ont été plus agressifs avec des pourcentages d'inhibition de 13%, 18% et 19% en présence de Méthylthiophanate, Manèbe et Carbendazime respectivement. Tandis que le morphotype M4 a été le moins agressif en présence des trois fongicides avec des pourcentages d'inhibition de 31%, 44% et 68% en présence du Méthylthiophanate, Manèbe et Carbendazime respectivement. Ces résultats peuvent aider les agriculteurs de notre région avant d'envisager un traitement anti-Botrytis.

**Mots clés :** *Botrytis cinerea*, Morphotype, Fongicide, Agressivité.

-----  
----

## Abstract

*Botrytis cinerea* is a phytopathogenic fungus responsible for gray mold that can affects several crops of agronomic interest. The present work investigates the resistance profile of 15 isolates of *B. cinerea* distributed into three morphotypes (S2, M2 and M4) to three fungicides (Methylthiophanate, Carbendazim and Maneb). Mycelial growth of all isolates was estimated on the PDA medium at the presence of two concentrations (1 µg/ml and 5 µg/ml) of each fungicide. The aggressiveness of the isolates in the presence of 5 µg/ml of each fungicide was evaluated on detached leaves of vine. A total resistance of all isolates in the presence of 1 µg/ml and 5 µg/ml of Maneb. Gradual inhibition of mycelial growth was observed in the presence of both concentrations of Methylthiophanate. A high sensitivity of all isolates was recorded in the presence of Carbendazim. There is a relationship between the resistance profile and the morphotype. A great variability of aggressiveness of isolates of *B. cinerea* in the presence of 5 µg / ml of each fungicide. Isolates of the morphotype S2 were more aggressive with percentage of inhibition of 13%, 18% and 19% in the presence of Methylthiophanate, Maneb and Carbendazim, respectively. While the M4 morphotype was the least aggressive in the presence of the three fungicides with percent inhibition 31%, 44% and 68% in the presence of Methylthiophanate, Maneb and Carbendazim respectively. These results can help farmers in our area before considering treatment of gray mold.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, Fungicide, Morphotype, Aggressiveness.