

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université A. Mira De Bejaia**

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



Réf : .....

**Mémoire de fin de cycle**  
**En vue l'obtention du diplôme**  
**MASTER**

***Thème***

**Etude de l'effet d'un agent de lutte biologique à l'égard  
d'une collection de souches de *Botrytis cinerea***

Présenté par :

**AIS Tinhinane**

**AGAOUA Souad**

Soutenu le : 08 Juin 2023

Devant le jury composé de :

**Mr. Bensaïd karim**

**MAA**

**Président**

**Mr. Adjebli Ahmed**

**MCA**

**Examineur**

**Mlle. Bouaoud Yousra**

**MCB**

**Promotrice**

**Année universitaire : 2022/2023**

# Remerciements

Avant tout, on tient à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

On tient particulièrement à remercier Madame Bouaoud. Y pour nous avoir fait l'honneur d'être notre promotrice, de nous avoir fait confiance, nous avoir encouragées et conseillées tout en nous laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité.

On tient à remercier également Mr. Bensaid K d'avoir fait l'honneur de juger ce travail et de présider le jury.  
On tient à remercier aussi Mr. Adjebli A d'avoir accepté de donner de leur temps pour examiner ce travail.  
On tient également à exprimer nos reconnaissance et nos sincère gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant ce cursus universitaire.

On tient particulièrement à remercier le laboratoire de l'énergie renouvelable de Mr. Nabti. H, ainsi que Mme Bensidhoum L

Merci à tous nos collègues du laboratoire, et les ingénieures Kerrache L et Tabet S, pour nous avoir encouragés et aidés et pour les bons moments passés ensemble.

Merci à toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail.

**Merci à tous**

# Dédicace

Je le plaisir de dédier ce modeste travail à :

Mes merveilleux parents, pilier de ma vie, merci pour vos sacrifices et votre soutien sans fin.

Mes chers frères "Atmane et Farid" et sœurs "Nassira et Samia", mes compagnons de route.

Tous mes amis (e) adorés, votre soutien et votre affection sont inestimables.

A la personne qui m'as beaucoup soutenu moralement.

Mon amie et ma binôme "Tinhinane" merci d'être là à chaque étape de notre parcours ensemble.

Souad

# Dédicace

A mes chers parents pour leurs soutiens et leurs encouragements tout au long de  
ma carrière.

A mes chers frères "Menad et Jugurtha"

A toute ma famille surtout" Kahina, Saida et Melissa"

A mon fiancé " Fateh " qui m'a encouragé et qui a été toujours à mes cotés

A mon amie et binôme" Souad "qui a partagée avec moi les bons et les difficiles  
moments

A tous mes amis(e)

A tous ceux qui m'ont encouragé de près ou de loin.

Tinhinane

# Sommaire

## **Sommaire**

### **Liste des abréviations**

### **Liste des tableaux**

### **Listes des figures**

### **Introduction ..... 1**

### **Chapitre 1: *Botrytis cinerea*: Agent pathogène de la pourriture grise**

1. Description de l'agent pathogène .....	3
2. Historique et taxonomie .....	4
3. Variabilité phénotypique et génotypique de <i>Botrytis cinerea</i> .....	4
3.1. Variabilité phénotypique .....	4
3.2. Variabilité génotypique .....	5
4. Symptômes.....	6
5. Cycle de développement de <i>Botrytis cinerea</i> .....	7
6. Facteurs influençant le développement de <i>B. cinerea</i> .....	9
6.1 Les exigences nutritives.....	9
6.2 La température .....	9
6.3 L'humidité .....	9
6.4 La lumière.....	10
7. Importance économique .....	10

### **Chapitre 2: Stratégies de lutte contre *Botrytis cinerea***

1. Pratiques culturales .....	12
2. Lutte génétique.....	13
3. Lutte chimique .....	13
4. Lutte biologique .....	16
4.1 Mécanisme d'action des agents de biocontrôle .....	16
4.1.1. Mécanismes directe .....	16
4.1.2 Mécanismes indirect.....	18
4.2 La durabilité de la lutte biologique .....	20
5. Protection intégrée .....	233

### **Matériels et méthodes**

1. Revivification et repiquage des souches Fongiques et bactériennes .....	24
--	----

1.1	Souches fongiques .....	24
1.2	Souches bactériennes.....	24
2.	Aspect microscopique et macroscopique des souches de <i>B. cinerea</i> .....	25
3.	Test d'évaluation de l'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> .....	25
3.1	Agressivité sur les feuilles de laitue .....	25
3.2	Evaluation de la sporulation des souches de <i>B. cinerea</i> .....	26
4.	Evaluation de la diversité de sensibilité des souches de <i>B. cinerea</i> vis-à-vis des agents de lutte biologique <i>in vitro</i> .....	27
4.1	Évaluation de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> .....	27
4.1.1.	Confrontation directe.....	27
4.1.2.	Confrontation indirecte (effet des substances volatiles).....	28
4.2.	Évaluation de l'effet des bactéries sur la germination des spores des souches de <i>B. cinerea</i> .....	29
4.3.	Évaluation de l'effet des bactéries sur la production des spores des souches de <i>B. cinerea</i> .....	30
5.	Evaluation de la diversité de sensibilité des souches de <i>B. cinerea</i> vis-à-vis des agents de lutte biologique <i>in vivo</i> .....	31

### Résultats et discussions

1.	Caractéristiques morphologiques des souches de <i>B. cinerea</i> .....	33
2.	Test d'évaluation de l'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> .....	34
2.1.	Agressivité <i>in vivo</i> .....	34
2.2.	Evaluation de la sporulation des souches de <i>B. cinerea</i> .....	36
3.	Évaluation de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> .....	38
3.1.	Confrontation directe .....	38
3.2.	Confrontation indirecte.....	40
4.	Évaluation de l'effet des bactéries sur la germination des spores des souches de <i>B. cinerea</i> .....	43
5.	Évaluation de l'effet des bactéries sur la production des spores des souches de <i>B. cinerea</i> .....	45
6.	Evaluation de la diversité de sensibilité des souches de <i>B. cinerea</i> vis-à-vis des agents de lutte biologique <i>in vivo</i> .....	47

### Conclusion

### Références bibliographiques

**Liste des abréviations**

ALG: Algérie

AUDPC: Area Under the Disease Progress Curve

*B. cinerea* : *Botrytis cinerea*

DO: Densité Optique

GN : gélose nutritive

IOLB : Organisation International de Lutte Biologique

ISP% : pourcentage d'inhibition de sporulation

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

MAMPs: Microbe-Associated Molecular Patterns

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

PGI% : pourcentage growth inhibition

PGIv% : pourcentage growth inhibition volatile

PIgrem% : pourcentage d'inhibition de germination

SAR: Résistance Systématique acquise

SDP: Stimulateurs de Défense de la Plante

UFC : unité formant colonie



**Liste des tableaux**

Numéro du tableau	Titres du tableau	page
Tableau I	Position systématique de <i>B. cinerea</i>	4
Tableau II	Différents groupes de fongicides synthétique anti-Botrytis	15
Tableau III	Exemples de biopesticides d'origine microbienne commercialisée dans le monde contre <i>B. cinerea</i>	18
Tableau IV	Principaux avantages et inconvénients de la lutte biologique	19

Listes des figures

Numéro de la figure	Titres de la figure	Page
Figure 1	Aspect microscopique et macroscopique de <i>B. cinerea</i> (A) conidiophores portant des conidies et (B) mycélium et sclérotés sur milieu PDA	3
Figure 2	Symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes plantes et des organes.	6
Figure 3	Symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes plantes et des organes.	8
Figure 4	Apothécies de <i>Botryotinia fuckeliana</i> la forme téléomorphe de <i>B. cinerea</i> isolées sur une pêche en Nouvelle-Zélande (à gauche et au centre). Groupe d'apothécies produit en laboratoire (à droite)	8
Figure 5	Revivification et repiquage des souches de <i>B. cinerea</i> .	24
Figure 6	Repiquage des deux bactéries <i>Bacillus methylotrophicus</i> T29 et <i>Bacillus sp</i> LK	25
Figure 7	Technique du Scotch test pour l'observation microscopique de <i>B. cinerea</i>	25
Figure 8	Test d'agressivité <i>in vivo</i> réalisé sur feuilles de laitue.	26
Figure 9	Évaluation de la sporulation des souches de <i>B. cinerea in vitro</i>	27
Figure 10	Test d'antagonisme <i>in vitro</i> par confrontation direct.	28
Figure 11	Test d'antagonisme <i>in vitro</i> par confrontation indirect (effet des substances volatiles)	29
Figure 12	Évaluation de l'effet des agents de lutte biologique sur la germination des différentes souches de <i>B. cinerea</i> .	30
Figure 13	Évaluation de l'effet des agents de lutte biologique sur la sporulation des différentes souches de <i>B. cinerea</i> .	31
Figure 14	Test de diversité de sensibilité <i>in vivo</i> « sur feuilles de laitue ».	32
Figure 15	Photo montrant l'aspect macroscopique de <i>B. cinerea</i> (A et B) et l'aspect microscopique (C).	33

Figure 16	Agressivité des dix souches de <i>B. cinerea</i> sur feuilles de laitue. Chaque valeur représente la moyenne des répétitions +/- l'erreur standard associée à chaque valeur.	34
Figure 17	Photos des lésions provoquées par les différentes souches de <i>B. cinerea</i> sur les feuilles de laitue	35
Figure 18	Sporulation <i>in vitro</i> des dix souches de <i>B. cinerea</i>	37
Figure 19	Photos de <i>B. cinerea</i> présentant des niveaux différents de sporulation (A : sporulation faible ; B : sporulation moyenne et C : forte sporulation)	37
Figure 20	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des dix souches de <i>B. cinerea</i> en présence des deux souches bactériennes.	39
Figure 21	Différents niveaux d'inhibitions de la croissance mycélienne « effet direct » des souches de <i>B. cinerea</i> par les agents de lutte biologiques	40
Figure 22	Pourcentage d'inhibition des substances volatiles sur la croissance mycélienne du champignon phytopathogène <i>B. cinerea</i> par les deux bactéries testées.	41
Figure 23	Différents niveaux d'inhibitions de la croissance mycélienne « effet indirect » des souches de <i>B. cinerea</i> par les agents de lutte biologiques	42
Figure 24	Pourcentage d'inhibition de la germination des spores de <i>B. cinerea</i> en présence des deux bactéries	43
Figure 25	Photo sous microscope optique montrant les spores de <i>B. cinerea</i> germées et non germées	44
Figure 26	Pourcentage d'inhibition de la sporulation des souches de <i>B. cinerea</i> en présence des deux bactéries.	45
Figure 27	Photos montrant des niveaux de sporulation différents en présence des bactéries (A, B), et en présence du témoin sans la bactérie (C) est un témoin, observés sous microscope optique au grossissement $\times 10$ . La photo (D) montre les différents niveaux de sporulation sur boîte de Pétri en présence des bactéries juste avant l'observation au microscope.	46

## Liste des figures

---

Figure 28	Diamètres des lésions observés sur feuilles de laitue en présence des bactéries et en absence des bactéries (témoin)	47
Figure 29	Photos des feuilles de laitues infectées par les souches de <i>B. cinerea</i> en présence de traitement avec les bactéries (A et B) et en absence de traitement (C).	48

# **Introduction**

### Introduction

Les agriculteurs doivent affronter divers problèmes chaque année afin d'améliorer leur production annuelle. Parmi ces problèmes, les maladies des plantes sont une préoccupation majeure à l'échelle mondiale, entraînant chaque année des pertes significatives. Ces maladies, qu'elles soient d'origine biotique ou abiotique, sont responsables de ces pertes (Booth et al., 2022).

*Botrytis cinerea*, l'un des bioagresseurs, qui peut causer des dommages à de nombreuses espèces végétales dans diverses conditions et sur une large zone géographique, qu'il s'agisse de cultures en plein champs mais surtout sous serre. En outre *B. cinerea* peut également endommager les produits agricoles après leur récolte, même à des températures très basses (Elad, 1997). En Algérie, ce champignon est reconnu comme l'un des principaux agents pathogènes affectant les plantes de tomates (Aissat et al., 2008 ; Adjebli, 2015).

Afin de mieux gérer les dégâts causés par ce pathogène, différentes méthodes de lutte sont mises en œuvre. Cependant, ces méthodes sont limitées en raison de la grande variabilité génétique et phénotypique de *B. cinerea* et malgré les efforts déployés pour contrôler cette maladie, les pertes de cultures et de production peuvent rester élevées (Dean et al., 2012).

Par ailleurs, l'efficacité des fongicides reste incontestable mais leur utilisation croissante, parfois irrationnelle, pose de nombreux problèmes sanitaires et environnementaux (Walia et al., 2021). En générale, les pesticides chimiques sont responsables de certaines maladies chez les agriculteurs et les consommateurs. Les résidus de ces produits se retrouvent dans près de 40% des aliments vendus sur le marché (Elnahal et al., 2022). De plus, il a été démontré que les pesticides représentent une menace pour la biodiversité. Ils nuisent fréquemment aux microorganismes bénéfiques et entraînent la disparition de certaines espèces essentielles à l'équilibre de l'environnement. Ils constituent également l'une des principales causes de la pollution des eaux souterraines (Walia et al., 2021; Booth et al., 2022 ; Elnahal et al., 2022).

Il est donc nécessaire de trouver des alternatives plus respectueuses de l'environnement qui doivent être à la fois efficaces, sûres, faciles à utiliser et susceptibles de remplacer les fongicides (Taponjoui et al., 2005). C'est dans ce contexte, que la lutte biologique a émergé comme une des solutions suscitant l'intérêt des chercheurs à l'échelle mondiale. Cette

approche consiste à utiliser des agents vivants tels que des microorganismes ou leur dérivés pour combattre les maladies des plantes (Elnahal et al., 2022).

Jusqu'à présent, il y a eu peu de recherches qui se sont penchées sur l'étude de la durabilité de la lutte biologique. Ce manque de documentation est principalement dû au fait que cette méthode est moins mise en avant par rapport à la lutte chimique, qui bénéficie d'une plus large utilisation (Bardin et al., 2021).

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail dont l'objectif est d'évaluer d'une part, l'effet de deux agents de lutte biologique du genre *Bacillus* sur le développement des souches de *B. cinerea* à différents stades de croissance, et d'autre part, d'étudier la diversité de sensibilité des dix souches de *B. cinerea vis à vis* des agents de lutte biologiques testés pour se rendre compte de la durabilité de la lutte biologique et son efficacité à long terme. C'est à partir de là que nous avons émis les hypothèses suivantes :

- Les deux agents de lutte biologique utilisés dans cette étude, sont-ils efficaces pour lutter contre *B. cinerea* ?
- Existe-t-il au sein de la population de *B. cinerea* des souches présentant une sensibilité moindre aux agents de lutte biologique ?

Pour répondre à nos objectifs et vérifier ces hypothèses nous avons divisé notre travail en deux parties :

**Partie bibliographique** : qui retrace les principales caractéristiques du champignon *B. cinerea* et présente les différentes stratégies utilisées pour lutter contre ce champignon phytopathogène.

**Partie expérimentale** : qui consiste à évaluer les deux agents de lutte biologique appartenant au genre *Bacillus* sur les différentes souches de *B. cinerea* *in vivo* et *in vitro* à différents stades de développement du champignon (croissance mycélienne, sporulation et germination des spores).

# **Synthèse bibliographique**

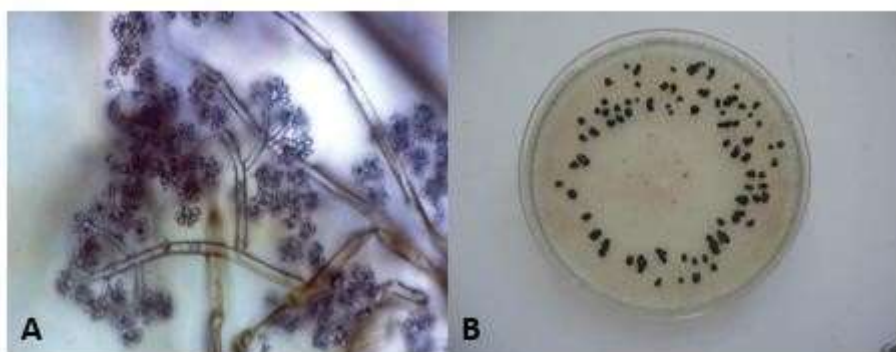


## 1. Description de *B. cinerea*

*Botrytis cinerea* est un champignon responsable de la pourriture grise, il est polyphage et est capable de provoquer la maladie et des dégâts importants sur une large gamme d'hôte. Ce champignon est capable d'attaquer plus de 1400 espèces végétales différentes, étant donné qu'il peut se développer sur plusieurs plantes hôtes (Valero-Jiménez et al., 2019). *B. cinerea* a la capacité de provoquer la maladie à différents stades de développement des végétaux et peut également toucher plusieurs parties de la plante (feuilles, tiges, pétioles et fruits). Il est présent aussi bien sous serre qu'en plein champs, mais c'est dans les cultures sous abris que les attaques sont plus importantes étant donné que l'environnement confiné et humide lui sont plus propice (Elad, 1997 ; Blancard et al., 2009).

L'apparition de cette maladie est influencée par plusieurs facteurs tels que les conditions météorologiques, la sensibilité de la plante affectée et les méthodes culturales employées. Ces facteurs peuvent faciliter le développement de cette maladie (Blancard et al., 2009).

L'agent pathogène *B. cinerea* développe un mycélium à filaments articulés, de couleur brunâtre ou olivâtre, qui peut varier considérablement en diamètre en fonction des croissances des hyphes. Au stade fructifère, le mycélium produit des touffes de conidiophores grisâtres et ramifié, qui contiennent des grappes de conidies libérées facilement par temps humide et portées par les courants d'air. Le champignon forme également des sclérotés irréguliers, composés de deux parties distinctes le cortex et la médulla qui jouent un rôle important dans sa survie (Holz et al., 2007)



**Figure 1:** Aspect microscopique et macroscopique de *B. cinerea* (A) conidiophores portant des conidies et (B) mycélium et sclérotés sur milieu PDA (Bryone, 2011).

## 2. Historique et taxonomie

C'est en 1927 que le genre *Botrytis* qui contient actuellement ~35 espèces (Elad et al., 2016) a été reconnu par Micheli. Au début il a été parfois confondu avec *Sclerotinia spp.* En 1900 des éclaircissements ont été apportés par Smith, puis Whetzel a dissipée la confusion en 1945 (Elad et al., 2007).

*B. cinerea* est classé selon deux classifications distinctes (Tableau 01) :

- Une forme parfaite téléomorphe, *Botryotinia fuckeliana* de bary wetzel
- Une forme imparfaite anamorphe, *Botrytis cinerea pers*

**Tableau I :** Position systématique de *B. cinerea*

	<b>Forme Imparfaite</b>	<b>Forme Parfaite</b>
Super-classe	Septomycètes	Septomycètes
Classe	Deuteromycètes	Ascomycètes
Sous-classe	Hyphomycètes	Discomycètes
Ordre	Moniliales	Pézizales
Famille	Moniliacées	Hélotiacées
Genre	<i>Botrytis</i>	<i>Botrytinia</i>
Espèce	<i>cinerea</i>	<i>fuckeliana</i>

Une relation génétique entre *Botryotinia fuckeliana* appelé au départ *Peziza fuckeliana* (organisme sexué), et *Botrytis cinerea Pers* (organisme asexué) a été établi par Bary en 1866. Pour la première fois en 1939, une observation faite par Crover et Drayon a permis de constater la formation d'apothécies *in vitro* par *B. cinerea* confirmant un lien systématique entre les deux formes.

## 3. Variabilité phénotypique et génotypique de *Botrytis cinerea*

### 3.1. Variabilité phénotypique

Plusieurs recherches ont démontré que *B. cinerea* a une grande diversité phénotypique, principalement caractérisée par des variations dans la morphologie des colonies, la croissance mycélienne, l'intensité de la sporulation, la virulence, la production d'enzymes et la résistance aux fongicides (Chardonnet et al., 2000 ; Martinez et al., 2003 ; Yourman et al., 2001).

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'influence de la qualité de la lumière sur la capacité de *B. cinerea* à produire des conidies, les résultats de leurs recherches ont montré que la sporulation été induite par les rayons ultraviolets (300-400nm) et les infrarouges (>720 nm) (Elad, 1997). Cependant, certains auteurs ont noté que l'absence de la lumière sur les milieux de cultures PDA (potatos Dextrose Agar) et MA (Malt Agar) empêche la sporulation (Dik et Wubben, 2007).

La capacité des isolats naturels de *B. cinerea* à causer des dommages varie considérablement selon la plante hôte. Des différences de l'agressivité des isolats ont été constatées sur différentes plantes, telles que la vigne et la tomate, comme l'a démontré l'étude de Martinez et al., (2003).

Les populations de *B. cinerea* ont une sensibilité variable aux fongicides, comme indiqué dans l'étude de Yourman et al., (2001). Selon Myresiotis et al., 2007, l'étude menée sur 55 isolats de *B. cinerea* collectés lors d'une saison de culture de légumes dans 18 serres en Crète, a montré que 61,8% des isolats étaient résistants aux benzimidazoles, 57,4% au cyprodinil, 49,1% au pyriméthanile et 18% aux dicarboxymides.

### 3.2 Variabilité génotypique

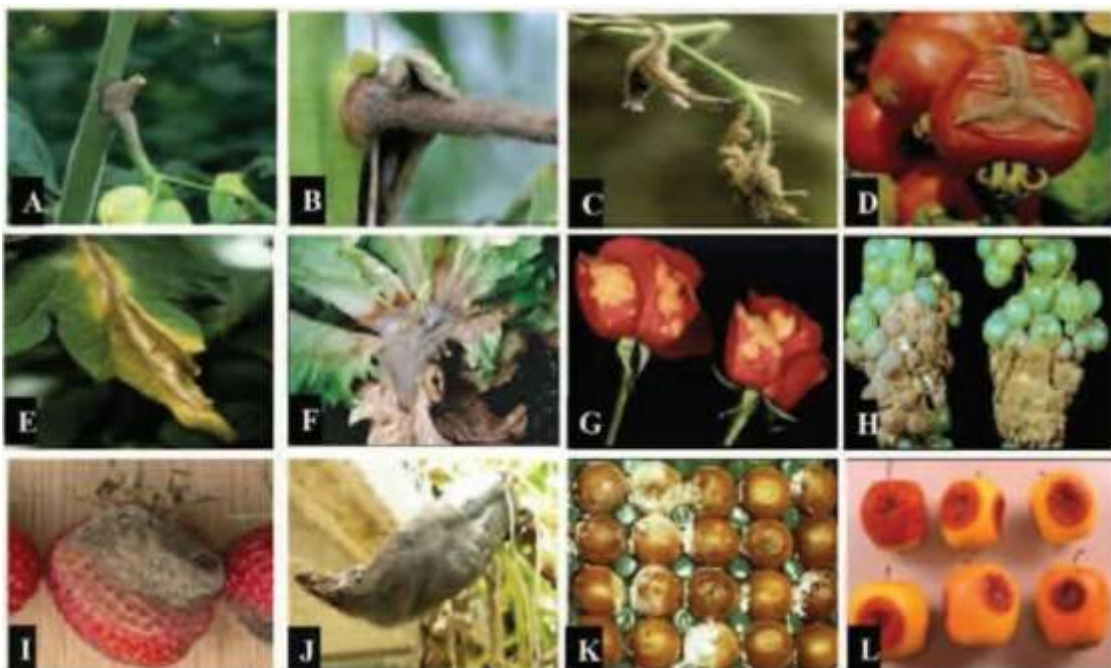
*B. cinerea* est un champignon qui possède une grande diversité génotypique (Fekete et al. 2012 ; Karchani-Balma et al. 2008). Selon des études, la reproduction sexuée chez *B. cinerea* joue un rôle important dans la structure génétique du champignon, bien qu'elle soit rarement observée dans la nature (Isenegger et al., 2008). Comme pour d'autres ascomycètes, chez *B. cinerea*, la recombinaison sexuée est considérée comme un facteur clé dans la détermination de la structure génétique de la population. En effet, elle favorise l'émergence de nouveaux génotypes et contribue à la diversité et à l'évolution génétique (Isenegger et al. 2008 ; Milgroom et Peever 2003 ; McDonald et Linde 2002)

Par ailleurs, les récentes analyses phylogénétiques ont permis d'identifier deux principaux groupes génétiques, le groupe I où on retrouve *Botrytis pseudocinerea* et le groupe II qui correspond à *Botrytis cinerea* sensu stricto qui contient des souches vacuola et transposa (Walker, 2016). Des études similaires ont été entreprises en Algérie en utilisant les marqueurs RAPD et Microsatellites. Les résultats indiquent qu'il y a une diversité intra et inter spécifique pour deux espèces de *Botrytis sp.*, *B. cinerea* et *B. fabae* (Adjebli et al., 2015).

#### 4. Symptômes

*Botrytis cinerea* est responsable d'une très large gamme de symptômes (Figure 1) et ceux-ci ne peuvent pas être facilement généralisés à tous les organes et tissus de la plante. Les pourritures molles, suivies d'apparitions rapides de masses grises de conidies sont peut-être les symptômes les plus typiques sur les feuilles et les fruits mous. Sur de nombreux fruits et légumes, l'infection commence généralement sur les fleurs sénescentes attachées puis, sous forme de pourriture molle, elle se propage pour affecter le fruit adjacent (Williamson et al., 2007)

L'étude de Vasquez, (2017) rapporte que *B. cinerea* est capable d'attaquer toute la partie aérienne de la plante telle que les inflorescences et les fruits. Sur les feuilles, il est possible d'observer une pourriture humide marron à brune et des taches humides et brunes qui se développent en bordure du limbe. Ce champignon provoque sur les inflorescences une pourriture qui affecte les graines récoltables chez certaines espèces. Les tissus se couvrent d'un feutrage gris caractéristique de la plante attaquée par le pathogène, en constituant des fructifications du champignon.

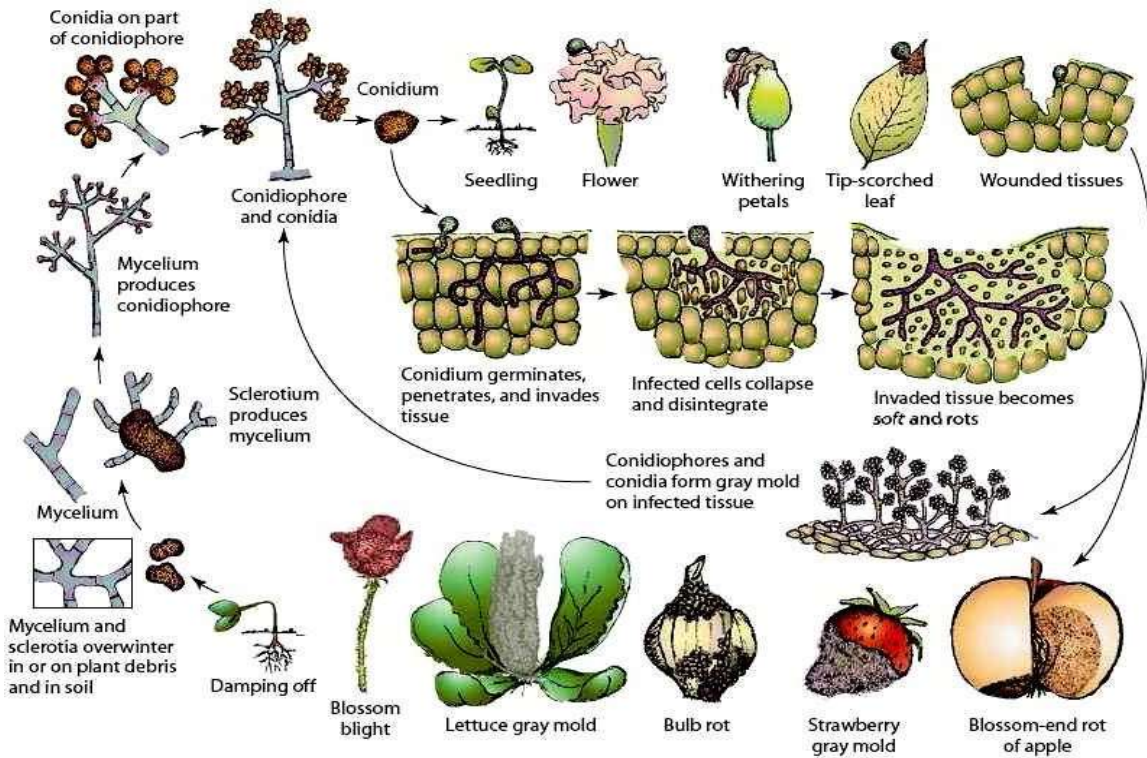


**Figure 2 :** Symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur différentes plantes et des organes. (A) Plaie d'ébourgeonnage sur tomate. (B) Tige de tomate. (C) Inflorescence. (D) Fruit de tomate. (E) Feuille de tomate. (F) Laitue. (G) Fleurs du rosier. (H) Grappe du raisin. (I) Fraise. (J) Poivron. (K) Kiwi. (L) Pomme (Agrios, 2005).

## 5. Cycle de développement de *Botrytis cinerea*

Durant son cycle biologique, *B. cinerea* peut se trouver sous plusieurs formes : mycélium, spores sexuées (ascospores), des spores asexuées (conidies), chlamydospores, sclérotés et apothécies (Feliziani et Romanazzi, 2016). *B. cinerea* peut survivre au champ en tant que saprophyte, où il colonise les résidus de fleurs, les gouttes de jus de fruits, les feuilles mortes ou d'autres parties non vivantes de la plante (Romanazzi et Droby, 2016). Par simplification, on distingue différents stades dans le cycle de la maladie de *B. cinerea*. Dans les cas de conditions environnementales défavorables à sa croissance, le champignon peut se préserver sous forme de mycélium dans les débris végétaux, ou sous forme de sclérotés. Ces derniers sont constitués d'un amas blanchâtre de mycélium qui se durcit et noircit avec le temps (Amselem et al., 2011 ; Feliziani et Romanazzi, 2016) , Au printemps, les conditions sont favorables à la germination des sclérotés qui produisent du mycélium. Ce dernier se développe en organes de fructification asexués appelés conidiophores, porteurs de spores asexuées ou conidies. Ces dernières adhèrent à la surface des tissus végétaux et émettent des tubes germinatifs qui se transforment en appressorium (Kars et van Kan, 2007). La capacité de germination des conidies est grandement déterminée par les conditions de température et d'humidité. Une fois que le tube germinatif se développe, il peut se frayer un chemin dans le tissu par divers moyens, soit en traversant la cuticule directement, soit en profitant d'une blessure causée par une opération de taille ou de défeuillage. Le champignon peut également envahir les tissus qui sont sénescents, nécrosés et/ ou morts (Blancard et al., 2009). Les conidies de *B. cinerea* sont omniprésentes dans l'air et peuvent être transportées par le vent et la pluie sur de longues distances avant d'infecter l'hôte suivant (van Kan, 2003 ; Holz et al., 2007).





**Figure 3** : Symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur différentes plantes et des organes.(Agris, 2005).

Il est possible que les sclérotés se reproduisent sexuellement pour produire des apothécies brunâtres qui contiennent de nombreuses ascospores. Bien que ces apothécies soient rarement observées dans les champs, des études ont démontré que les ascospores peuvent avoir une incidence épidémiologique significative (Lorbeer et al., 2007 ; Feliziani et Romanazzi, 2016).



**Figure 4** : Apothécies de *Botryotinia fuckeliana* la forme téléomorphe de *B. cinerea* isolées sur une pêche en Nouvelle-Zélande (à gauche et au centre). Groupe d'apothécies produit en laboratoire (à droite) (Beever et Weeds, 2004).

## 6. Facteurs influençant le développement de *B. cinerea*

### 6.1. Les exigences nutritives

La germination des spores, le développement du mycélium et la formation des appressoria chez *B. cinerea* nécessitent une source de nutriments exogènes tels que le carbone et l'azote, car les conidies de cette espèce ne disposent que de peu de réserves énergétiques (Blakeman 1975 ; Li et al. 2004). La germination des spores de *B. cinerea* dans l'eau (absence de nutriments) a cependant été observée pour certaines souches (Doehlemann et al., 2006). La germination et l'élongation du filament germinatif sont favorisées par la présence des nutriments comme le glucose et le fructose (Clark et Lorbeer, 1977) et permettent à des conidies âgées de retrouver leur pouvoir germinatif (Shiraishi et al., 1970).

### 6.2. La température

La température idéale pour la croissance mycélienne varie selon les souches de *B. cinerea*, mais en général elle est de 18 à 23 °C (Jarvis, 1977). Pendant que la température idéale pour la germination des conidies est entre 20 à 30°C. A noter qu'à des températures supérieures à 35°C et inférieures à 5°C, les spores de *B. cinerea* ne germent pas après 48 heures d'incubation. A 10 °C la germination est très retardée avec seulement 60% de conidies germées après 48 heures d'inoculation (Shiraishi et al., 1970). Par ailleurs, à une température de 21°C le mycélium aérien et la sporulation se développent d'une façon très rapide (Thomas et al., 1988).

### 6.3 L'humidité

Parmi les facteurs importants influençant le processus des infections liées au genre *Botrytis* on retrouve l'humidité relative et la disponibilité en eau à la surface des plantes (Thomas et al., 1988). (Jarvis, 1977) a rapporté que les conidies de *B. cinerea* germent à 100% à 20 °C, 15 °C et 5 °C avec 100% d'humidité. (Snow, 1949), estime que les conidies de *B. cinerea* ont besoin de niveaux élevés d'humidité relative pour la germination. A 95% d'humidité relative, seulement 80% des conidies de *B. cinerea* germent à 15°C et 5°C. À 90% d'humidité relative, 85% des conidies germent à 20°C, et la germination s'arrête lorsque les conditions d'humidité relative et de température sont plus faibles (Jarvis, 1977). À une température de 21°C et 94% d'humidité relative le mycélium aérien et la sporulation se développent d'une façon très rapide (Thomas et al., 1988). Selon (O'Neill et al., 1997), la phase de sporulation est favorisée par

une forte humidité relative et l'interruption de ces conditions entraîne un retard de sporulation.

#### 6.4. La lumière

La germination des conidies de *B. cinerea* peut se produire en présence ou en absence de lumière, à condition que des quantités adéquates d'eau et de nutriments soient disponibles (Ajouz, 2009). Par contre la sporulation de *B. cinerea* est dépendante de la qualité de lumière reçue et surtout des UV (Elad, 1997b ; Nicot et Baille, 1996). La survie des conidies dans l'air est pareillement influencée par la quantité de la lumière. D'après Rotem et Aust, 1991, les rayons UV influencent considérablement la mortalité des conidies et la longévité des spores. Cependant, certaines études ont rapporté la possibilité de certaines souches de *B. cinerea* à sporuler en obscurité (Dik et Wubben, 2007)

### 7. Importance économique

*B. cinerea* est un pathogène qui peut infecter de nombreux types de plante, y compris les cultures maraîchères et horticoles, causant ainsi d'importantes pertes économiques (Elad et al., 2016). Ce champignon necrotrophe provoque la maladie de la moisissure grise et peut causer des dommages importants au niveau mondiale en pré et post récoltes (Amselem, et al., 2011), en détruisant partiellement ou totalement les plantes et les cultures dans certains cas. Sur le plan économique, ce champignon est considéré comme un problème phytosanitaire majeur dans le domaine de la viticulture dans le monde (Martinez et al., 2005). En se basant sur son intérêt scientifique et économique, ce champignon est classé en deuxième position parmi les dix champignons phytopathogènes les plus importants (Dean et al., 2012). Il y'a un risque permanent d'attaque par ce champignon pathogène sur des cultures comme la tomate, le poivron et la laitue en culture sous abris (Jarvis, 1992). Au niveau des serres chauffées de tomates, l'infection des blessures sur les tiges aboutit à la formation des chancres pouvant endommager la plante entière (Decognet et al., 2010). Les pertes sont estimées à 2 milliards de dollars chaque année (Elmer et Michailides, 2007).

*B. cinerea* peut causer des dommages à toutes les étapes de la protection des cultures, et les coûts associés à l'utilisation de fongicides pour lutter contre cette maladie sont en moyenne de 40euro par hectare dans l'agriculture, pour toutes les cultures et tous les pays confondus. Cependant, l'apparition de souches résistantes à ces fongicides chez les populations de *B.*



*cinerea* pose un véritable problème et entraîne des pertes de rendement considérables (Dean et al., 2012). En effet, le marché mondial des produits de lutte contre ce ravageur est évalué à une fourchette de 15 à 25 million de dollars par an (Elad et al., 2007)

## Chapitre 2 : Stratégies de lutte contre *Botrytis cinerea*

Chaque année, les maladies affectent les plants ont un impact significatif sur la production alimentaire mondiale, provoquant une baisse allant jusqu'à 10 à 20%, cette diminution a des conséquences économiques considérables engendrant une perte de plusieurs milliards de dollars (Ritika et Utpal, 2014). Afin de protéger leurs cultures contre les épidémies et de limiter leur propagation, les producteurs agricoles ont recours à différentes stratégies de contrôle. Ce chapitre se concentrera sur les pratiques culturales, la lutte génétique, la lutte chimique, la lutte biologique et la protection intégrée, qui sont autant de méthodes utilisées pour limiter la pourriture grise provoqué par *B. cinerea*.

### 1. Pratiques culturales

La prophylaxie désigne l'ensemble des mesures visant à limiter l'apparition et le développement d'organismes nuisibles, son objectif principal est de minimiser les risques de propagation des maladies infectieuses (Bouaoud et al., 2018), comme elle peut les supprimer dans les serres (Abro et al., 2013).

#### ➤ L'irrigation

Diverses études ont établi une corrélation entre l'irrigation et le développement de plusieurs maladies chez les cultures. Cependant, l'irrigation par goutte à goutte est une méthode qui a montré une réduction significative de la pourriture grise de plus, cette technique d'irrigation est économique par rapport à d'autres méthodes telles que l'aspersion, ce qui la rend une alternative intéressante pour les agriculteurs (Aissat et al., 2008).

#### ➤ La solarisation

La méthode de solarisation ou de chauffage solaire utilise l'énergie solaire pour augmenter la température du sol. Cette technique permet d'atteindre des niveaux de chaleur suffisamment élevés pour tuer ou affaiblir de nombreux agents pathogènes des plantes, offrant ainsi un contrôle efficace des maladies. En outre, elle possède un spectre d'activité large et diversifié, car elle permet également de contrôler les champignons (Alabouvette et al., 2006).

#### ➤ L'effeuillage

Pour optimiser la circulation d'air et réduire le taux d'humidité dans les serres favorable au développement de *B. cinerea*, il est recommandé de procéder à l'effeuillage qui consiste à

retirer les feuilles en les coupant au ras de la tige sans laisser de partie du pétiole réduit significativement le risque d'infection des plaies (Decognet et al., 2010).

### ➤ Le chauffage et ventilation

Le contrôle des conditions climatiques dans les serres est crucial pour prévenir la présence d'eau libre sur les tissus végétaux et pour renouveler l'air à l'intérieur, ce qui réduit le risque de certaines maladies, telle que la pourriture grise. Pour y parvenir, il est conseillé d'utiliser des films plastiques photo-sélectifs et de vérifier régulièrement leur efficacité afin de limiter l'humidité et éviter le refroidissement excessif la nuit (Aissat et al., 2008).

## 2. Lutte génétique

La lutte génétique est une alternative prometteuse aux fongicides pour prévenir les maladies dans les cultures. Cette approche consiste à créer des variétés de plantes résistantes en introduisant des gènes spécifiques de résistance contre les pathogènes. Par exemple, des gènes de résistance ont été introduits dans des variétés de tomates pour les rendre résistantes aux virus, champignons et bactéries, afin de réduire l'impact de ces pathogènes sur les plantes (Bouaoud et al., 2018).

Il n'y a actuellement aucune variété de culture sous serre qui puisse résister à l'attaque du champignon provoquant la pourriture grise (Dik et Wubben, 2007). Il convient de souligner qu'il peut toutefois exister des différences significatives dans la sensibilité à la pourriture grise entre les cultivars de certaines plantes, comme c'est le cas pour la fraise (Legard et al., 2000), le rosier (Uchneat et al., 1999), ou le concombre (Dik et Wubben, 2007).

La résistance génétique offre l'avantage d'être une méthode efficace contre certaines maladies et ravageurs, tout en ne causant aucun dommage à l'environnement (Ploetz, 2004).

## 3. Lutte chimique

*B. cinerea* est considéré comme un agent pathogène important pour les plantes et est responsable de pertes de rendement significatifs (Yan et al., 2022). Le principal moyen de réduire son impact sur les cultures majeures demeure la lutte chimique, qui consiste à utiliser des fongicides pour éliminer, affaiblir ou réprimer le champignon pathogène (Leroux et al., 2002).

Cette méthode de lutte est un complément aux mesures prophylactiques visant à réduire l'incidence de la maladie en créant des conditions environnementales moins propices à l'infection (Rosslénbroich et Stuebler 2000; Leroux 2007). Les fongicides synthétiques sont catégorisés en cinq groupes selon leur mode d'action biochimique sur le pathogène (Tableau II). Ces fongicides ont un impact sur le fonctionnement des microtubules, la respiration, l'osmorégulation, la biosynthèse des stéroïdes et la biosynthèse de méthionine.

*B. cinerea* présente des particularités biologiques qui rendent la lutte chimique contre ce pathogène très difficile. En effet, ce champignon est très adaptable aux conditions extérieures, possède un fort potentiel destructeur et peut développer une résistance aux fongicides (Blancard et al., 2009). En effet, Grâce à sa variabilité génétique, *B. cinerea* a réussi à s'adapter à de nombreuses familles de fongicides auxquels il a été exposé (Yourman et al., 2001 ; Leroux 2007).

Bien que les fongicides soient considérés comme des outils incontournables pour lutter contre *B. cinerea* avant et après récolte, il est important de prendre en compte le fait que plusieurs familles de fongicides font donc face à des phénomènes de résistance, avec l'apparition de souches multi-résistantes.

Les différents phénomènes des résistances sont un véritable problème dans la lutte contre *B. cinerea*, ce qui confirme l'intérêt actuel porté aux méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon (Ajouz 2009).

**Tableau II:** Différents groupes de fongicides synthétiques anti-*Botrytis* (Leroux et al., 1999 ; Rosslenbroich et Stuebler 2000; Elad et Stewart 2007).

Groupe	Famille chimique	Substance active	Mode d'action
<b>Inhibiteurs de la respiration</b>	Dithiocarbamates Sulfamides	Thirame Dichlofluanide	Les fongicides multi-sites affectant la respiration. Leur action est due à une inhibition de la germination des conidies
		Fluazinam Strobilurines	Blocage du fonctionnement des mitochondries.
<b>Anti microtubules</b>	Benzimidazoles	Bénomyl et Carbendazime	Inhibition de l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne à faibles concentrations
	Phénylcarbamates	Diéthofencarbe	Inhibition de l'assemblage microtubulaire due à la fixation des fongicides sur la tubuline
<b>Fongicides agissant sur l'osmorégulation</b>	Dicarboximides		Inhibition de la germination des conidies et la croissance mycélienne. Ils causent des altérations morphologiques au niveau des tubes germinatifs tels que des gonflements, des ramifications anormales et des éclatements cellulaires.
	Phénylpyrroles	Fludioxonil	
	Hydrocarbures Aromatiques	Dicloran	
<b>Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine</b>	Anilinopyrimidines	Pyriméthanil, Cyprodinil et Mépanipyrim	Inhibent l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne. Inhibition de la biosynthèse de méthionine dans les cellules et/ou d'un blocage dans l'excrétion d'enzymes hydrolytiques impliquées dans le processus de pathogénicité.
<b>Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols</b>	Hydroxyanilides	Fenhexamid	Inhibition de l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne à de faibles concentrations.

## 4. Lutte biologique

D'après les experts de l'organisation international de lutte biologique (l'OILB), la lutte biologique est une stratégie qui utilise des organismes vivants qui empêchent ou réduisent les dommages et les pertes par les parasites et les pathogènes des plantes (Magnin-Robert et al., 2007). Cette technique vise à réduire la densité ou l'activité d'un agent pathogène en introduisant un ou plusieurs organismes autres que l'être humain.

Différents types d'organismes peuvent jouer un rôle d'auxiliaire dans la nature, que ce soit comme antagoniste ou ennemi naturel. Ces organismes peuvent inclure des microorganismes tels que des bactéries, virus ou des champignons, ainsi que des nématodes entomophage, des parasitoïdes et des prédateurs (Dib, 2010).

Les agents de lutte biologique sont une alternative intéressante aux fongicides synthétiques, car non seulement ils sont plus respectueux de l'environnement mais aussi ils peuvent également être utilisé de manière combinée avec des pesticides pour une meilleure efficacité (Fravel, 2005). Le biocontrôle offre également une alternative aux pesticides dont l'emploi excessif de fongicides peut entraîner une résistance accrue des agents phytopathogènes (Vurukonda et al., 2018 ; Rashad et Moussa, 2020).

### 4.1. Mécanisme d'action des agents de biocontrôle

#### 4.1.1. Mécanismes directs

##### ➤ Antibiose

Le mécanisme d'action le plus fréquemment employé dans le biocontrôle. Le terme antibiose implique la production par des microorganismes antagonistes d'un ou plusieurs métabolites bioactifs tels que des antifongiques ou des antibiotiques. Ces métabolites peuvent avoir un effet sur la germination ou la croissance des hyphes, ou encore inhiber les activités métaboliques d'autres microorganismes (Al-Shugairan, 2008).

Gutter et Littauer ont été les premiers à observer le potentiel antagoniste en 1953, lorsqu'ils ont découvert que les *Bacillus subtilis* pouvaient être utilisés dans le contrôle biologique des maladies post-récolte des fruits de citron. Des espèces appartenant eux genres *Pseudomonas* et *Streptomyces*, sont connus pour produire différents composés qui jouent un rôle essentiel dans le biocontrôle des maladies (Nunes, 2012). Parmi les substances antibiotiques produites par *Pseudomonas*, on peut citer l'amphisine, cyanure d'hydrogene, la phenazine, la

pyrolinitrine, l'oomycine, le 2, 4 diacetylphloroglucinol (DAPG), le pyoluteorine et la tensine. La Kanosamine, l'oligomycine, la zwittermycine A et la xanthobaccine sont produits par des espèces du genre *Bacillus*, *Stenotrophomonas* et *Streptomyces* (Compant et al., 2005). Les agents de lutte biologique, tels que *Brevibacillus brevis*, produisent la gramacidine S, un antibiotique qui agit en inhibant la germination des spores de *B. cinerea* (Edwards & Seddon, 2001). La membrane cellulaire des spores peut subir une altération de perméabilité sous l'effet du fengycine produit par *B.subtilis* (Kefi et al., 2015).

### ➤ **Compétition**

Être un bon compétiteur en tant qu'agent de lutte biologique nécessite une croissance rapide, une capacité à utiliser de faibles concentrations de nutriments et une adaptation à l'environnement. De plus, l'agent doit être capable d'utiliser les nutriments plus efficacement que l'agent pathogène afin d'empêcher la germination et l'infection de la plante (Nunes, 2012).

La concurrence pour le fer est un exemple bien documenté de compétition entre un agent de lutte biologique et un agent pathogène. Les champignons sont particulièrement dépendants du fer, qui joue un rôle crucial dans leur croissance et leur virulence (Ahmed et Holmström, 2014). Les agents de lutte biologique ont un avantage certain dans leur concurrence avec les agents pathogènes pour le fer grâce à la production de molécules chélatrices du fer telles que les sidérophores (Palaniyandi et al., 2013).

### ➤ **Parasitisme**

Le parasitisme des agents phytopathogène par d'autres microorganismes a été signalé par divers auteurs comme étant un mode d'action bien établi (Elad et Stewart, 2007). On peut utiliser le terme hyperparasitisme pour désigne le phénomène où des *actinomycètes* produisent des enzymes pour dégrader la paroi cellulaire du champignon hôte, ainsi que pour décrire les autres bactéries qui parasitent les champignons phytopathogène (Köhl et al., 2019).

Parmi les mycoparasites, les champignons *Trichoderma*, *Gliocladium* et *Pythium spp* sont les plus étudiés. *Pythium periplocum* est un exemple d'hyperparasite qui s'attaque à *Botrytis cinerea* (Paul, 1999).

### 4.1.2 Mécanismes indirectes

#### ➤ Stimulation de la défense des plantes

Les Stimulateurs de Défense des Plantes (SDP) sont des substances ou micro-organismes vivants inoffensifs qui, lorsqu'ils sont appliqués sur une plante, sont capables de renforcer considérablement sa résistance face aux stress biotiques, par rapport à une plante non traitée (Tostivint et al., 2014). Les MAMPs (microbe-associated molecular patterns) sont des éliciteurs généraux exogènes qui permettent de reconnaître les bio-agresseurs. lorsque ils interagissent avec la plante, ils déclenchent une réponse de défense non spécifique vis-à-vis de l'espèce pathogène (Garcia-Brugger et al., 2006). Cette réponse peut se manifester par une réaction de résistance directe ou un effet potentialisateur (Faessel et Tostivint, 2014). L'interaction entraîne une cascade d'évènements de signalisation qui conduit à la synthèse de molécules de défense telles que les phytoalexines et les protéines PR, ainsi que des formes actives de l'oxygène. Cette transmission de signal peut finalement aboutir à la mise en place d'une résistance systématique acquise (SAR).

#### ➤ Interférence avec le pouvoir pathogène

Les agents de protection biologique ont la capacité d'entraver les facteurs qui contribuent à la virulence en interférant avec certaines enzymes hydrolytiques, telles que les cutinases et les pectinases, en les inhibant ou en les dégradant. En effet, la diminution de l'activité de ces enzymes est fortement liée à une réduction significative de la virulence (Duffy et al., 2003a).



**Tableau III** : Exemples de biopesticides d'origine microbienne commercialisés dans le monde contre *B. cinerea* (Nicot et al., 2016).

Ingrédient actif	Nom commerciale	Mode d'action
<i>Aureobasidium pullulans</i> strains 14940/14941	Botector	Compétition
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Double Nickel 55WDG/LC	Antibiose
<i>B. subtilis</i> QST 713	Serenade	Antibiose / ISR
<i>B. subtilis</i> GB03	Companion	Antibiose, ISR
<i>B. megaterium</i>	BioArc	Activité enzymatique
<i>Chlonostachys rosea</i>	Endofine	Compétition
<i>Gliocladium catenulatum</i> J1446	Prestop	Compétition, hyperparasitisme
<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10	Bio-save	Compétition
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Mycostop	Compétition
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Mycostop	Compétition
<i>S. lydicus</i> WYCD108	Actinovate	Compétition, Antibiose
<i>Trichoderma atroviride</i> LC52	Sentinel	Compétition
<i>T. harzianum</i> + <i>T. polysporum</i>	Binab TF	Antibiose, ISR
<i>T. harzianum</i>	Supresivit	Compétition
<i>Ulocladium novozealandiae</i>	Botryzen	Compétition

Il est important de rappeler que la lutte biologique présente de nombreux avantages du point de vue environnemental, Social et économique mais qu'elle présente aussi certains inconvénients comme cela est indiqué dans le Tableau IV.

Tableau IV : Principaux avantages et inconvénients de la lutte biologique (Lefort, 2010)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficace</li> <li>• Permet de restreindre ou d'éliminer l'utilisation des pesticides chimiques</li> <li>• Moins toxique que les pesticides chimiques</li> <li>• Utilisable en serre</li> <li>• Permet de diminuer les risques d'apparition de résistances aux produits chimiques</li> <li>• Plus grande spécificité d'action</li> <li>• Amélioration de la qualité de vie et de la santé des travailleurs agricole</li> <li>• Non contamination des produits (pas de résidus chimiques)</li> <li>• Dégradation rapide des biopesticides, diminuant les risques de pollution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effet moins drastique que les pesticides</li> <li>• Efficacité pas toujours constante et relative aux conditions climatiques</li> <li>• Activité restreinte lors d'une grande pression du ravageur</li> <li>• Conditions d'entreposage des produits biologiques (demi-vie et température plus fraîche)</li> <li>• Nécessite d'excellentes connaissances de l'écologie des pathogènes cibles et des agents de contrôles biologiques et de différentes interactions.</li> </ul>

#### ➤ Combinaison des mécanismes d'action

Les agents de lutte biologique peuvent aussi utiliser plusieurs modes d'action (Nicot et al., 2016). Le *Trichoderma*, un agent de lutte biologique très connue, présente diverses actions, notamment la compétition, l'hyperparasitisme, la production de métabolites secondaires et l'induction de la résistance des plantes (Benítez et al., 2004). Par exemple, la souche *Trichoderma harzianum* T39 est efficace pour contrôler plusieurs agents pathogènes tels que *B. cinerea*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Podosphaera xanthi* sur les plants de concombre en serre commerciale. Elle induit la résistance systématique des plantes, inhibe les enzymes produites par *B. cinerea* et produit des enzymes qui dégradent certains polymères dans la paroi fongique, tels que la chitine (Elad, 2000).

## 4.2. La durabilité de la lutte biologique

Plusieurs approches ont été examinées et appliquées pour combattre les divers organismes nuisibles des plantes, incluant l'usage de pesticides en lutte chimique, les pratiques agricoles,

l'emploi de variétés résistantes, ainsi que la lutte biologique. Dans cette section de mémoire, notre attention sera portée sur la pérennité et la durabilité de l'efficacité des agents de lutte biologique utilisés pour prévenir les maladies des plantes.

Une méthode de lutte phytosanitaire est dite durable lorsqu'elle maintient son efficacité sur une variété de cultures à grand échelle pendant une période prolongée, et dans des conditions propices au développement de la maladie (Johnson, 1984).

Bien que la lutte biologique soit reconnue comme étant une méthode alternative efficace pour lutter contre les maladies des plantes (Singh et al., 2003). Une étude a néanmoins rapporté l'existence d'une grande variation dans la sensibilité des phytopathogènes aux agents de lutte biologique (Bardin et al., 2015). Ces études ont mis en évidence que l'efficacité protectrice des agents microbiens peut varier selon la souche de phytopathogène. Cette diversité observée peut contribuer à une réduction d'efficacité des bioprotecteurs dans les champs, car il existe des phénotypes moins sensibles dans les populations naturelles de phytopathogène, et les pressions de sélection appliquées peuvent résulter de ces phénotypes plus sensibles (Bardin et al., 2021).

Pour qu'une culture soit durablement résistante aux bioagresseurs, il est important que les méthodes de lutte appliquées exercent une pression de sélection adéquate sur les populations de parasites. Il est également essentiel que les parasites ne développent pas une adaptation rapide aux méthodes de lutte mises en place dans les cultures (Johnson, 1979).

Il est important de rappeler que certains nuisibles ont déjà développé une résistance aux bioinsecticides utilisés dans le marché (Alyokhin et al., 2008 ; Oyarzún et al., 2008). Par exemple, l'utilisation de biopesticides *Bacillus thuringiensis*, qui est efficace contre certains coléoptères, lépidoptères et diptères, a entraîné de nombreux cas de résistance (Kouassi, 2001). Le premier cas de résistance à *B. thuringiensis* a été observé chez l'insecte *Plodia interpunctella*, l'un des principaux ravageurs des lépidoptères des céréales, après plusieurs générations de traitement (McGaughey, 1985).

Pendant vingt ans, l'utilisation intensive de *B. thuringiensis* pour lutter contre les lépidoptères sur le terrain a démontré une adaptation à cette bactérie (McGaughey et Whalon, 1992 ; Tabashnik, 1994).

Jusqu'à présent, la plupart des cas de résistance aux bioprotecteurs microbiens concernent les insectes ravageurs. Tandis que le contrôle biologique des pathogènes végétaux par les

bactéries, les champignons, les oomycètes, les nématodes et les virus a fait l'objet de nombreuses recherches récentes. Ces recherches ont abouti à la commercialisation de nombreux bioprotecteurs microbiens. Cependant, on en sait encore peu sur la durabilité de leur efficacité, et il n'existe à ce jour aucun cas avéré de résistance sur le terrain. La raison pour laquelle les phytopathogènes n'ont pas encore développé de résistance documentée aux bioprotecteurs microbiens pourrait être due à leur utilisation encore restreinte en agriculture par rapport aux méthodes de protection conventionnelles (Bardin et al., 2015).

L'antibiose présente une forte similarité avec les composés utilisés dans la lutte chimique. Il se révèle extrêmement efficace pour entraver la croissance des organismes nuisibles, mais il peut aussi engendrer des problèmes d'émergence de souches résistantes aux agents bioprotecteurs ce qui constitue une préoccupation majeure (Li et Leifert, 1994), telle que la résistance observée chez certains agents pathogène *Agrobacterium tumefaciens*, en présence de l'antibiotique produit par son antagoniste *A. Radiobacter K84* devient moins sensible à l'action de cet agent de lutte biologique, selon une étude menée par (Stockwell et al., 1996).

La concurrence pour les nutriments est un phénomène fréquent qui control l'interaction entre les populations microbiennes partageant une même niche écologique et ayant des besoins physiologiques similaires, tout en faisant face à des ressources limitées. Malgré sa résistance potentielle à l'érosion de son efficacité, ce mode d'action peut encore être compromis, comme l'ont montré des études. En effet, selon (Mazzola et Cook, 1991), l'infection des racines par *Pythium irregulis*, un agent pathogène responsable de la pourriture des racines du blé, réduit considérablement l'efficacité de l'introduction de *Pseudomonas fluorescens* dans le sol pour le contrôle. En effet, certaines souches pathogènes ont développé la capacité d'exploiter rapidement les ressources nutritives disponibles dans leur environnement, ce qui peut ralentir le développement des agents de biocontrôle microbiens en optimisant l'utilisation des ressources. Par conséquent, cela peut éventuellement compromettre l'efficacité globale du biocontrôle.

Il est possible d'obtenir une stabilité et une efficacité accru dans la lutte contre les phytopathogènes en combinant des mécanismes biologiques complémentaires, ce qui permet d'obtenir des effets additifs et synergiques. Cette approche, qui implique l'utilisation d'agents de lutte biologique ayant différents modes d'action, peut être considérée comme une solution intéressante pour une utilisation plus durable de la lutte biologique (Irtwange, 2006).

La durabilité de la lutte biologique dépend donc du mode d'action utilisé pour contrôler les agents pathogènes. Bien que tous les bioprotecteurs microbiens exercent une pression sélective sur les populations phytopathogènes lorsqu'ils sont appliqués en tant que traitements pour les cultures, certains modes d'action, tels que l'antibiose, semblent favoriser le développement de la résistance plus que d'autres. Il est donc essentiel de mener des recherches futures pour sélectionner le mode d'action le plus efficace et durable, comme souligné par (Bardin et al., 2021).

Selon (McDonald et Linde, 2002), la diversité élevée de la population est un facteur important qui réduit l'efficacité des méthodes de lutte. D'ailleurs, une étude réalisée par (Mazzola et al., 1995), a révélé que parmi 71 souches de *Garumannomyces graminis var. Tritici*, leur sensibilité aux antibiotiques PCA et 2,4-DAPG produits par *Pseudomonas* était variable. Gurusiddaiah et al. (1986) ont analysé la sensibilité de nombreux champignons et oomycètes, en particulier de plusieurs espèces de *Pythium*, à l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) produit par des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*.

### 5. Protection intégrée

La stratégie de protection intégrée des cultures repose sur le principe d'intégration de différents moyens de contrôle des maladies. Cette approche combine l'utilisation de variétés résistantes ou tolérantes, la mise en œuvre de pratiques culturales appropriées, le recours à des agents de lutte biologique et l'application raisonnée de pesticides (Naika et al., 2005).

En combinant différentes méthodes de lutte contre les maladies, cette stratégie garantit une meilleure protection des cultures tout en minimisant les contraintes associées à l'utilisation de chaque méthode individuellement, et a priori une plus grande durabilité (Lepoivre, 2001). Cette nouvelle stratégie de lutte contre les maladies des cultures s'appuie sur deux principes fondamentaux. D'une part, elle repose sur l'intégration de différentes méthodes de lutte, choisies pour leur faible impact environnemental. D'autre part, elle est basée sur une approche personnalisée de la prise de décision, qui permet aux agriculteurs d'évaluer les risques spécifiques à chacune de leurs parcelles et de décider quand et comment intervenir (Perron, 1999).

# **Matériels et Méthodes**

## 1. Revivification et repiquage des souches Fongiques et bactériennes

### 1.1. Souches fongiques

Au cours de cette étude, dix souches de *Botrytis cinerea* ont été utilisées ; à savoir : ALG66, ALG3, ALG75, ALG116, ALG227, ALG230, ALG232, ALG240, ALG243 et NHne1 (Bouaoud, Y., 2018 ; Adjebli, A., 2015). Elles proviennent toute de la collection des souches fongiques du laboratoire Écologie Microbienne de l'université de Bejaia. Ces souches ont été isolées à partir des plantes de tomate dans la région de Bejaia (Algérie), à l'exception de la souche NHne1 isolée en Norvège. Ces souches ont été monosporées et conservées à -4°C sous forme de suspensions de spores dans du tampon phosphate contenant 20% de glycérol. Pour préparer les inoculums, 20 µl de suspension sporale de *B. cinerea* ont été prélevées à l'aide d'une micropipette et déposées dans des boîtes de Petri (90 mm de diamètre) contenant du milieu PDA. L'incubation a été effectuée à 22°C pendant quelques jours pour favoriser le développement de champignon (figure 5)

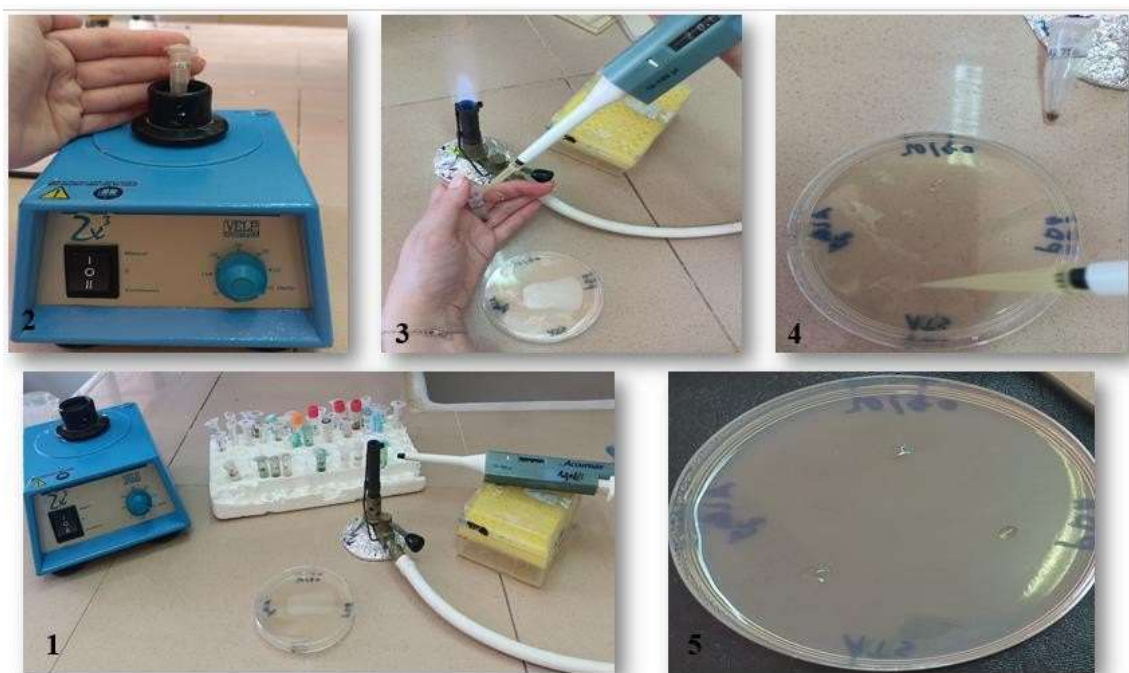


Figure 5 : Revivification et repiquage des souches de *B. cinerea*.

### 1.2. Souches bactériennes

Dans cette étude, deux bactéries appartenant à la famille des *Bacillus* (Souche *Bacillus methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp* LK) ont été utilisées comme agents de lutte biologique potentiel à l'égard des souches de *B. cinerea*. Ces souches ont été isolées en Algérie au cours des travaux de thèse de M<sup>me</sup> Bouaoud Yousra et ont été identifiées sur la base du séquençage



de l'ADNr 16s. A des fins expérimentales, ces souches ont été repiquées à partir des tubes de conservations et cultivés sur milieu de culture gélose nutritive (GN) à 25°C.



**Figure 6 :** Repiquage des deux bactéries *Bacillus methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp* LK.

## 2- Aspect microscopique et macroscopique des souches de *B. cinerea*

Afin de vérifier les caractéristiques morphologiques du champignon de *B. cinerea*, la technique du « scotch test » a été réalisée en appliquant un morceau de ruban adhésif transparent à la surface de la culture fongique. Le matériel fongique ainsi prélevé a été collé à la surface de la lame et a été observé directement au microscope optique (grossissement  $\times 10$  puis  $\times 40$ ) pour observer les caractéristiques microscopiques de *B. cinerea*. L'aspect macroscopique est quant à lui déterminé en observant directement l'aspect du champignon sur boîte de Petri.



**Figure 7 :** Technique du Scotch test pour l'observation microscopique de *B. cinerea*

## 3- Test d'évaluation de l'agressivité des souches de *B. cinerea*

### 3.1. Agressivité sur les feuilles de laitue

Le test d'agressivité des souches fongiques constitue un trait de caractérisation très important pour évaluer les différents niveaux d'agressivité des dix souches de *B. cinerea* utilisées dans cette étude. Ce test s'est effectué sur feuilles de laitue variété commercialisée en s'inspirant



du protocole de L'INRA (Avignon-France). A cet effet, deux feuilles de laitue de taille uniformes ont été déposés sur des boites en plastiques contenant du papier absorbant préalablement humidifiées. Pour chaque souche de *B. cinerea*, un disque mycélien de 5 mm de diamètre a été prélevé à partir d'une culture âgée de 4 jours, et a été placé au centre de chaque feuille de laitue. Les boites en plastique ainsi inoculés ont été incubés à 22°C pendant une durée de 7 jours (figure 8) La notation s'est effectuée en mesurant les diamètres de lésions (en mm) à partir du 3<sup>ème</sup> jusqu'au 7<sup>ème</sup> Jour après incubation.



**Figure 8 :** Test d'agressivité *in vivo* réalisé sur feuilles de laitue.

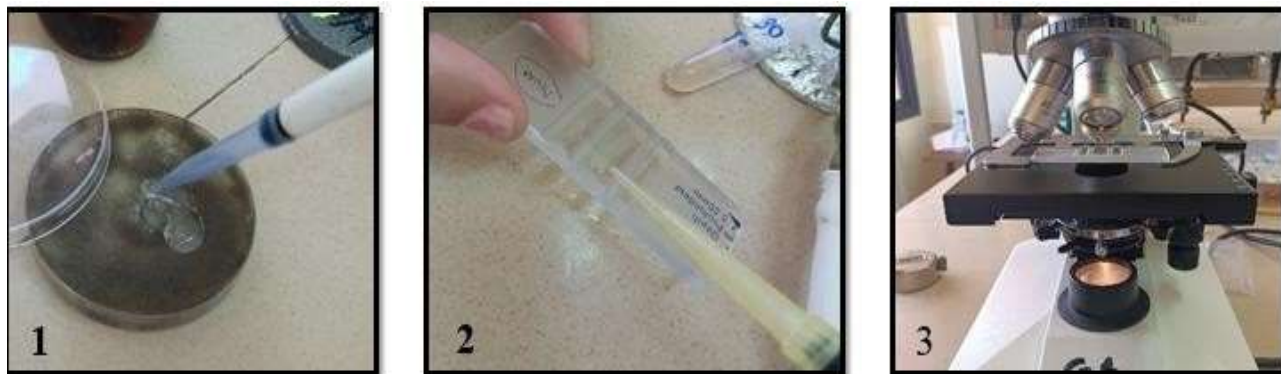
### 3.2. Évaluation de la sporulation des souches de *B. cinerea*

L'évaluation du nombre de spores produits par les souches fongiques été un autre trait qui permet de caractériser les niveaux d'agressivités des souches de *B. cinerea*. Pour déterminer cela, les spores des dix souches de *B. cinerea* sont obtenues *in vitro* en cultivant les champignons sur milieu PDA pendant une durée de 10 jours. Après 10 jours d'incubation à 22°C, les spores sont obtenues en ajoutant 4 ml d'eau distillée stérile dans les boites de Pétri. Ensuite, à l'aide d'un râteau étaleur stérile, les spores sont raclées et prélevés à l'aide d'une micropipette dans un tube Eppendorf. Les suspensions sporales obtenus pour chaque souche de *B. cinerea* sont ensuite agitées avec le vortex. 17 µl de suspensions sporales sont ensuite prélevées et déposées sur la cellule de Malassez pour effectuer le comptage des spores en utilisant le microscope optique (grossissement  $\times 10$ ). Le comptage consiste à quantifier toutes les spores incluses dans le quadrillage de la cellule de Malassez. La concentration totale des spores est obtenue en suivant cette formule :  $C = (N/n) \times 10$ .

C : Concentration de la suspension de spores (spores/ml)

N : nombre totale de spores comptées

n : nombre de rectangles dénombrés



**Figure 9 :** Évaluation de la sporulation des souches de *B. cinerea in vitro*

### 5. Évaluation de la diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* vis-à-vis des agents de lutte biologique *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet des agents de lutte biologique potentiels (T29 et LK) sur les dix souches de *B. cinerea*, différents tests *in vitro* ont été entrepris et cela dans le but d'étudier la diversité de sensibilité des différentes souches fongiques à l'égard des deux bactéries testées. Cet effet a été étudié à différents stades de développement du champignon à savoir : la croissance mycélienne, la germination des spores et la production de spores.

#### 4.1. Évaluation de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*

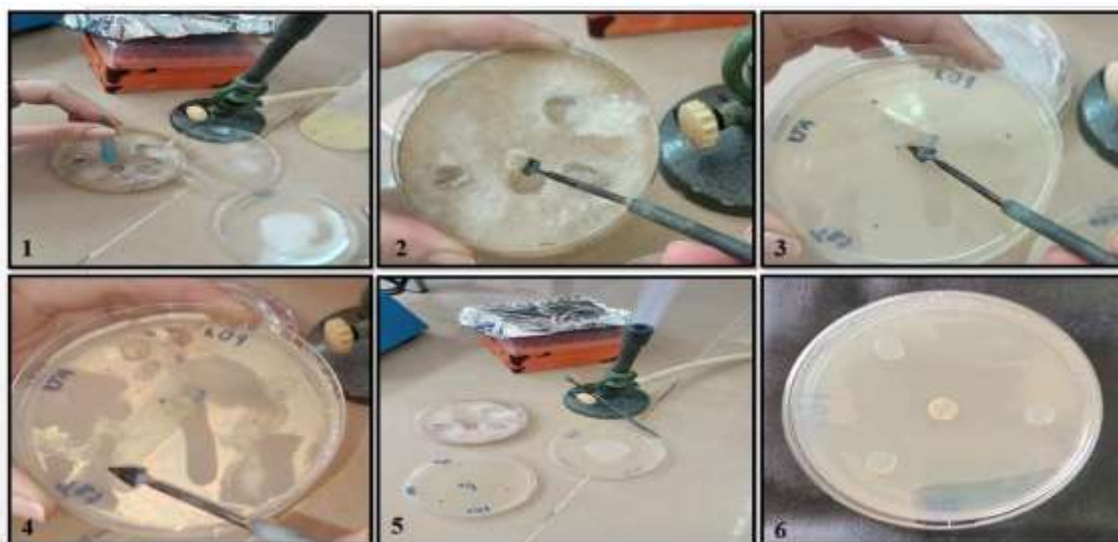
##### 4.1.1 Confrontation directe

L'activité antagoniste des deux isolats bactériens LK et T29 sur le développement mycélien des dix souches de *B. cinerea* a été évaluée *in vitro* en se basant sur le protocole décrit par (Petatán-Sagahón et al., 2011). Dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture PDA, un disque mycélien de 5 mm de diamètre et âgé de 4 jours a été prélevé et disposé au centre de la boîte de Pétri. Trois implants bactériens de même diamètre ont également été prélevés et ont ensuite été placés à une distance de 2,5 cm de l'implant fongique. Des témoins, ne contenant que des souches de *Botrytis cinerea*, ont été également réalisés dans les mêmes conditions. Une boîte a été réalisée par souche fongique à raison de trois répétitions par boîte. Les boîtes ont été mises en incubation à une température de 22°C pendant une période de 3 à 4 jours. Après incubation, les rayons de croissance mycélienne ont été mesurés et les

pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne (PGI%) ont été ensuite calculés en appliquant la formule suivante :

$$\text{PGI}\% = (\text{R}_1 - \text{R}_2) / \text{R}_1 \times 100$$

Avec, R1 : correspond aux rayons du mycélium de *B. cinerea* dans la boîte témoin et R2 : qui correspond aux rayons de croissance mycélienne en présence des bactéries.



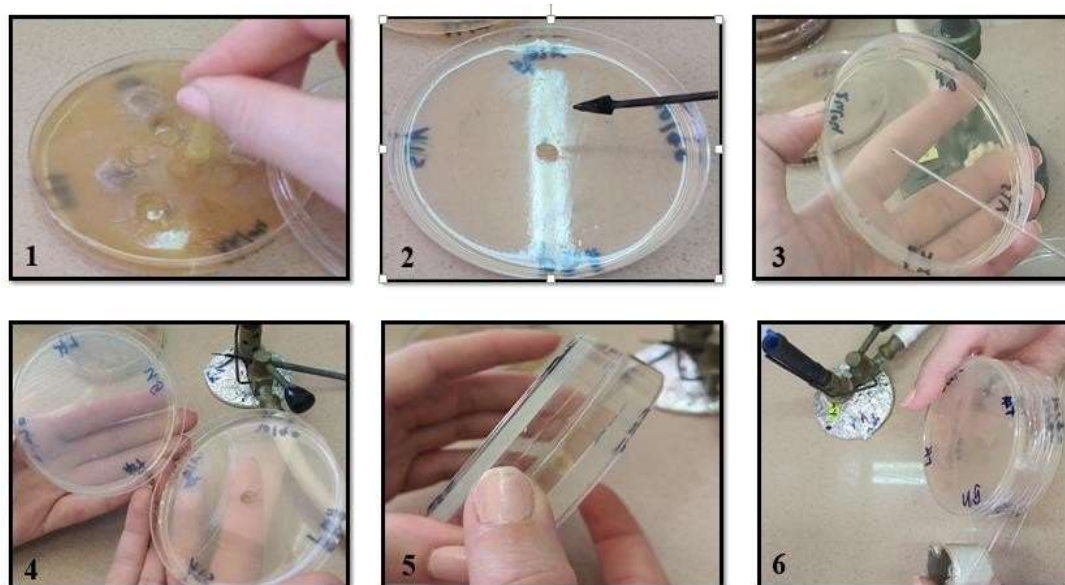
**Figure 10 :** Test d'antagonisme *in vitro* par confrontation directe.

### 4.1.2. Confrontation indirecte (effet des substances volatiles)

L'activité antagoniste des agents de lutte biologique sur les souches de *B. cinerea* a également été évaluée *in vitro* par confrontation indirecte. En effet, l'effet des substances volatiles produites par les deux bactéries (T29 et LK) sur l'inhibition de la croissance mycélienne des dix souches de *B. cinerea* a été étudié en suivant le protocole décrit par Jamalizadeh et al., (2008). Un disque mycélien a donc été déposé au centre de la boîte de Petri contenant le milieu PDA, et les bactéries ont été ensemencées sur d'autres boîtes de Petri contenant le même milieu. Les boîtes ainsi inoculées ont été scellées avec une double couche de parafilm. Un témoin sans bactérie antagoniste a également été réalisé pour chaque souche de *B. cinerea*. Les boîtes ont été incubées 3 à 4 jours à 22°C. La croissance mycélienne a été suivie et comparée avec le témoin sans bactérie. La notation a été faite en mesurant les diamètres de la croissance mycélienne le calcul des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (PGIv%) a été ensuite réalisé selon la formule suivante :

$$\text{PGIv}\% = (\text{D}_1 - \text{D}_2) / \text{D}_1 \times 100$$

D1 : Diamètre de croissance mycélien de *B. cinerea* dans la boîte témoin, (D2) : Diamètre de croissance mycélien de *B. cinerea* en présence des bactéries.



**Figure 11 :** Test d'antagonisme *in vitro* par confrontation indirect (effet des substances volatiles)

### 4.2. Évaluation de l'effet des bactéries sur la germination des spores des souches de *B. cinerea*

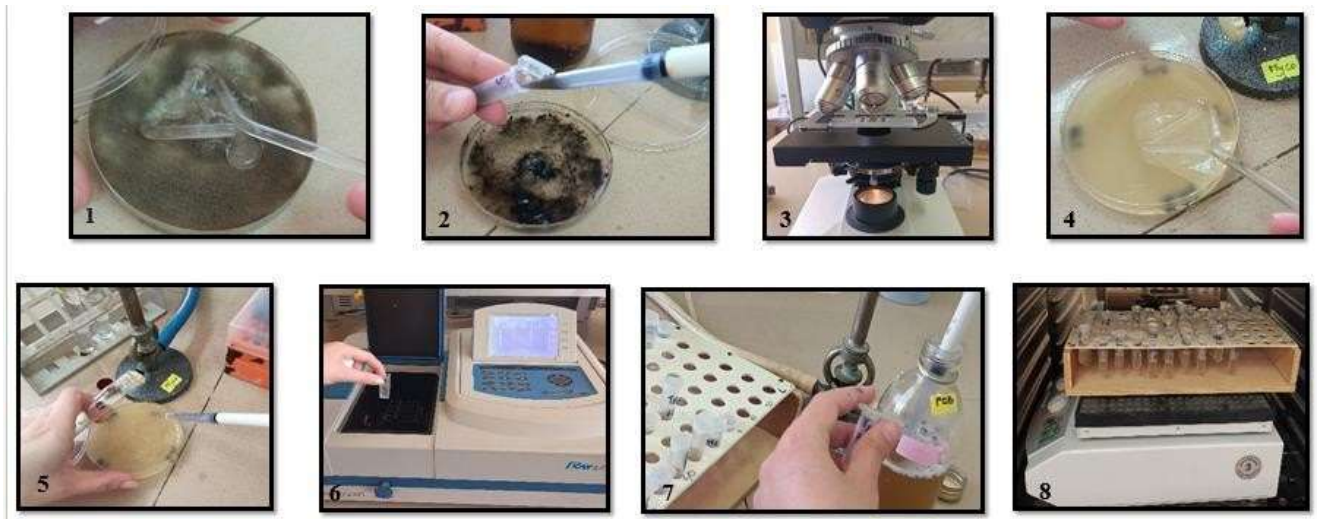
L'objectif de cette expérimentation est de tester l'effet des souches bactériennes LK et T29 sur la germination des spores des différentes souches de *B. cinerea* en utilisant le protocole de Sadfi-Zouaoui et al., (2008). Des tubes stériles de type Eppendorf sont remplis avec 800  $\mu$ l de milieu de culture PDB, auxquels ont été ajoutés 100  $\mu$ l d'une suspension de spores de dix souches de *B. cinerea* ajustées à la concentration de  $10^6$  spores/ml (en utilisant la cellule de Malassez) et 100  $\mu$ l des suspensions bactériennes ajustées à  $10^8$  UFC/ml. Le témoin a été réalisé en remplaçant la suspension bactérienne avec de l'eau distillée stérile. Les tubes ont été incubés sous agitation à 22°C pendant une durée de 24 heures.

Après 24 h d'incubation, 17  $\mu$ l de suspensions sporales ont été prélevés et observés avec la cellule Malassez en utilisant le microscope optique ( $\times 10$ ). Les taux de germinations pour chaque souche de *B. cinerea* (en présence et absence des bactéries) ont été calculés comme suit :

$$\text{Taux de germination \%} = (\text{spores germées/spores totales}) \times 100$$



Le pourcentage d'inhibition de la germination (%) a également été déterminé selon cette formule :  $PI_{\text{germination}} \% = (\text{spores germées} - \text{spores non germés}) / \text{spores germées} \times 100$

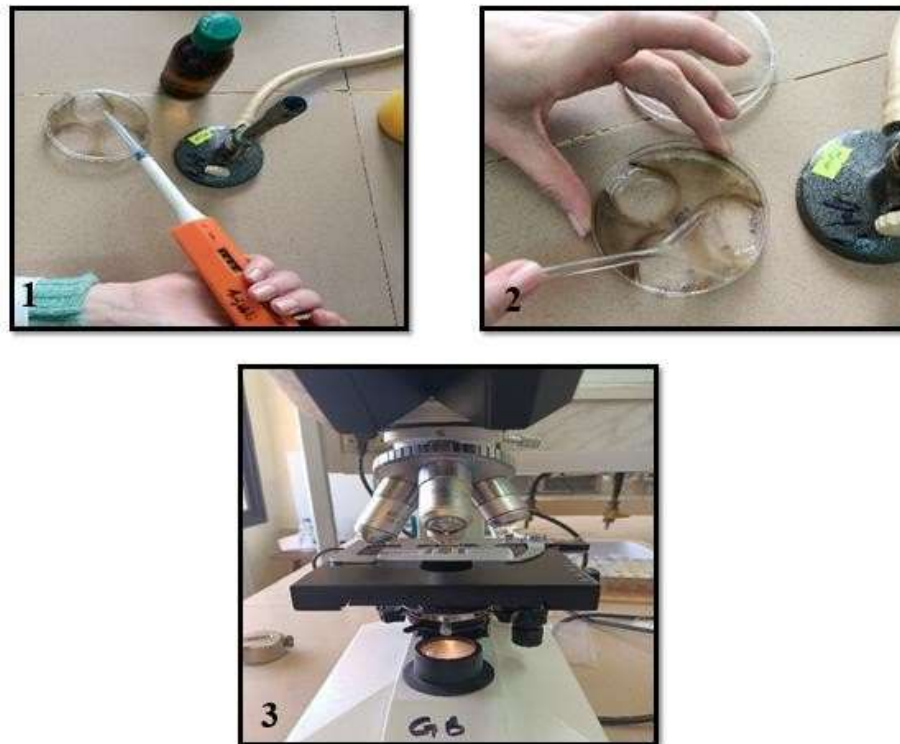


**Figure 12 :** Évaluation de l'effet des agents de lutte biologique sur la germination des différentes souches de *B. cinerea*.

### 4.3. Évaluation de l'effet des bactéries sur la production des spores des souches de *B. cinerea*

Ce test a été réalisé en prolongeant l'incubation jusqu' à 10 jours des boîtes de Petri utilisées dans le test précédent (confrontation effet direct). Après avoir découpé toute la partie contenant les implants bactériens à l'aide d'une flèche lancéolée stérile. Deux millilitres d'eau distillée stérile ont été ajoutés dans chaque boîte à l'aide d'une micropipette, et les spores ont été raclées avec un râtelier stérile afin de détacher les spores. Les suspensions ont été transférées dans des tubes Eppendorf et après agitation, 17  $\mu$ l de suspension sporales ont été déposés sur la lame Malassez pour chaque souche de *B. cinerea* (en présence et en absence des bactéries antagonistes T29 et LK), et le nombre de spores a pu être déterminé en observant la cellule sous microscope optique à grossissement ( $\times 10$ ). L'indice de sporulation a été ensuite calculé selon la formule suivante :  $Isp\% = (\text{Sp}_{\text{témoin}} - \text{Sp}_{\text{traitement}}) / \text{Sp}_{\text{témoin}} \times 100$ .

Avec  $Sp_{\text{témoin}}$ , le nombre de spores produites par *B. cinerea* en absence de bactéries et  $Sp_{\text{traitement}}$ , le nombre de spores produites par *B. cinerea* en présence de bactéries.



**Figure 13 :** Évaluation de l'effet des agents de lutte biologique sur la sporulation des différentes souches de *B. cinerea*.

### 5. Évaluation de la diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* vis-à-vis des agents de lutte biologique *in vivo*

Le test de diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea vis-à-vis* des deux bactéries T29 et LK a été réalisé sur feuilles de laitue. Les suspensions bactériennes ont été préparées en ajoutant 4 ml d'eau distillée stérile dans des boîtes de Pétri dans lesquelles ont été repiqués des bactéries âgées de 48h. Après avoir raclé les bactéries, les suspensions obtenues ont été transverses dans des tubes Eppendorf et leur concentration a été ajustée à  $10^8$  UFC/ml.

Soixante feuilles de laitues uniformes sont disposées dans 30 boîtes en plastique transparente contenant du papier absorbant humidifié à raison de 2 feuilles par boîte. Trois boîtes sont réalisées pour chaque souche fongique (deux boîtes en plastiques contenant des feuilles de laitue traitée avec les bactéries et une boîte témoin n'ayant subi aucun traitement).

Les bactéries sont ensuite pulvérisées sur les feuilles de laitue à l'aide de pulvérisateur. Une fois les feuilles séchées, des disques fongiques de 5 mm de diamètre préalablement formés à partir des cultures de *B. cinerea* âgées de 4 jours sont déposés au centre de chaque feuille de

laitue. L'ensemble des boîtes est incubé à 22° pendant 7 jours. La notation est effectuée à partir du 3<sup>ème</sup> jour jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour en mesurant les diamètres de lésion (mm).



**Figure 14 :** Test de diversité de sensibilité *in vivo* « sur feuilles de laitue ».

- **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 8). Des analyses Anova à un facteur et d'autres avec deux facteurs ont été réalisées pour tester l'effet de chacune des bactéries (T29 et LK) sur le développement des souches de *B. cinerea* *in vitro* (rayons mycéliens en mm) et *in vivo* (diamètres de lésions mm) des 10 souches de *B. cinerea*. Dans le cas où des différences significatives sont détectées, le test de comparaison multiple des moyennes de Tukey est réalisé.

# **Résultats et discussions**



### 1. Caractéristiques morphologiques des souches de *B. cinerea*

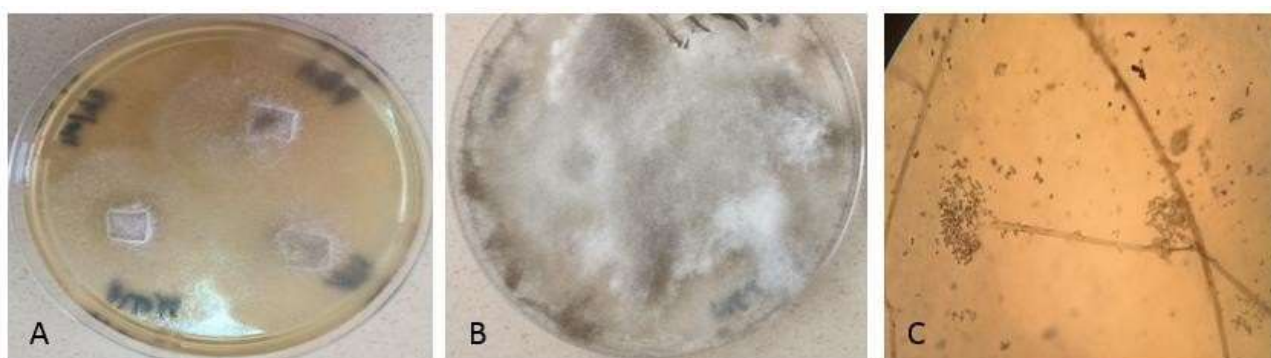
Les isolats de *B. cinerea* sont caractérisés morphologiquement en les cultivant sur milieu PDA à une température de 22°C à l'obscurité. Après une période d'incubation de 21 jours, l'observation macroscopique est effectuée en se basant sur des critères tels que l'apparence du mycélium, la sporulation et la production de sclérotés.

Le mycélium produit est aérien, et les colonies initialement blanches ou blanc grisâtre deviennent progressivement grises claires à foncées à la fin de la période d'incubation.

A partir du 10<sup>ème</sup> jour, la sporulation commence à se produire à la surface du mycélium. Les spores sont générées soit sur l'ensemble de la surface de la boîte de Pétri, soit sur sa partie marginale, ou encore en touffes.

Les sclérotés peuvent varier en abondance, en taille et en répartition. Au début de leur formation, ils ont une couleur blanchâtre qui est évaluée ensuite vers un durcissement puis un noircissement. Les sclérotés peuvent être abondants chez certains isolats (ALG66, ALG227, ALG240, NHne1), tandis qu'ils peuvent être rares ou absents chez d'autres souches. Ils peuvent être soit superficiels, soit profondément enracinés dans la gélose.

D'après les recherches menées par (Martinez et al., 2003), les souches de *B. cinerea* testées ont été classées visuellement en huit morphotypes distincts. Les deux principaux types morphologiques identifiés étaient un type Mycélien et un type Sclérotien. Le premier type se caractérise par l'absence de sclérotés, tandis que le second se caractérise par une production plus au moins importante de sclérotés.



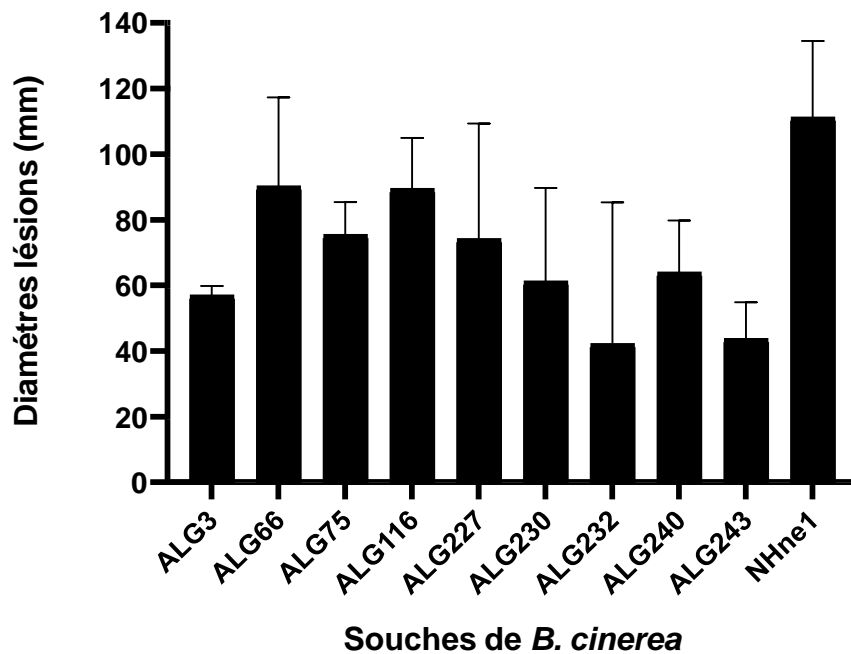
**Figure 15 :** Aspect macroscopique de *B. cinerea* (A et B) et l'aspect microscopique (C).

## 2- Test d'évaluation de l'agressivité des souches de *B. cinerea*

### 2.1. Agressivité *in vivo*

L'agressivité des souches de *B. cinerea* sur feuilles de laitue est évaluée en mesurant les diamètres des lésions (en mm).

D'après les résultats obtenus dans cette étude, on constate que toutes les souches de *B. cinerea* sont capables d'infecter les feuilles de laitue (figure 16), et il est important de noter que les souches testées ont eu des effets différents sur ces feuilles de laitue. L'analyse statistique d'Anova à un facteur a révélé un effet souches *B. cinerea* significatif ( $P < 0.05$ ).



**Figure 16 :** Agressivité des dix souches de *B. cinerea* sur feuilles de laitue. Chaque valeur représente la moyenne des quatre répétitions +/- l'erreur standard associée à chaque moyenne.

- P value => 0,0200



**Figure 17 :** Photos des lésions provoquées par les différentes souches de *B. cinerea* sur les feuilles de laitue

Les souches ALG66, ALG75, ALG116, ALG227, ALG240, NHne1 semblent avoir un comportement plus agressif avec des valeurs moyennes allant de 64+/-15,73 à 111,25+/-23,23 mm de diamètre. En revanche, les souches ALG3, ALG230, ALG232, ALG243 se sont montrés les moins agressifs avec des valeurs moyennes variant entre (42,25+/-43,11 et 63,75+/-30,92 mm de diamètre).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Mirzaei et al., (2009) qui ont observé une variation significative de l'agressivité de 44 isolats de *B. cinerea* sur les feuilles de vigne, provenant de différentes régions géographiques d'Iran.

Dans une autre étude menée par Miller et al., (1998), des niveaux d'agressivité très variables ont été observés parmi 22 isolats de *Phytophthora infestans* sur les folioles de pomme de terre détachées. Les résultats ont démontré que les isolats les plus agressifs présentaient des valeurs élevées d'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve), une taille de lésions importante, une sporulation élevée et un temps de latence court.

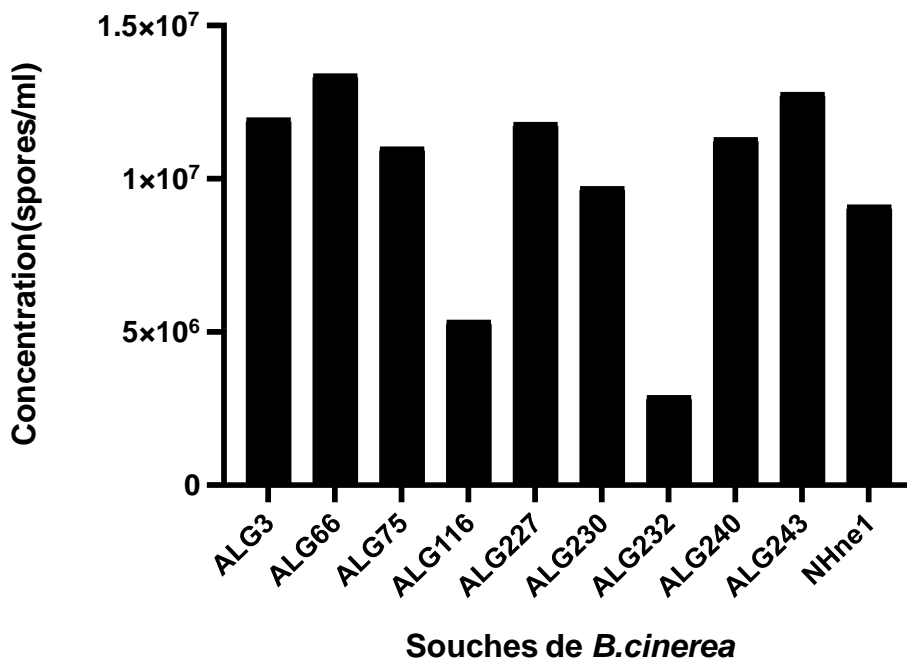
Elad, (1997) rapport qu'une fois l'inoculum de *B. cinerea* entre en contact avec l'hôte et commence à être actif dans la phyllosphère d'un tissu hôte sensible, une série d'événements se produisent. Ces événements peuvent évoluer vers un processus qui conduit à la nécrose de l'hôte, ou peuvent se terminer par une infection arrêtée avec des dommages minimes au tissu de l'hôte. Une sensibilité accrue au pathogène est associée à des facteurs qui favorisent le vieillissement des tissus de l'hôte, tels que les hormones végétales éthylène et acide abscissique et l'élévation des niveaux de radicaux libres dans le tissu de l'hôte.

Des essais phytotoxiques, réalisés à la fois *in vitro* et *in vivo* sur des feuilles de *Phaseolus vulgaris*, avec des métabolites excrétés par le champignon *B. cinerea* sont évalués. L'application exogène de la phytotoxine botrydial a produit une chlorose sévère et un effondrement des cellules et a facilité la pénétration et la colonisation des tissus végétaux par le champignon. Les résultats montrent également un mécanisme d'action de la phytotoxine dépendant de la lumière et semblent indiquer que le botrydial est une toxine non spécifique de l'hôte impliquée dans l'infection fongique de *B. cinerea* (Colmenares et al, 2002).

### 2.2. Évaluation de la sporulation des souches de *B. cinerea*

L'agressivité des dix souches de *B. cinerea* utilisé dans cette étude a été évaluée en mesurant leur sporulation *in vitro* sur boîte de Pétri. Les résultats des concentrations de spores en ml sont indiqués dans la (figure 18). Les résultats montrent que les souches de *B. cinerea* ont toutes étaient capables de produire des spores sur boîte de Pétri après 10 jours d'incubation mais avec des niveaux de sporulation différents allant de  $2,92 \times 10^6$  à  $1,39 \times 10^7$  spores/ml. A noter que les souches ayant une faible concentration sporale sont les deux souches ALG232 et ALG116 qui ont une concentration  $\leq 5 \times 10^6$ , à souligner également que la souche avec le plus faible taux de sporulation ALG 232 est aussi la moins agressive sur feuilles de laitue (Figure 17).

Les souches présentant une agressivité moyenne sont ALG230 et NHne1 avec une concentration  $< 1 \times 10^7$ , et finalement les souches les plus sporulantes ( $\geq 1 \times 10^7$ ) sont ALG66, ALG243, ALG3, ALG227, ALG240 et ALG75.



**Figure 18 :** Sporulation *in vitro* des dix souches de *B. cinerea*

Cette différence de sporulation indique probablement des niveaux d'agressivité différents des souches de *B. cinerea* testées dans cette étude. Par ailleurs, selon les données bibliographiques les souches qui ont tendance à présenter des taux de sporulation élevés sont plus susceptibles d'être les plus agressives (Bouaoud et al., 2018), De ce fait, la sporulation de *B. cinerea* est une caractéristique clé permettant de différencier l'agressivité des différentes souches.

Les résultats d'une étude montrent qu'il existe une certaine corrélation entre les potentiels d'infections et de sporulation des diverses souches de *B. cinerea* (Mouria et al., 2013)



**Figure 19 :** Photos de *B. cinerea* présentant des niveaux différents de sporulation (A : sporulation faible ; B : sporulation moyenne et C : forte sporulation)

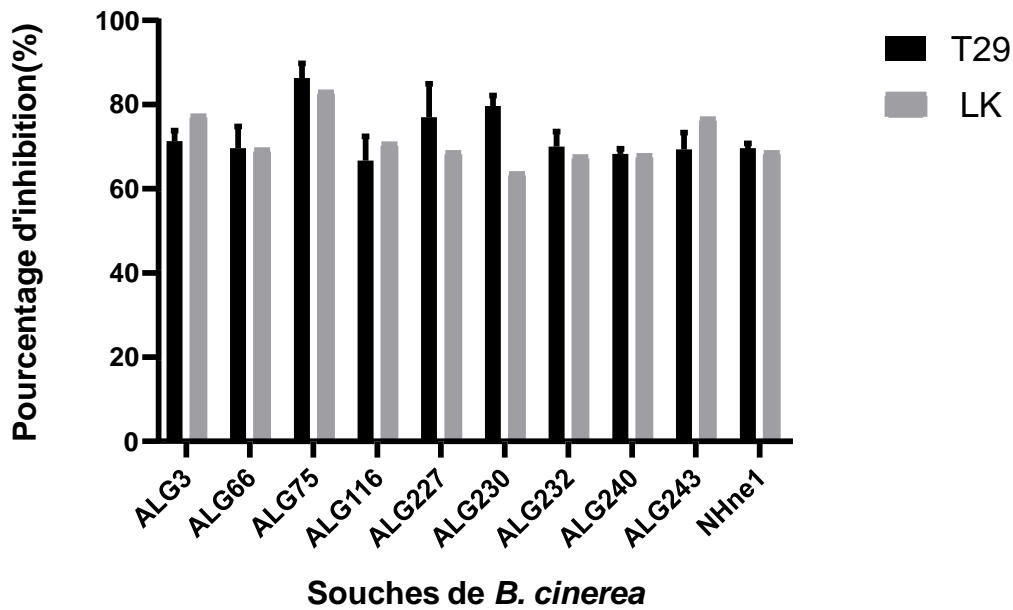
### 3. Évaluation de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*

#### 3-1. Confrontation directe

La diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* vis-à-vis des deux agents de lutte biologique *Bacillus methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp LK* a été testé *in vitro* sur boîte de Pétri par confrontation directe avec les dix souches de *B. cinerea* et les résultats sont présentés dans la (Figure 20).

D'après les résultats obtenus, on constate que les deux agents de lutte biologique (*methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp LK*) ont significativement inhibées la croissance mycélienne des 10 souches de *B. cinerea* (Test Anova ;  $P < 0,0001$ ). La différence significative entre la croissance mycélienne de *B. cinerea* en présence de traitement (avec bactéries) et la croissance mycélienne du témoin (sans bactéries) montre donc un effet significatif des bactéries sur les différentes souches de *B. cinerea* testés.

Les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne (PGI%) sont élevées et sont supérieures à 60 % pour toutes les souches de *B. cinerea* testées, et varient de 64 +/-1,46 à 86,33+/-3,64% ce qui démontre une certaine diversité de sensibilité de ces souches de *Botrytis* vis-à-vis des agents de lutte biologique testées (Test Anova sur l'effet souches de *B. cinerea* significatif ;  $P < 0,0001$ ).



**Figure 20 :** Pourcentage d’inhibition de la croissance mycélienne des dix souches de *B. cinerea* en présence des deux souches bactériennes. Chaque valeur représente la moyenne des trois répétitions +/- l’erreur standard associée à chaque moyenne.

Ces résultats sont en parfaite adéquation avec ceux obtenus par Wang et al., (2009), qui ont présenté une étude montrant que certaines bactéries sont efficaces *in vitro* contre le *B. cinerea*. En effet, L’isolat EB-28, qui a été identifié comme étant un *Bacillus subtilis*, a montré la meilleure activité antagoniste contre la souche fongique avec un taux d’inhibition de 70,05%.

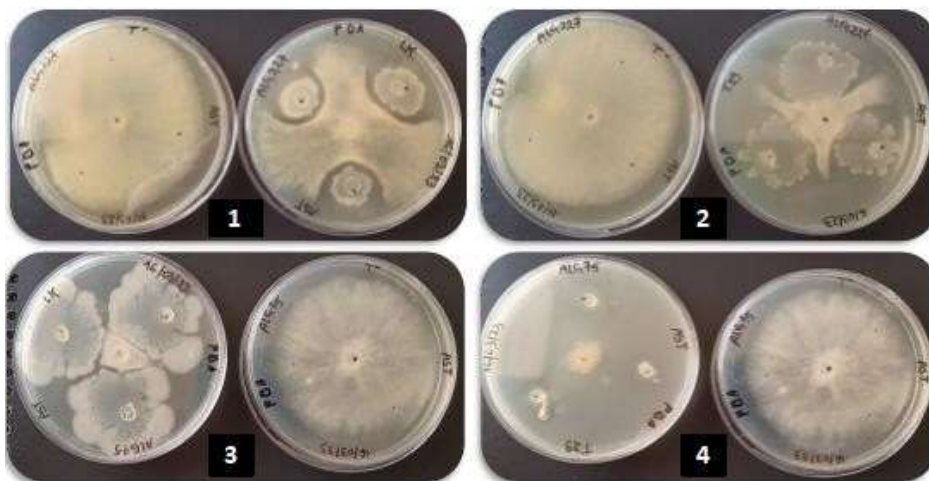
Aussi, les études de Kim et al., (2008) ont indiqué que l’antagonisme généralement observé chez les *Bacillus* se manifeste par l’antibiose, un mécanisme d’action très observé chez de nombreux agents de lutte biologique et qui a également été mis en évidence dans notre étude.



Le genre *Bacillus* est connu pour produire diverses molécules de types antibiotiques ou autres tels que la Bacillomycine, la Fongycine, la Mycosubtiline et la Zwittermycine. Ces substances ont prouvé leur efficacité pour éliminer la croissance des pathogènes cibles à la fois *in vitro* et *in situ*. Cette constatation montre que les substances avec effet inhibiteurs sont responsables de la formation des zones d'inhibition observées à l'égard des souches fongiques phytopathogènes.

Dans leur étude Ajouz et al., (2011), ont également observé une diminution de la sensibilité à la pyrrolithrine, un antibiotique produit par *Pseudomonas chlororaphis*, chez un sous ensemble de 204 isolats de *B. cinerea*.

Cette diversité de niveau de sensibilité aux bioprotecteurs microbien au sien des populations de phytopathogène peut réduire leur efficacité de ces derniers sur le terrain. En raison de l'existence de souches moins sensible dans les populations naturelles d'agent phytopathogène, et il est possible que l'efficacité des bioprotecteurs se trouve réduite (Bouaoud et al., 2018b).



**Figure 21** : Différents niveaux d'inhibitions de la croissance mycélienne « effet direct » des souches de *B. cinerea* par les agents de lutte biologique.

### 3-2. Confrontation indirecte

Les résultats du test de confrontation à distance sur la croissance mycélienne de dix souches de *B. cinerea* testées par les deux agents de lutte biologique sont représentés par la (figure 22).

La bactérie *Bacillus methylotrophicus* T29 à un effet inhibiteur important sur les 3 souches ALG66, ALG232, ALG243 avec des PGIv% allant de 44 à 63,5 %, tandis que la bactérie

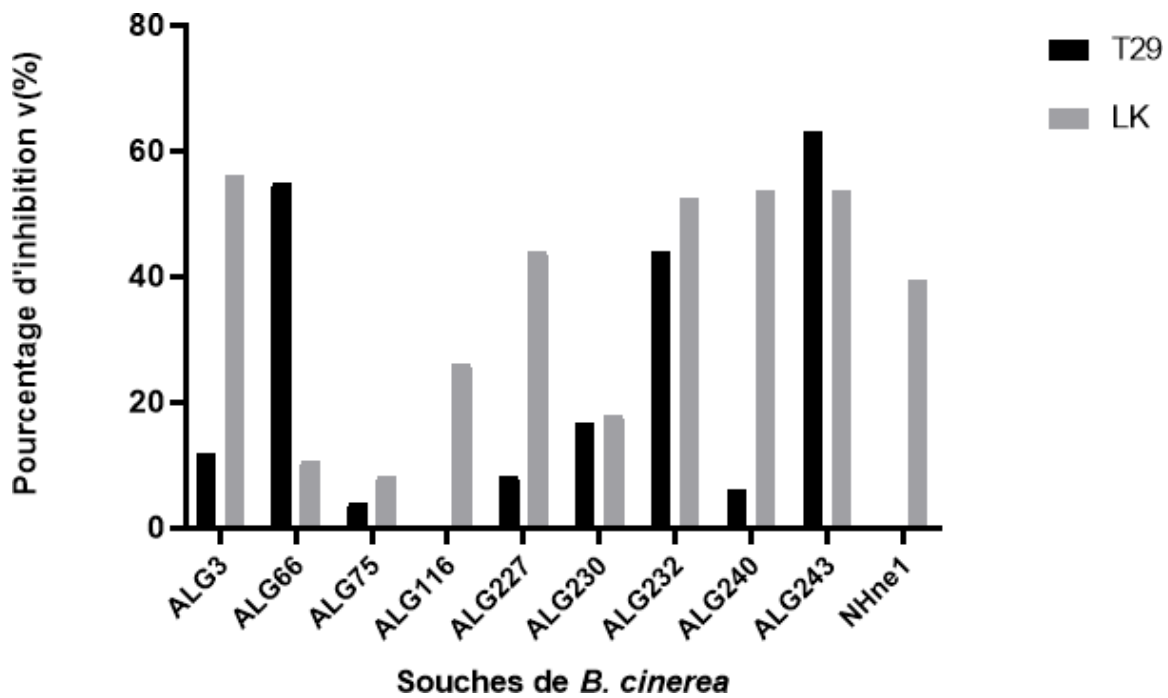


*Bacillus sp* a un effet plus important vis-à-vis des 5 souches ALG3, ALG227, ALG232, ALG240, ALG243 avec des PGIv% allant de 44 à 56 %. Cette activité est due à la production des substances volatiles qui ont pour effet d'inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes.

Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par (Liu et al., 2008 ) qui ont étudié l'effet des composés volatils de quatre souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus spp* sur certains champignons phytopathogènes, dont *Botrytis cinerea*. Les composés volatils produits par ces quatre souches de *Bacillus* ont inhibé à 60% la croissance mycélienne de *B. cinerea*.

Une autre souche de *Bacillus subtilis* a été démontrée comme étant très efficace contre un large éventail de champignons phytopathogènes, y compris *Botrytis*, grâce à la production de substances volatiles antifongiques très puissantes (Fiddaman et Rossall, 1994). D'ailleurs, un grand nombre de bactéries produisent des substances volatiles qui ont un rôle crucial dans le biocontrôle (Fiddaman et Rossall 1993 ; Kai et al. 2009). Des études ont démontré que certains composés volatiles tels que des alcools, des aldéhydes, des cétones, des éthers, des esters, des terpènes, et des dérivés terpéniques peuvent avoir une influence sur la croissance des champignons phytopathogènes (Alstrom, 2001 ; Wheatley, 2002 ; Schalchli et al. 2011).

Par ailleurs, la différence entre l'efficacité des deux agents de lutte biologique vis-à-vis des dix souches de *B. cinerea* peut être due à la différence de production des substances volatiles. Les deux bactéries pourraient donc produire des substances de nature différentes et à des quantités différentes.



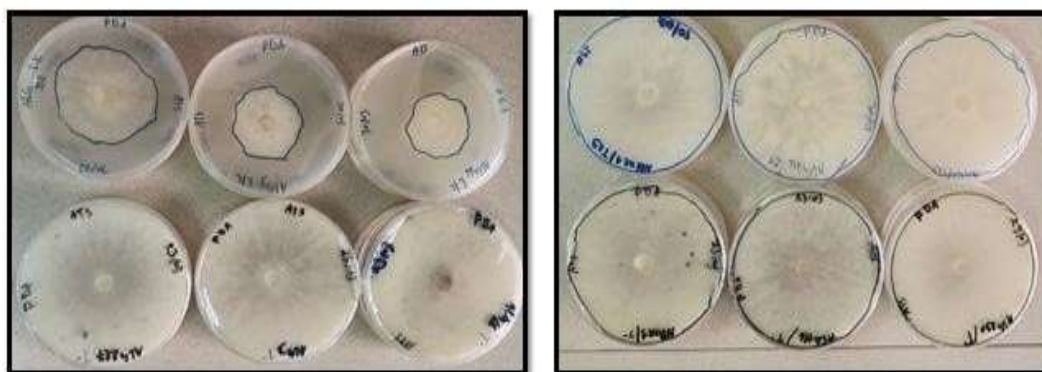
**Figure 22 :** Pourcentage d’inhibition des substances volatiles sur la croissance mycélienne du champignon phytopathogènes *B. cinerea* par les deux bactéries testées.

D’autre part, cette expérimentation a également montré des niveaux d’inhibitions de la croissance mycélienne variable en fonction des souches de *B. cinerea*. Des niveaux plus faibles de croissance mycélienne ont été obtenus pour les souches ALG3, ALG75, ALG227, ALG230, ALG240 (4% de PGIv %) vis-à-vis de la bactérie T29. La bactérie *Bacillus methylotrophicus* T29 ne présente aucun effet contre les deux souches ALG116, NHne1. La bactérie LK quand elle, a eu un effet plus faible à l’égard des souches ALG66, ALG75 et ALG 230 (avec un PGIv% de 8,5%).

Cette étude montre une certaine diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* vis-à-vis des deux bactéries testées, ce qui signifie que les différentes souches fongiques peuvent agir différemment au traitement à base de bactéries ce qui pourrait impacter l’efficacité de la lutte biologique à long terme et donc sa durabilité.

Par ailleurs, des études *in vitro* utilisant des tests de confrontation sur PDA ont indiqué que trois souches de *Streptomyces spp* inhibaient la croissance de 41 souches de *B. cinerea* avec une diversité de sensibilité de l’agent phytopathogène aux composés volatiles produits par l’agent de biocontrôle. La détection d’isolats moins sensibles à ces composés peut indiquer un

risque de développement résistance en cas de pression de sélection accrue exercé par les agents de biocontrôle en question. (Boukaew et al, 2017).



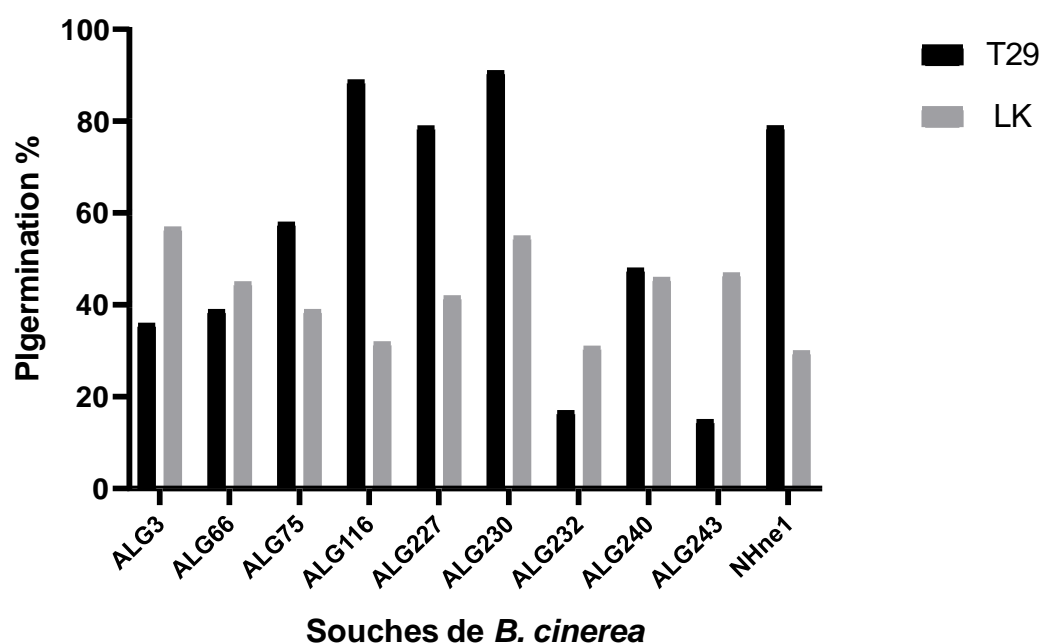
**Figure 23 :** Différents niveaux d'inhibitions de la croissance mycélienne « effet indirect » des souches de *B. cinerea* par les agents de lutte biologiques.( les boîtes en haut en présence des agents de lutte biologiques ,les boîtes en bas sont des témoins).

#### 4- Évaluation de l'effet des bactéries sur la germination des spores des souches de *B. cinerea*

Le pouvoir inhibiteur de la germination des spores de *B. cinerea* des deux agents de lutte biologiques potentiel (T29 et LK) a été testé à l'égard des dix souches du champignon. Il en ressort que l'effet est variable en fonction des souches de *B. cinerea* et aussi en fonction des bactéries antagonistes.

En effet, pour la souche bactérienne T29, les meilleurs effets ont été obtenue avec les souches fongiques ALG75, ALG227, ALG230, ALG240 et NHne1 avec des pourcentages d'inhibition de la germination des spores allant de 48 à 91% pour la souche dont la germination est la plus inhibée. Pour le traitement avec la souche LK, un effet important a été enregistré à l'égard des souches ALG3, ALG66, ALG227, ALG230, ALG240, ALG243 avec des pourcentages d'inhibition de 42 à 57%. Les souches de *B. cinerea* pour lesquelles il y'a eule moins d'effet sont ALG232 et ALG243 traitées avec la bactérie T29, le pourcentage d'inhibition de la germination des spores n'excédant pas le 17%. En présence de la bactérie LK l'effet le moins marqué était observé à l'égard des souches ALG232, NHne1 avec des pourcentages d'inhibition ne dépassant pas les 31%. Cela illustre bien la diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* à l'égard des deux bactéries antagonistes testées dans cette étude. Ce qui signifie en d'autres termes que les bactéries ont un effet variable en fonction des souches de *B. cinerea*, ce qui la aussi peut constituer une contrainte en matière de

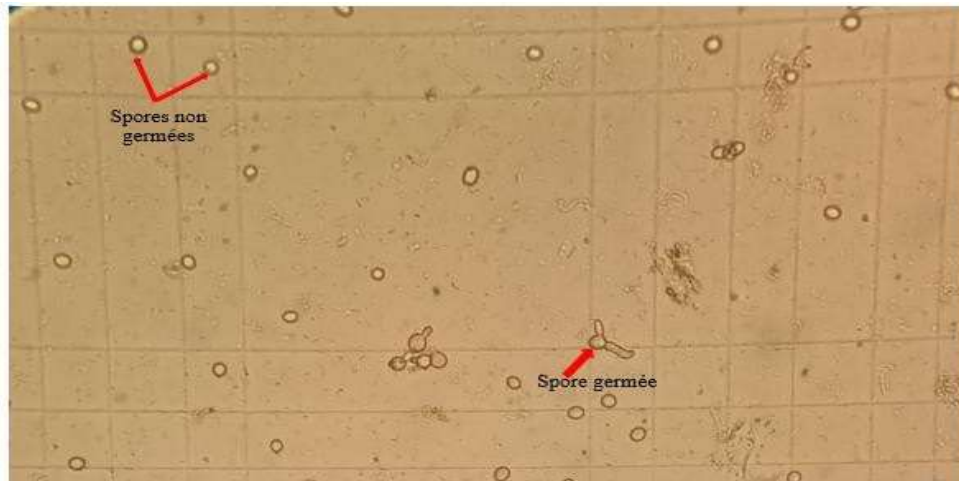
durabilité de la lutte biologique lors de l'application des agents de lutte biologique sur le terrain.



**Figure 24 :** Pourcentage d'inhibition de la germination des spores de *B. cinerea* en présence des deux bactéries.

Les résultats menés par Mónico et al., (2009), ont indiqué que de nombreux champignons antagonistes ont pu inhiber la germination de *B. cinerea* d'un pourcentage qui varie entre 30 à 70%, ce qui est en accord avec nos résultats. De même que la présence de certaines levures isolés de la vigne permet une forte inhibition des conidies de *Botrytis cinerea* (Vargas et al., 2012). Des bactéries comme *Pseudomonas* ont également été rapporté comme ayant un bon effet inhibiteur de la germination des spores mais aussi sur l'élongation de tube germinatif des spores de *Botrytis* (Walker et al., 2001).

L'effet des agents de lutte biologique sur la germination des spores de *B. cinerea* peut être attribué à la production de certaines substances volatiles ou/et non volatiles qui vont agir au niveau de cette étape de germination, qui rappelons-le est une étape primordial du cycle du développement du champignon.



**Figure 25 :** Photo sous microscope optique au grossissement ( $\times 10$ ) montrant les spores de *B. cinerea* germées et non germées

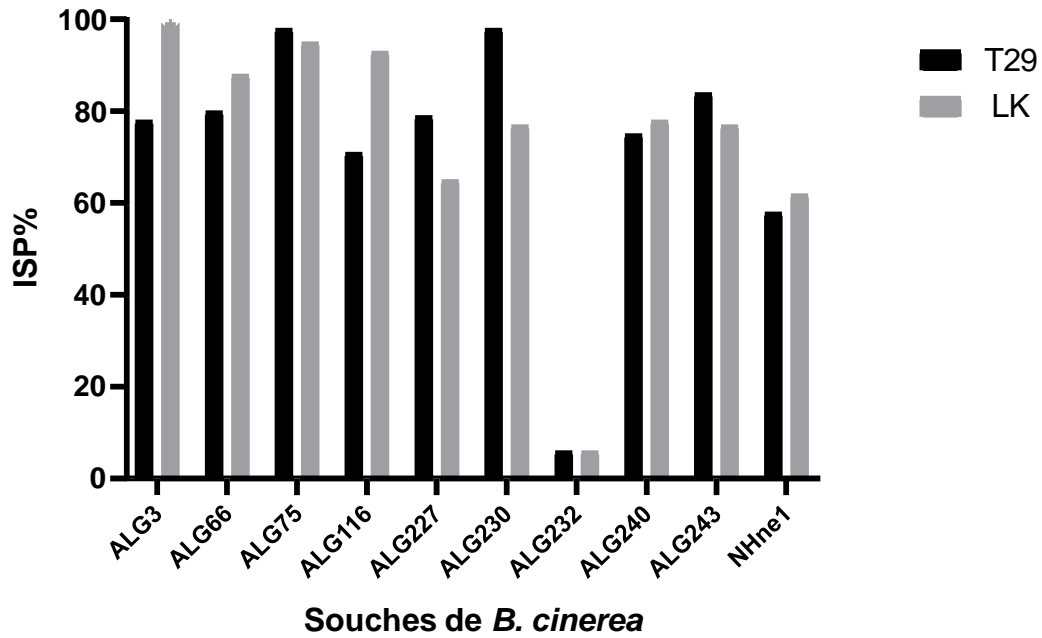
### 5- Évaluation de l'effet des bactéries sur la production des spores des souches de *B. cinerea*

L'effet des deux agents de lutte biologique utilisés dans cette étude (Souche *Bacillus methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp* LK) a été évalué pour la capacité à réduire le nombre de spores produites par les souches de *B. cinerea*.

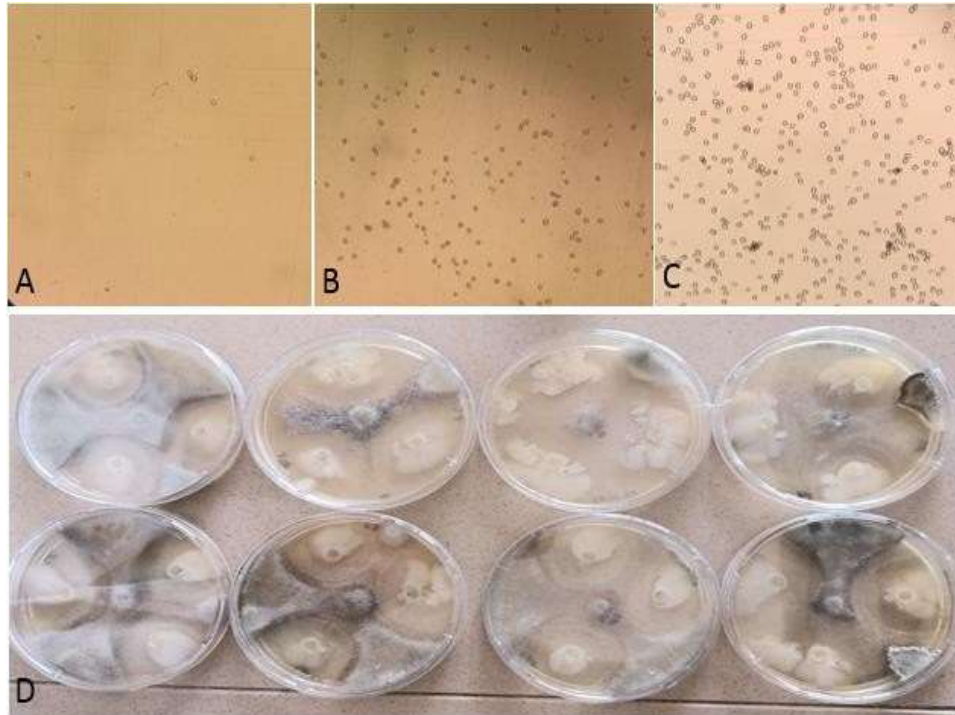
Les résultats illustrés dans la figure 26 indiquent que les deux agents de lutte biologique ont un effet inhibiteur considérable sur la sporulation des souches de *B. cinerea*, comme le cas des souches bactériennes LK et T29 avec les souches fongiques ALG3 et ALG230 respectivement qui ont données un pourcentage d'inhibition à 100%. À l'exception de la souche ALG232 dont la sporulation ne semble pas être affectée par la présence des deux bactéries (taux inhibition faible ; ISP 6%). Pour les autres souches fongiques on dénote des variations au niveau des pourcentages d'inhibition de la sporulation allant de 58 à 100%, ce qui témoigne la aussi de la diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* à l'égard des agents de lutte biologique. D'autres travaux ont également indiqué une large sensibilité des agents pathogènes à divers agents de lutte biologique (Bardin et al, 2015).

Nos résultats sont d'ailleurs on accord avec ceux de Bouaoud et al, (2018) qui ont étudié l'effet de la souche *Pseudomonas helmanticensis* CT22 sur la sporulation de 60 souches de *B. cinerea* et ont souligné la présence au sein de la population du pathogène des souches de *B. cinerea* moins sensible à l'agent de lutte biologique. Par ailleurs, la présence au sein de la

population de *B. cinerea* de souches ayant une sensibilité plus faible à l'agent de lutte biologique pourrait être la cause de la perte d'efficacité de l'agent de lutte biologique.



**Figure 26** : Pourcentage d'inhibition de la sporulation des souches de *B. cinerea* en présence des deux bactéries.



**Figure 27** : Photos montrant des niveaux de sporulation différents en présence des bactéries (A, B), et en présence du témoin sans la bactérie (C) est un témoin, observés sous microscope optique au grossissement  $\times 10$ . La photo (D) montre les différents niveaux de sporulation sur boîte de Pétri en présence des bactéries juste avant l'observation au microscope.

La capacité des bactéries à réduire la sporulation des souches de *B. cinerea* est probablement due aux substances diffusibles et/ou substances volatiles libérées par les bactéries antagonistes qui ont eu pour effet d'inhiber la sporulation du champignon (Kim et al., 2008).

Il est important de citer la diminution de la sporulation de *B. cinerea* afin de combattre efficacement ce champignon pathogène, en particulier dans les cultures sous serres ou la production de l'inoculum secondaire joue un rôle crucial dans sa propagation (Decognet et al., 2009 ; Bardin et al., 2014). En effet, ce champignon a la capacité de produire une quantité significative de spores sur les tissus malades (Nicot et al., 1996), mais leur nombre peut être partiellement réduit grâce à l'utilisation d'agent de lutte biologique (Köhl et al., 1995).

### **6- Évaluation de la diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* vis-à-vis des agents de lutte biologique *in vivo***

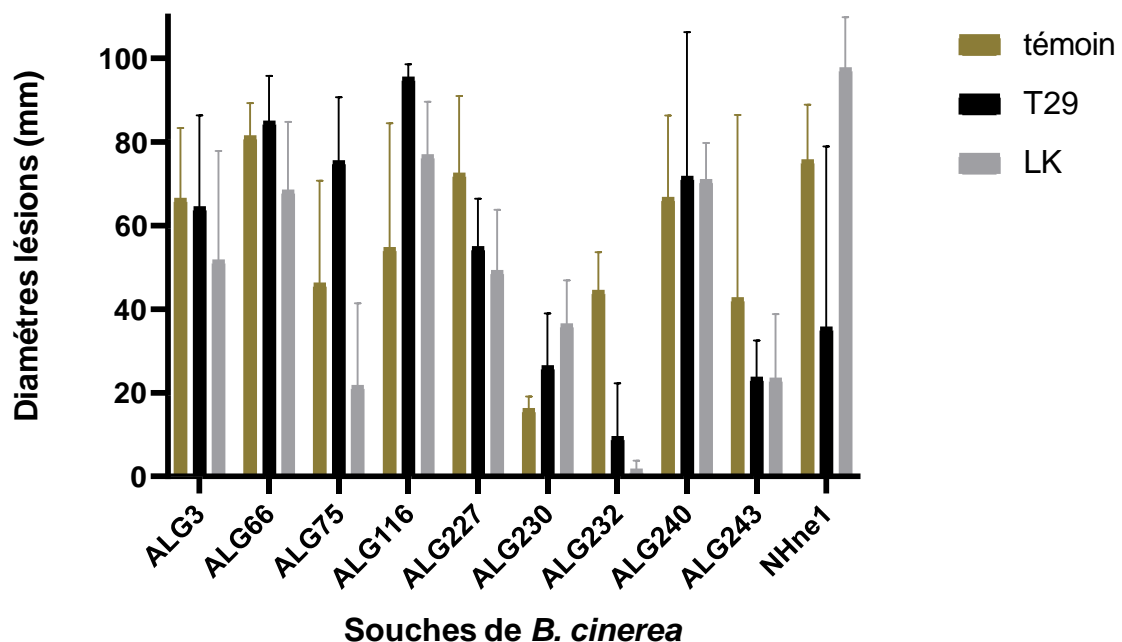
La diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* à l'égard des agents de lutte biologique a été également testée *in vivo* sur feuilles de laitue et les résultats ont montré une variabilité significative des souches de *B. cinerea* vis-à-vis du traitement. En effet, on constate que l'effet



des deux bactéries testées est significativement différent en fonction des souches fongiques (Test Anova ;  $P < 0.0001$ ).

Les feuilles de laitue traitées avec la bactérie T29 a montré des diamètres des lésions plus réduit pour les souches ALG3, ALG227, ALG232, ALG243 et NHne1 allant de 9,5+/-12,77 a 64,5+/-21,86 mm (Figure 28) en comparaison avec le témoin non traité. Les souches ALG66, ALG75, ALG116, ALG230 et ALG240 allant de 26,5+/-12,48 a 95,5+/-3,11 mm ont quant à elles provoquées des lésions plus importantes sur les feuilles de laitue.

Les feuilles de laitue traitées avec la bactérie LK ont montré des diamètres des lésions plus réduit pour les souches ALG3, ALG66, ALG75, ALG227, ALG232, et ALG243 allant de 3,5+/-2,06 a 68,5+/-16,30 mm en comparaison avec le témoin non traité, ce qui démontre la capacité de cette souche bactérienne à réduire la maladie provoquée par ses pathogènes. Pour les souches ALG116, ALG230, ALG240 et NHne1 allant de 36,5+/-10,41 a 97,75+/-12,14 mm elles ont montré des diamètres de lésions élevés, comparables ou supérieurs à ceux du témoin, ce qui veut dire que la bactérie LK n'a pas d'effet contre ces souches fongiques et ne peut pas réduire la maladie.



**Figure 28 :** Diamètres des lésions observés sur feuilles de laitue en présence des bactéries et en absence des bactéries (témoin). Chaque valeur représente la moyenne des quatre répétitions +/- l'erreur standard associée à chaque moyenne.





**Figure 29** : Photos des feuilles de laitues infectées par les souches de *B. cinerea* en présence de traitement avec les bactéries (A et B) et en absence de traitement (C).

Cependant, le test Anova mené sur les diamètres des lésions sur feuilles de laitue chez le témoin (sans bactérie) et chez les feuilles traitées avec les bactéries T29 et LK, n'ont pas révélé de différence significative entre le témoin et le traitement (Test Anova ;  $P = 0.3584$ ). Ce qui fait, que d'une manière générale notre traitement à base d'agent de lutte biologique n'a pas eu d'effet significatif *in vivo*.

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de (Zhao et al., 2003 ; Sadfi et al., 2002) qui ont démontré que certaines souches de *Bacillus* sont capables d'assurer le biocontrôle vis-à-vis de *B. cinerea* sur différents fruits et légumes.

On constate également que nos résultats obtenus *in vivo* ne sont pas en adéquation avec ceux obtenus *in vitro* (effet direct et indirect). En effet, plusieurs études ont également observé que

l'effet des agents de lutte biologique *in vitro* n'est pas corrélé avec l'effet obtenu *in vivo* Essghaier et al, (2009). En effet, des agents de lutte biologique peuvent avoir une efficacité *in vitro* à l'égard des champignons phytopathogènes et n'ont pas avoir une efficacité *in vivo*, et de même certains antagonistes présentent un bon taux de protection sur plantes sans présenter d'effet *in vitro* sur boîte de Pétri. Cela souligne donc l'importance de considérer plusieurs approches lors de la sélection d'un agent de lutte biologique (Bouaoud et al, 2018).

# **Conclusion et perceptives**

### Conclusion

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet de deux agents de lutte biologique appartenant au genre *Bacillus* sur dix souches de *B. cinerea* et nous avons vérifié la diversité de sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis de ces agents de lutte biologiques potentiels.

A l'issue de cette étude, Les deux bactéries *Bacillus methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp* LK se sont révélés efficaces contre le développement des dix souches de *B. cinerea in vitro* et à différents stades de développement des champignons à savoir la croissance mycélienne, la germination des spores et la production des spores. Ce qui implique que les deux souches bactériennes possèdent un potentiel intéressant pour lutter contre la pourriture grise et à des étapes clés du cycle de la maladie. Ce potentiel est principalement dû à la possible production de molécules à activité antifongique types volatiles et non volatiles ayant un effet inhibiteur sur le champignon pathogène.

Cependant, cet effet des bactéries est variable en fonction des souches de *B. cinerea*. En effet, pour le test de confrontation directe et indirect, les pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne varient de 64 à 86,33% pour l'effet direct, et varient de manière encore plus importante de 0 à 63,5% pour l'effet indirect. Cela veut dire qu'il existerait bien au sein de la population de *B. cinerea* des souches ayant une sensibilité moindre aux agents de lutte biologique ce qui pourrait compromettre l'efficacité de la lutte biologique à long terme et donc sa durabilité.

Cette variabilité de l'effet des bactéries antagonistes a également été constaté pour le test de sporulation et la germination des spores de *B. cinerea*. Les pourcentages d'inhibitions de la germination des spores varient de 15 à 91%, et l'inhibition de la sporulation des souches de *B. cinerea* s'étend de 6 à 100%.

Ces résultats soulignent l'importance de considérer plusieurs souches du pathogène lors du développement d'un agent de lutte biologique sur le terrain afin d'éviter l'érosion de l'efficacité de cette méthode de lutte et assurer sa durabilité.

Par ailleurs, les deux bactéries testées n'ont montré aucune efficacité significative sur le développement des souches de *B. cinerea in vivo* sur feuilles de laitue ce qui ne concorde avec les résultats obtenus *in vitro*. Ces résultats montrent bien que l'efficacité *in vitro* n'est pas toujours corrélée avec l'efficacité *in vivo*.

Toutefois, il est nécessaire de compléter ce travail avec des approches plus approfondies, à savoir :

- Tester les deux agents de lutte biologique sur d'autres souches de *B. cinerea*.
- Tester l'effet des bactéries *in planta* et sur d'autres espèces végétales.
- Caractériser les substances produites par les agents de lutte
- Étudier les mécanismes d'action des agents de lutte biologique et leurs durabilités
- Tester les deux bactéries en plein champ

# **Références bibliographiques**

### A

Abro, M. A., Lecompte, F., Bryone, F., & Nicot, P. C. (2013). Nitrogen Fertilization of the Host Plant Influences Production and Pathogenicity of *Botrytis cinerea* Secondary Inoculum. *Phytopathology*®, 103(3), 261-267. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-12-0189-R>

Adjebli, A. (2015). Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *Botrytis cinerea*; agent causal de la pourriture grise sur tomate [PhD Thesis]. Université Abderrahmane Mira de Béjaïa.p .136.

Adjebli, A., Leyronas, C., Aissat, K., & Nicot, P. C. (2015). Comparison of *Botrytis cinerea* populations collected from tomato greenhouses in northern Algeria. *Journal of Phytopathology*, 163(2), 124-132.

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

Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research : Roles and applications: Siderophores in environmental research. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>

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*, 28(3), 403-409. <https://doi.org/10.1051/agro:2008016>

Ajouz, S. (2009). Estimation du potentiel de *Botrytis cinerea* a des biofongicides. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. p. 198.

Ajouz, S., Walker, A. S., Fabre, F., Leroux, P., Nicot, P. C., & Bardin, M. (2011). Variability of *Botrytis cinerea* sensitivity to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. *BioControl*, 56(3), 353-363. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9333-7>

Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases : The European situation. *European journal of plant pathology*, 114, 329-341.

Al-Shugairan, N. M. I. (2008). *Biological Control of Fusarium oxysporum Wilt Disease of Tomato by Antagonistic and Plant Growth Promoting Actinomycetes*.

Alstrom, S. (2001). Characteristics of Bacteria from Oilseed Rape in Relation to their Biocontrol Activity against *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*, 149(2), 57-64. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00585.x>

Alyokhin, A., Baker, M., Mota-Sanchez, D., Dively, G., & Grafius, E. (2008). Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *American Journal of Potato Research*, 85(6), 395-413. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9052-0>

Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J.-M., Quévillon, E., Sharon, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>

### B

Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Siegwart, M., & Nicot, P. C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>

Bardin, M., Decognet, V, Nicot, PC (2014) Remarkable predominance of a small number of genotypes in greenhouse populations of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 104: 859-864.

Bardin, M., Pressecq, T., Nicot, P. C., & Bouaoud, Y. (2021). *Durability of efficacy of microbial bioprotectants against plant diseases*. Burleigh Dodds Science Publishing.

Beever, R. E., & Weeds, P. L. (2004). *Taxonomy and genetic variation of Botrytis and Botryotinia*. In 'Botrytis : Biology, pathology and control'.(Eds Y Elad, B Williamson, P Tudzynski, N Delen) pp. 29–52. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.



- Blakeman, J. P. (1975). Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Transactions of the British Mycological Society*, 65(2), 239-247. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80006-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80006-4)
- Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G., & Candresse, T. (2009). *Les maladies de la tomate : Identifier, connaître, maîtriser*. Éditions Quæ.
- Booth, J., Schenk, P. M., & Mirzaee, H. (2022). Microbial Biopesticides against Bacterial, Fungal and Oomycete Pathogens of Tomato, Cabbage and Chickpea. *Applied Microbiology*, 2(1), 288-301.
- Bouaoud, Y. (2018). Protection biologique contre la pourriture grise de la tomate sous serre en Algérie. [Thésès] .Université Abderrahmane Mira de Béjaia. p .77-90.
- Bouaoud, Y., Troulet, C., Foughalia, A., Berge, O., Aissat, K., & Bardin, M. (2018a). A multi-criteria approach for the selection of efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on tomato in Algeria. *BioControl*, 63(2), 299-311. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9851-7>
- Boukaew, S., Prasertsan, P., Troulet, C., & Bardin, M. (2017). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* by using *Streptomyces spp.* *BioControl*, 62(6), 793-803. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9825-9>
- Bryone, F. (2011). *Caractérisation de populations de B. cinerea issues de cultures de laitues et de tomates sous abris* [PhD Thesis]. Institut National d'Horticulture (INH), Angers, FRA.

### C

- Chardonnet, C. O., Sams, C. E., Trigliano, R. N., & Conway, W. S. (2000). Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology*, 90(7), 769-774.
- Clark, C. A., & Lorbeer, J. W. (1977). Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathology*, 67(2), 212-218.

Colmenares, A. J., Aleu, J., Duran-Patron, R., Collado, I. G., & Hernandez-Galan, R. (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of chemical ecology*, 28, 997-1005.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases : Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959.

### D

Dean, R., Van Kan, J. A. L., 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 : Top 10 fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y., & Nicot, P. C. (2009). Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology*, 99(2), 185-193.

Decognet, V., Ravetti, F., Martin, C., & Nicot, P. C. (2010). Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(2), 465-472. <https://doi.org/10.1051/agro/2009030>

Dib, H. (2010). *Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, Dysaphis plantaginea Passerini (Hemiptera aphididae) en vergers de pommiers* [PhD Thesis]. Université d'Avignon.

Dik, A. J., & Wubben, J. P. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Éds.), *Botrytis : Biology, Pathology and Control* (p. 319-333). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_17)

Doehlemann, G., Berndt, P., & Hahn, M. (2006). Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology*, 152(9), 2625-2634.

Duffy, B., Schouten, A., & Raaijmakers, J. M. (2003). PATHOGEN SELF-DEFENSE : Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 501-538. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>

### E

Edwards, S. G., & Seddon, B. (2001). Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 652 - 659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01430.x>

Elad, Y. (1997). Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop protection*, 16(7), 635-642.

Elad, Y. (1997d). Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews*, 72(3), 381-422.

Elad, Y. (2000). *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(4), 499-507.

Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A. M., & Stewart, A. (2016). Plant hosts of *Botrytis* spp. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 413-486.

Elad, Y., & Stewart, A. (2007). Microbial Control of *Botrytis* spp. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Éds.), *Botrytis : Biology, Pathology and Control* (p. 223-241). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_13)

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., & Elad, Y. (Éds.). (2007). *Botrytis : Biology, pathology and control*. Springer.

Elmer, P. A. G., & Michailides, T. J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Éds.), *Botrytis : Biology, Pathology and Control* (p. 243-272). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_14)

Elnahal, A. S. M., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E.-S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., AbuQamar, S. F., & El-Tarabily, K. A. (2022). Correction : The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 162(4), 1007 - 1007.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-022-02472-3>

Essghaier, B., Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H., & Sadfi-Zouaoui, N. (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of applied microbiology*, 106(3), 833-846.

### F

Faessel, L., & Tostivint, C. (2014). les produits de stimulation en agriculture :un état des connaissances. p. 7-39.

Fekete, É., Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa, L., Árnayasi, M., Asadollahi, M., & Sándor, E. (2012). Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiological Research*, 167(5), 283-291.

Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit : Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), 47-63.

Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), 119-126.

Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(4), 395 - 405.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x>

Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 337-359.

### G

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., & Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(7), 711-724.

Gurusiddaiah, S., Weller, D. M., Sarkar, A., & Cook, R. J. (1986). Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 29(3), 488-495.

### H

Holz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *Botrytis: Biology, pathology and control*, 9-27.

### I

Irtwange, S. V. (2006). Application of biological control agents in pre-and postharvest operations. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*.

Isenegger, D. A., Ades, P. K., Ford, R., & Taylor, P. W. J. (2008). Status of the *Botrytis cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in South Asia and Australia. *Fungal Diversity*, 29(17-26).

### J

Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Alizadeh, A., & Aminian, H. (2008). Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). *Phytoparasitica*, 36(1), 23-29.  
<https://doi.org/10.1007/BF02980744>

Jarvis, W. R. (1977). *Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature*.

Jarvis, W. R., & Jarvis, W. R. (1992). *Managing diseases in greenhouse crops*.

Johnson, R. (1979). Letter to the editor : The concept of durable resistance. *Phytopathology*, 69, 198-199.

Johnson, R. (1984). *A Critical Analysis of Durable Resistance*.p 198-199.

### K

- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(6), 1001-1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1760-3>
- Karchani-Balma, S., Gautier, A., Raies, A., & Fournier, E. (2008). Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology*, 98(12), 1271-1279.
- Kars, I., & van Kan, J. A. L. (2007). Extracellular Enzymes and Metabolites Involved in Pathogenesis of *Botrytis*. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Éds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p. 99 - 118). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_7)
- Kefi, A., Slimene, I., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., & Limam, F. (2015). Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World journal of microbiology & biotechnology*, 31. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1943-x>
- Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., & Bayat, H. (2010). *Morphological and molecular identification of Botrytis cinerea causal agent of gray mold in rose greenhouses in central regions of Iran.*
- Kim, W. G., Weon, H. Y., Seok, S. J., & Lee, K. H. (2008). In vitro antagonistic characteristics of bacilli isolates against *Trichoderma spp.* And three species of mushrooms. *Mycobiology*, 36(4), 266-269.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Köhl, J., Van Der Plas, C. H., Molhoek, W. M. L., & Fokkema, N. J. (1995). Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea*

by antagonists on dead onion leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 101(6), 627-637.  
<https://doi.org/10.1007/BF01874867>

Kouassi, M. de (2001) Les possibilités de la lutte microbiologique vertigO- la revue électronique en science de l'environnement, 2 (2). Doi.10.4000/vertigo.4091.

### L

Lefort, F. (2010). Lutte biologique et lutte microbiologique : Des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. *Hepia*, 57p.

Legard, D. E., Xiao, C. L., Mertely, J. C., & Chandler, C. K. (2000). Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Disease*, 84(5), 531-538.

Lepoivre, P. (2001). Les systèmes de production agricole et la protection des cultures à la croisée des chemins. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5(4).

Leroux, P. (2007). Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Éds.), *Botrytis : Biology, Pathology and Control* (p. 195-222). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_12)

Leroux, P., Chapeland-Leclerc, F., Desbrosses, D., & Gredt, M. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18, 687-697. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00074-5)

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., & Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9), 876-888. <https://doi.org/10.1002/ps.566>

Li, G. Q., Huang, H. C., Acharya, S. N., & Erickson, R. S. (2004). Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant disease*, 88(11), 1246-1251.

Li, H., & Leifert, C. (1994). *Development of resistance in Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel against the biological control agent Bacillus subtilis CL27 / Resistenzentwicklung in Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel gegen den Antagonisten Bacillus subtilis CL27.*

Liu, W., Mu, W., Zhu, B., Du, Y., & Liu, F. (2008). Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. And *Paenibacillus* spp. Against Soil-Borne Plant Pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 7(9), 1104 - 1114. [https://doi.org/10.1016/S1671-](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60153-4)

2927(08)60153-4

Lorbeer, J. W., Seyb, A. M., de Boer, M., & van den Ende, J. E. (2007). *Botrytis* Species on Bulb Crops. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Éds.), *Botrytis : Biology, Pathology and Control* (p. 273-294). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_15)

### M

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., & Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 43-57. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9111-2>

Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). *Phenotypic differences between vacuola and transposon subpopulations of Botrytis cinerea*.

Martinez, F., Dubos, B., & Fermaud, M. (2005). The Role of Saprotrophy and Virulence in the Population Dynamics of *Botrytis cinerea* in Vineyards. *Phytopathology*®, 95(6), 692-700. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0692>

Mazzola, M., & Cook, R. J. (1991). Effects of fungal root pathogens on the population dynamics of biocontrol strains of fluorescent pseudomonads in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2171-2178.

Mazzola, M., Fujimoto, D. K., Thomashow, L. S., & Cook, R. J. (1995). Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. And effect on biological control of take-all of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2554-2559.

McDonald, B. A., & Linde, C. (2002a). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 349-379.



McGaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229(4709), 193-195.

McGaughey, W. H., & Whalon, M. E. (1992). Managing Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Science*, 258(5087), 1451 - 1455.  
<https://doi.org/10.1126/science.258.5087.1451>

Milgroom, M. G., & Peever, T. L. (2003). Population biology of plant pathogens : The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant disease*, 87(6), 608-617.

Miller, J. S., Johnson, D. A., & Hamm, P. B. (1998). Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology*, 88(3), 190-197.

Mirzaei, S., Mohammadi Goltapeh, E., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., & Chaichi, M. (2009). Genetic and Phenotypic Diversity among *Botrytis cinerea* Isolates in Iran. *Journal of Phytopathology*, 157(7-8), 474-482. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01518.x>

Mónaco, C., Dal Bello, G., Rollán, M. C., Ronco, L., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., Aprea, A., Larran, S., & Stocco, M. (2009). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 42(8), 729-737. <https://doi.org/10.1080/03235400701390646>

Mouria, B., Ouazzani-Touhami, A., Mouria, A., & Douira, A. (2013). Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez *Botrytis cinerea* et lutte biologique in vitro par l'extrait de compost. *Journal of Applied Biosciences*, 64, 4797-4812.

Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., & Tzavella-Klonari, K. (2007). Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 91(4), 407-413.

Naika, S., Lidth de Jeude, J. van, Goffau, M. de, Hilmi, M., & Dam, B. van. (2005). La culture de la tomate : Production, transformation et commercialisation. *Agrodok*.

Nicot, P. C., & Baille, A. (1996). Integrated Control of *Botrytis Cinerea* on Greenhouse Tomatoes. In C. E. Morris, P. C. Nicot, & C. Nguyen-The (Éds.), *Aerial Plant Surface Microbiology* (p. 169-189). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-585-34164-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-0-585-34164-4_11)

Nicot PC, Mermier M, Vaissière BE, Lagier J (1996) Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. *Plant Dis* 80: 555-558.

Nicot, P. C., Stewart, A., Bardin, M., & Elad, Y. (2016). Biological control and biopesticide suppression of *Botrytis*-incited diseases. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 165-187.

Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 181-196. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>

### O

O'Neill, T. M., Shtienberg, D., & Elad, Y. (1997). Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant disease*, 81(1), 36-40.

Oyarzún, M. P., Quiroz, A., & Birkett, M. A. (2008). Insecticide resistance in the horn fly : Alternative control strategies. *Medical and veterinary entomology*, 22(3), 188-202.

### P

Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., & Suh, J.-W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9621-9636. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5206-1>

Paul, B. (1999). *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters*, 181(2), 277-280.

Perron, P. (1999). Protection intégrée des cultures: Évolution du concept et de son application. *Cahiers Agricultures*, 8(5), 389-396.

Petatán-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M. A., Silva-Rojas, H. V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I. O., & Mercado-Flores, Y. (2011). Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5522-5537.

<https://doi.org/10.3390/ijms12095522>

Ploetz, R. (2004). *Les maladies et les ravageurs : Leur importance et leur gestion*. 13.

### R

Rashad, Y. M., & Moussa, T. A. (2020). Biocontrol agents for fungal plant diseases management. *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications: Practical Aspects to Deal Biologically with Pests and Stresses Facing Strategic Crops*, 337-363.

Ritika, B., & Utpal, D. (2014). An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. *African Journal of Microbiology Research*, 8(17), 1749-1762.

Romanazzi, G., & Droby, S. (2016). Control Strategies for Postharvest Grey Mould on Fruit Crops. In S. Fillinger & Y. Elad (Éds.), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (p. 217 - 228). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_11)

Rosslénbroich, H.-J., & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea*—History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19(8 - 10), 557 - 561.

[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00072-7)

Rotem, J., & Aust, H. J. (1991). The Effect of Ultraviolet and Solar Radiation and Temperature on Survival of Fungal Propagules. *Journal of Phytopathology*, 133(1), 76-84.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb00139.x>

### S

Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M. R., & Boudabbous, A. (2002). Biological Control of the Potato Tubers Dry Rot Caused by *Fusarium roseum* var. *Sambucinum* under Greenhouse, Field and Storage Conditions using *Bacillus spp.* Isolates. *Journal of Phytopathology*, 150(11-12), 640-648. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00811.x>

Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Andurand, D., Essghaier, B., Boudabous, A., & Nicot, P. (2008). Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2871-2877.

Schalchli, H., Hormazabal, E., Becerra, J., Birkett, M., Alvear, M., Vidal, J., & Quiroz, A. (2011). Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi. *Chemistry and Ecology*, 27(6), 503-513.

Shiraishi, M., Fukutomi, M., et Akai, S. (1970). Effects of Temperature on the Conidium Germination and Appressorium Formation of *Botrytis cinerea* Pers. *Japanese Journal of Phytopathology*, 36(4), 234-236\_2.

Singh, A., Mehta, S., Singh, H. B., & Nautiyal, C. S. (2003). Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Current microbiology*, 47, 0153-0158.

Snow, D. (1949). The germination of mould spores at controlled humidities. *Annals of Applied Biology*, 36(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1949.tb06395.x>

Stockwell, V. O., Kawalek, M. D., Moore, L. W., & Loper, J. E. (1996). Transfer of pAgK84 from the biocontrol agent *Agrobacterium radiobacter* K84 to *A. tumefaciens* under field conditions. *Phytopathology*, 86(1), 31-37.

### T

Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual review of entomology*, 39(1), 47-79.

Tapondjou, A. L., Adler, C., Fontem, D. A., Bouda, H., & Reichmuth, C. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research*, 41(1), 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.01.004>

Thomas, C. S., Marois, J. J., & English, J. T. (1988). The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape. *Phytopathology*, 78(3), 260-265.

Tostivint, C., Faessel, L., et Nasser, N. (2014). *Informations sur le projet*. Uchneat, M. S., Spicer, K., & Craig, R. (1999). Differential response to floral infection by *Botrytis cinerea* within the genus *Pelargonium*. *HortScience*, 34(4), 718-720.

### V

Valero-Jiménez, C. A., Veloso, J., Staats, M., & van Kan, J. A. L. (2019). Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity. *BMC Genomics*, 20(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5580-x>

van Kan, J. A. (2003). Infection strategies of *Botrytis cinerea*. *VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants* 669, 77-90.

Vargas, M., Garrido, F., Zapata, N., & Tapia, M. (2012). Isolation and selection of epiphytic yeast for biocontrol of *Botrytis cinerea* Pers. On table grapes. *Chilean journal of agricultural research*, 72(3), 332.

Vasquez, H. (2017). *Stimuler les défenses des plantes contre botrytis cinerea par des rayonnements UV-C*.

Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. As endophytes. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 952.

### W

Walia, A., Putatunda, C., Sharma, R., Sharma, S., & Thakur, A. (2021). Biocontrol: A Sustainable Agricultural Solution for Management of Plant Diseases. In M. Kaushal & R. Prasad (Éds.), *Microbial Biotechnology in Crop Protection* (p. 1-54). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-0049-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0049-4_1)

Walker, A.-S. (2016). Diversity within and between species of *Botrytis*. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 91-125.

Walker, Innes, & Allan. (2001). The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology*, 32(5), 346-348. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00915.x>

Wang, S., Hu, T., Jiao, Y., Wei, J., & Cao, K. (2009). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. *Frontiers of Agriculture in China*, 3, 247-252.

Wheatley, R. E. (2002). *The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions*.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea* : The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561 - 580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>


### Y

Yan, X., Chen, S., Sun, W., Zhou, X., Yang, D., Yuan, H., & Wang, D. (2022). Primary Mode of Action of the Novel Sulfonamide Fungicide against *Botrytis cinerea* and Field Control Effect on Tomato Gray Mold. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1526. <https://doi.org/10.3390/ijms23031526>

Yourman, L. F., Jeffers, S. N., & Dean, R. A. (2001). Phenotype Instability in *Botrytis cinerea* in the Absence of Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. *Phytopathology*®, 91(3), 307-315. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.3.307>

### Z

Zhao, J., Li, J., & Kong, F. (2003). Biocontrol activity against *Botrytis cinerea* by *Bacillus subtilis* 728 isolated from marine environment. *Annals of microbiology*, 53(1), 29-36.

	Mode opératoire	Réf. : MO-MYC-LAB-21
	Utilisation de l'hématimètre de Malassez pour quantifier la concentration d'une suspension de spores de champignon	Version : 1 Date : 03/04/09 page 1/5

## I- Objet et domaine d'application :

Quantification de la concentration d'une suspension de spores de champignon à l'aide d'une cellule de Malassez.

## II- Destinataires :

A tout le personnel de mycologie

## III- Documents de référence :

## IV- Hygiène et sécurité (précautions à prendre) :

## V- Appareils, matériels et notions nécessaires :

Microscope  
Cellule de Malassez  
Compteur  
Micropipettes et cônes  
Tubes d'Eppendorf  
Eau  
Feuille de notation

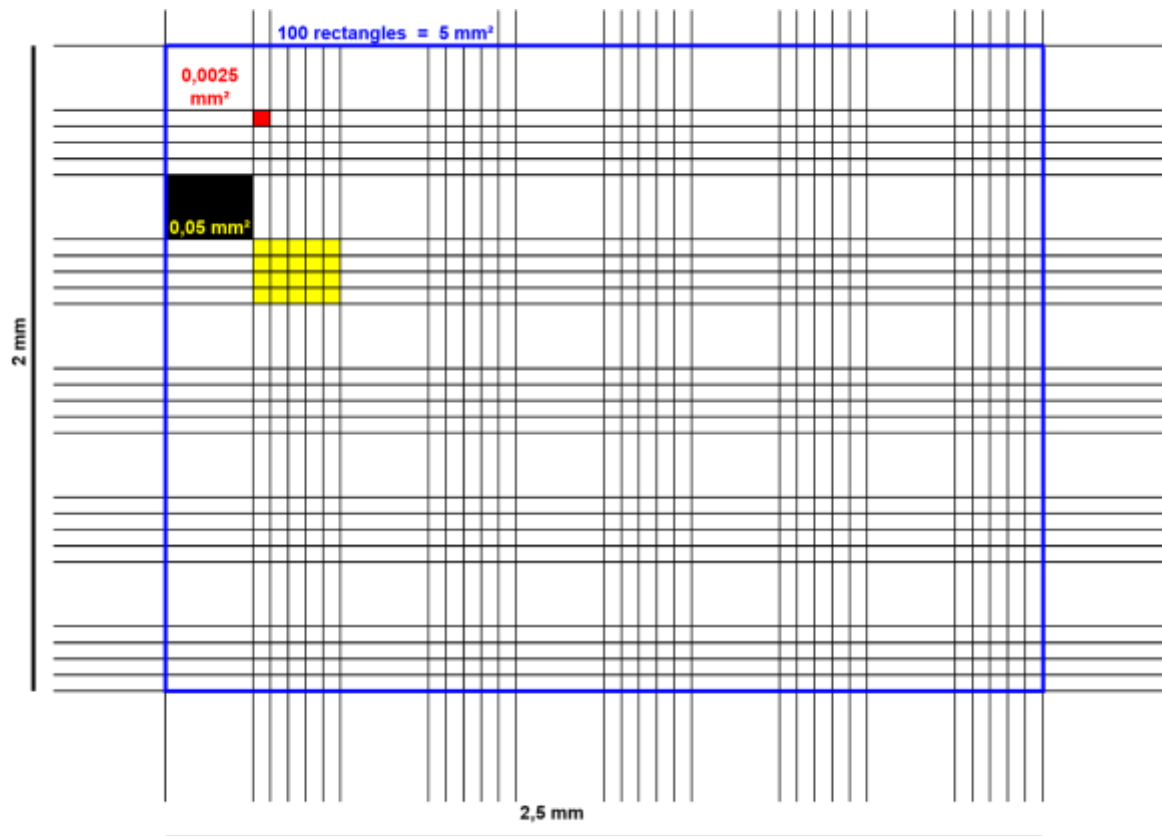
	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Philippe Nicot	Claire Troulet	Claire Troulet
Visa :			

## VI- Contenu du mode opératoire :

### 1- Description de la cellule de Malassez

La cellule de numération est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Elle comporte des rigoles et deux zones de quadrillage:





Parmi ces 100 rectangles, 25 sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

Le volume de comptage est déterminé par :

- La surface du quadrillage gravé sur la lame



Plate-forme centrale



- la profondeur de la chambre (0,200 mm)

**Unité Pathologie Végétale** suspension de spores de champignon page 3/5

Les deux zones quadrillées comportent chacune 100 rectangles :

→ le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ } \mu\text{l} = 10^{-3} \text{ ml}$

→ chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit  $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ ml}$

## 2- Dilution préalable de la suspension

Lorsque la suspension est trop concentrée, il est difficile de compter les spores sur la cellule de Malassez. Il est alors nécessaire de réaliser une dilution préalable. Si tel est le cas, il faut veiller à bien indiquer le taux de dilution sur la feuille de notation.

### 3-Remplissage de la cellule

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

### Unité Pathologie Végétale    suspension de spores de champignon    page 4/5

- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une micropipette. Remplir chacune des deux chambres de comptage par capillarité (deux pipetages indépendants), en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

Remarque : Les chambres contiennent environ 17µl de suspension chacune.

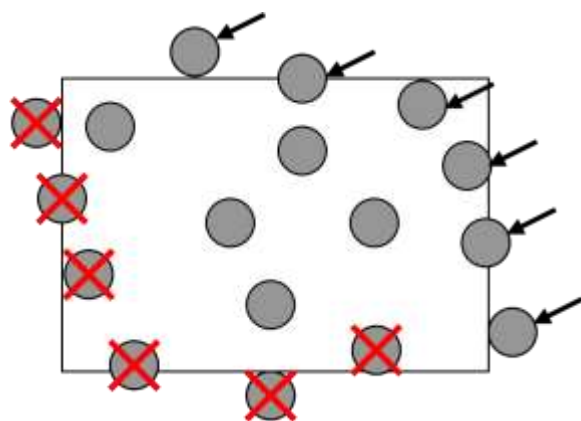
→ Le remplissage doit être fait en une seule fois pour chaque zone, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

### 4-Comptage des spores

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des spores à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif **x10** ou **x20** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Selon la densité de spores observée, compter dans 5, 25 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage, pour obtenir un nombre d'au moins 30 spores par comptage.

Remarque : pour les spores chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules touchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



Exemple : numération sur le rectangle = 11 spores

- Le dénombrement doit être réalisé sur les deux zones de quadrillage de la cellule.

**Unité Pathologie Végétale** suspension de spores de champignon page 5/5

### 5-Calcul de la concentration

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration  $C$  de la suspension.

$$C = N / V \quad \text{Si la suspension avait été diluée: } C = (N / V) \times f$$

avec : -  $N$  : nombre total de spores comptées

-  $V$  : volume total de comptage (en ml)

-  $f$  : facteur de dilution

-  $C$  : concentration de la suspension en nombre de spores par ml

**En pratique**, si le comptage a été réalisé sur  $n$  rectangles, la concentration  $C$  est égale à:

$$C = (N / n) \times 10^5 \text{ spores / ml, avec } n = \text{nombre de rectangles dénombrés}$$

$$\text{Si la suspension avait été diluée: } (N / n) \times f \times 10^5 \text{ spores / ml}$$

### VII- Consignes particulières (précaution d'emploi, personnes à contacter ...) :

En cas de problème ou pour des renseignements complémentaires, veuillez contacter Philippe Nicot, Marc Bardin, Christel Leyronas ou Claire Troulet.

## Les résultats du test statistiques de test de l'évaluation de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea*

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
ALG3 vs. ALG66	-1,333	-3,841 to 1,175	No	ns	0,7645
ALG3 vs. ALG75	2,889	0,3809 to 5,397	Yes	*	0,0122
ALG3 vs. ALG116	-0,6667	-3,175 to 1,841	No	ns	0,9967
ALG3 vs. ALG227	-0,4444	-2,952 to 2,064	No	ns	0,9999
ALG3 vs. ALG230	0,4444	-2,064 to 2,952	No	ns	0,9999
ALG3 vs. ALG232	-1,556	-4,064 to 0,9524	No	ns	0,5768
ALG3 vs. ALG240	-1,778	-4,286 to 0,7302	No	ns	0,3864
ALG3 vs. ALG243	-0,2222	-2,730 to 2,286	No	ns	>0,9999
ALG3 vs. NHne1	-1,444	-3,952 to 1,064	No	ns	0,6741
ALG66 vs. ALG75	4,222	1,714 to 6,730	Yes	****	<0,0001
ALG66 vs. ALG116	0,6667	-1,841 to 3,175	No	ns	0,9967
ALG66 vs. ALG227	0,8889	-1,619 to 3,397	No	ns	0,9750
ALG66 vs. ALG230	1,778	-0,7302 to 4,286	No	ns	0,3864
ALG66 vs. ALG232	-0,2222	-2,730 to 2,286	No	ns	>0,9999
ALG66 vs. ALG240	-0,4444	-2,952 to 2,064	No	ns	0,9999
ALG66 vs. ALG243	1,111	-1,397 to 3,619	No	ns	0,9038
ALG66 vs. NHne1	-0,1111	-2,619 to 2,397	No	ns	>0,9999
ALG75 vs. ALG116	-3,556	-6,064 to -1,048	Yes	***	0,0007
ALG75 vs. ALG227	-3,333	-5,841 to -0,8254	Yes	**	0,0019
ALG75 vs. ALG230	-2,444	-4,952 to 0,06353	No	ns	0,0620
ALG75 vs. ALG232	-4,444	-6,952 to -1,936	Yes	****	<0,0001
ALG75 vs. ALG240	-4,667	-7,175 to -2,159	Yes	****	<0,0001
ALG75 vs. ALG243	-3,111	-5,619 to -0,6031	Yes	**	0,0050
ALG75 vs. NHne1	-4,333	-6,841 to -1,825	Yes	****	<0,0001
ALG116 vs. ALG227	0,2222	-2,286 to 2,730	No	ns	>0,9999
ALG116 vs. ALG230	1,111	-1,397 to 3,619	No	ns	0,9038
ALG116 vs. ALG232	-0,8889	-3,397 to 1,619	No	ns	0,9750
ALG116 vs. ALG240	-1,111	-3,619 to 1,397	No	ns	0,9038
ALG116 vs. ALG243	0,4444	-2,064 to 2,952	No	ns	0,9999
ALG116 vs. NHne1	-0,7778	-3,286 to 1,730	No	ns	0,9899
ALG227 vs. ALG230	0,8889	-1,619 to 3,397	No	ns	0,9750
ALG227 vs. ALG232	-1,111	-3,619 to 1,397	No	ns	0,9038
ALG227 vs. ALG240	-1,333	-3,841 to 1,175	No	ns	0,7645
ALG227 vs. ALG243	0,2222	-2,286 to 2,730	No	ns	>0,9999
ALG227 vs. NHne1	-1,000	-3,508 to 1,508	No	ns	0,9475
ALG230 vs. ALG232	-2,000	-4,508 to 0,5080	No	ns	0,2313
ALG230 vs. ALG240	-2,222	-4,730 to 0,2858	No	ns	0,1252
ALG230 vs. ALG243	-0,6667	-3,175 to 1,841	No	ns	0,9967
ALG230 vs. NHne1	-1,889	-4,397 to 0,6191	No	ns	0,3030
ALG232 vs. ALG240	-0,2222	-2,730 to 2,286	No	ns	>0,9999
ALG232 vs. ALG243	1,333	-1,175 to 3,841	No	ns	0,7645
ALG232 vs. NHne1	0,1111	-2,397 to 2,619	No	ns	>0,9999
ALG240 vs. ALG243	1,556	-0,9524 to 4,064	No	ns	0,5768
ALG240 vs. NHne1	0,3333	-2,175 to 2,841	No	ns	>0,9999
ALG243 vs. NHne1	-1,222	-3,730 to 1,286	No	ns	0,8424

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff, N1	N2	q	DF
ALG3 vs. ALG66	21,11	22,44	-1,333	0,7634	9	2,470	60,00
ALG3 vs. ALG75	21,11	18,22	2,889	0,7634	9	5,352	60,00
ALG3 vs. ALG116	21,11	21,78	-0,6667	0,7634	9	1,235	60,00
ALG3 vs. ALG227	21,11	21,56	-0,4444	0,7634	9	0,8234	60,00
ALG3 vs. ALG230	21,11	20,67	0,4444	0,7634	9	0,8234	60,00
ALG3 vs. ALG232	21,11	22,67	-1,556	0,7634	9	2,882	60,00
ALG3 vs. ALG240	21,11	22,89	-1,778	0,7634	9	3,294	60,00
ALG3 vs. ALG243	21,11	21,33	-0,2222	0,7634	9	0,4117	60,00
ALG3 vs. NHne1	21,11	22,56	-1,444	0,7634	9	2,676	60,00
ALG66 vs. ALG75	22,44	18,22	4,222	0,7634	9	7,822	60,00
ALG66 vs. ALG116	22,44	21,78	0,6667	0,7634	9	1,235	60,00
ALG66 vs. ALG227	22,44	21,56	0,8889	0,7634	9	1,647	60,00
ALG66 vs. ALG230	22,44	20,67	1,778	0,7634	9	3,294	60,00
ALG66 vs. ALG232	22,44	22,67	-0,2222	0,7634	9	0,4117	60,00
ALG66 vs. ALG240	22,44	22,89	-0,4444	0,7634	9	0,8234	60,00
ALG66 vs. ALG243	22,44	21,33	1,111	0,7634	9	2,058	60,00
ALG66 vs. NHne1	22,44	22,56	-0,1111	0,7634	9	0,2058	60,00
ALG75 vs. ALG116	18,22	21,78	-3,556	0,7634	9	6,587	60,00
ALG75 vs. ALG227	18,22	21,56	-3,333	0,7634	9	6,175	60,00
ALG75 vs. ALG230	18,22	20,67	-2,444	0,7634	9	4,529	60,00
ALG75 vs. ALG232	18,22	22,67	-4,444	0,7634	9	8,234	60,00
ALG75 vs. ALG240	18,22	22,89	-4,667	0,7634	9	8,646	60,00
ALG75 vs. ALG243	18,22	21,33	-3,111	0,7634	9	5,764	60,00
ALG75 vs. NHne1	18,22	22,56	-4,333	0,7634	9	8,028	60,00
ALG116 vs. ALG227	21,78	21,56	0,2222	0,7634	9	0,4117	60,00
ALG116 vs. ALG230	21,78	20,67	1,111	0,7634	9	2,058	60,00
ALG116 vs. ALG232	21,78	22,67	-0,8889	0,7634	9	1,647	60,00
ALG116 vs. ALG240	21,78	22,89	-1,111	0,7634	9	2,058	60,00
ALG116 vs. ALG243	21,78	21,33	0,4444	0,7634	9	0,8234	60,00
ALG116 vs. NHne1	21,78	22,56	-0,7778	0,7634	9	1,441	60,00
ALG227 vs. ALG230	21,56	20,67	0,8889	0,7634	9	1,647	60,00
ALG227 vs. ALG232	21,56	22,67	-1,111	0,7634	9	2,058	60,00
ALG227 vs. ALG240	21,56	22,89	-1,333	0,7634	9	2,470	60,00
ALG227 vs. ALG243	21,56	21,33	0,2222	0,7634	9	0,4117	60,00
ALG227 vs. NHne1	21,56	22,56	-1,000	0,7634	9	1,853	60,00
ALG230 vs. ALG232	20,67	22,67	-2,000	0,7634	9	3,705	60,00
ALG230 vs. ALG240	20,67	22,89	-2,222	0,7634	9	4,117	60,00
ALG230 vs. ALG243	20,67	21,33	-0,6667	0,7634	9	1,235	60,00
ALG230 vs. NHne1	20,67	22,56	-1,889	0,7634	9	3,499	60,00
ALG232 vs. ALG240	22,67	22,89	-0,2222	0,7634	9	0,4117	60,00
ALG232 vs. ALG243	22,67	21,33	1,333	0,7634	9	2,470	60,00
ALG232 vs. NHne1	22,67	22,56	0,1111	0,7634	9	0,2058	60,00
ALG240 vs. ALG243	22,89	21,33	1,556	0,7634	9	2,882	60,00
ALG240 vs. NHne1	22,89	22,56	0,3333	0,7634	9	0,6175	60,00
ALG243 vs. NHne1	21,33	22,56	-1,222	0,7634	9	2,264	60,00

## Les résultats du test statistiques de l'évaluation de la diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* vis-à-vis des agents de lutte biologique *in vivo*

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
ALG3 vs. ALG66	-17,42	-43,55 to 8,712	No	ns	0,4889
ALG3 vs. ALG75	13,08	-13,05 to 39,21	No	ns	0,8321
ALG3 vs. ALG116	-14,67	-40,80 to 11,46	No	ns	0,7195
ALG3 vs. ALG227	2,000	-24,13 to 28,13	No	ns	>0,9999
ALG3 vs. ALG230	34,50	8,372 to 60,63	Yes	**	0,0018
ALG3 vs. ALG232	42,33	14,11 to 70,56	Yes	***	0,0002
ALG3 vs. ALG240	-10,58	-36,71 to 15,55	No	ns	0,9476
ALG3 vs. ALG243	30,92	4,788 to 57,05	Yes	**	0,0083
ALG3 vs. NHne1	-8,833	-34,96 to 17,30	No	ns	0,9838
ALG66 vs. ALG75	30,50	4,372 to 56,63	Yes	**	0,0098
ALG66 vs. ALG116	2,750	-23,38 to 28,88	No	ns	>0,9999
ALG66 vs. ALG227	19,42	-6,712 to 45,55	No	ns	0,3315
ALG66 vs. ALG230	51,92	25,79 to 78,05	Yes	****	<0,0001
ALG66 vs. ALG232	59,75	31,53 to 87,97	Yes	****	<0,0001
ALG66 vs. ALG240	6,833	-19,30 to 32,96	No	ns	0,9975
ALG66 vs. ALG243	48,33	22,20 to 74,46	Yes	****	<0,0001
ALG66 vs. NHne1	8,583	-17,55 to 34,71	No	ns	0,9867
ALG75 vs. ALG116	-27,75	-53,88 to -1,622	Yes	*	0,0282
ALG75 vs. ALG227	-11,08	-37,21 to 15,05	No	ns	0,9310
ALG75 vs. ALG230	21,42	-4,712 to 47,55	No	ns	0,2062
ALG75 vs. ALG232	29,25	1,028 to 57,47	Yes	*	0,0359
ALG75 vs. ALG240	-23,67	-49,80 to 2,462	No	ns	0,1101
ALG75 vs. ALG243	17,83	-8,295 to 43,96	No	ns	0,4542
ALG75 vs. NHne1	-21,92	-48,05 to 4,212	No	ns	0,1809
ALG116 vs. ALG227	16,67	-9,462 to 42,80	No	ns	0,5527
ALG116 vs. ALG230	49,17	23,04 to 75,30	Yes	****	<0,0001
ALG116 vs. ALG232	57,00	28,78 to 85,22	Yes	****	<0,0001
ALG116 vs. ALG240	4,083	-22,05 to 30,21	No	ns	>0,9999
ALG116 vs. ALG243	45,58	19,45 to 71,71	Yes	****	<0,0001
ALG116 vs. NHne1	5,833	-20,30 to 31,96	No	ns	0,9993
ALG227 vs. ALG230	32,50	6,372 to 58,63	Yes	**	0,0043
ALG227 vs. ALG232	40,33	12,11 to 68,56	Yes	***	0,0005
ALG227 vs. ALG240	-12,58	-38,71 to 13,55	No	ns	0,8617
ALG227 vs. ALG243	28,92	2,788 to 55,05	Yes	*	0,0183
ALG227 vs. NHne1	-10,83	-36,96 to 15,30	No	ns	0,9397
ALG230 vs. ALG232	7,833	-20,39 to 36,06	No	ns	0,9961
ALG230 vs. ALG240	-45,08	-71,21 to -18,95	Yes	****	<0,0001
ALG230 vs. ALG243	-3,583	-29,71 to 22,55	No	ns	>0,9999
ALG230 vs. NHne1	-43,33	-69,46 to -17,20	Yes	****	<0,0001
ALG232 vs. ALG240	-52,92	-81,14 to -24,69	Yes	****	<0,0001
ALG232 vs. ALG243	-11,42	-39,64 to 16,81	No	ns	0,9480
ALG232 vs. NHne1	-51,17	-79,39 to -22,94	Yes	****	<0,0001
ALG240 vs. ALG243	41,50	15,37 to 67,63	Yes	****	<0,0001
ALG240 vs. NHne1	1,750	-24,38 to 27,88	No	ns	>0,9999
ALG243 vs. NHne1	-39,75	-65,88 to -13,62	Yes	***	0,0002

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
ALG3 vs. ALG66	60,92	78,33	-17,42	8,049	12	12	3,060	88,00
ALG3 vs. ALG75	60,92	47,83	13,08	8,049	12	12	2,299	88,00
ALG3 vs. ALG116	60,92	75,58	-14,67	8,049	12	12	2,577	88,00
ALG3 vs. ALG227	60,92	58,92	2,000	8,049	12	12	0,3514	88,00
ALG3 vs. ALG230	60,92	26,42	34,50	8,049	12	12	6,062	88,00
ALG3 vs. ALG232	60,92	18,58	42,33	8,694	12	10	6,886	88,00
ALG3 vs. ALG240	60,92	71,50	-10,58	8,049	12	12	1,860	88,00
ALG3 vs. ALG243	60,92	30,00	30,92	8,049	12	12	5,432	88,00
ALG3 vs. NHne1	60,92	69,75	-8,833	8,049	12	12	1,552	88,00
ALG66 vs. ALG75	78,33	47,83	30,50	8,049	12	12	5,359	88,00
ALG66 vs. ALG116	78,33	75,58	2,750	8,049	12	12	0,4832	88,00
ALG66 vs. ALG227	78,33	58,92	19,42	8,049	12	12	3,412	88,00
ALG66 vs. ALG230	78,33	26,42	51,92	8,049	12	12	9,122	88,00
ALG66 vs. ALG232	78,33	18,58	59,75	8,694	12	10	9,720	88,00
ALG66 vs. ALG240	78,33	71,50	6,833	8,049	12	12	1,201	88,00
ALG66 vs. ALG243	78,33	30,00	48,33	8,049	12	12	8,492	88,00
ALG66 vs. NHne1	78,33	69,75	8,583	8,049	12	12	1,508	88,00
ALG75 vs. ALG116	47,83	75,58	-27,75	8,049	12	12	4,876	88,00
ALG75 vs. ALG227	47,83	58,92	-11,08	8,049	12	12	1,947	88,00
ALG75 vs. ALG230	47,83	26,42	21,42	8,049	12	12	3,763	88,00
ALG75 vs. ALG232	47,83	18,58	29,25	8,694	12	10	4,758	88,00
ALG75 vs. ALG240	47,83	71,50	-23,67	8,049	12	12	4,158	88,00
ALG75 vs. ALG243	47,83	30,00	17,83	8,049	12	12	3,133	88,00
ALG75 vs. NHne1	47,83	69,75	-21,92	8,049	12	12	3,851	88,00
ALG116 vs. ALG227	75,58	58,92	16,67	8,049	12	12	2,928	88,00
ALG116 vs. ALG230	75,58	26,42	49,17	8,049	12	12	8,639	88,00
ALG116 vs. ALG232	75,58	18,58	57,00	8,694	12	10	9,272	88,00
ALG116 vs. ALG240	75,58	71,50	4,083	8,049	12	12	0,7175	88,00
ALG116 vs. ALG243	75,58	30,00	45,58	8,049	12	12	8,009	88,00
ALG116 vs. NHne1	75,58	69,75	5,833	8,049	12	12	1,025	88,00
ALG227 vs. ALG230	58,92	26,42	32,50	8,049	12	12	5,710	88,00
ALG227 vs. ALG232	58,92	18,58	40,33	8,694	12	10	6,561	88,00
ALG227 vs. ALG240	58,92	71,50	-12,58	8,049	12	12	2,211	88,00
ALG227 vs. ALG243	58,92	30,00	28,92	8,049	12	12	5,081	88,00
ALG227 vs. NHne1	58,92	69,75	-10,83	8,049	12	12	1,903	88,00
ALG230 vs. ALG232	26,42	18,58	7,833	8,694	12	10	1,274	88,00
ALG230 vs. ALG240	26,42	71,50	-45,08	8,049	12	12	7,921	88,00
ALG230 vs. ALG243	26,42	30,00	-3,583	8,049	12	12	0,6296	88,00
ALG230 vs. NHne1	26,42	69,75	-43,33	8,049	12	12	7,614	88,00
ALG232 vs. ALG240	18,58	71,50	-52,92	8,694	10	12	8,608	88,00
ALG232 vs. ALG243	18,58	30,00	-11,42	8,694	10	12	1,857	88,00
ALG232 vs. NHne1	18,58	69,75	-51,17	8,694	10	12	8,323	88,00
ALG240 vs. ALG243	71,50	30,00	41,50	8,049	12	12	7,292	88,00
ALG240 vs. NHne1	71,50	69,75	1,750	8,049	12	12	0,3075	88,00
ALG243 vs. NHne1	30,00	69,75	-39,75	8,049	12	12	6,984	88,00



## Résumé

*Botrytis cinerea* est responsable de la pourriture grise, maladie très importante des cultures. Différentes stratégies sont ainsi déployées pour lutter contre cette maladie, bien que ces méthodes donnent une certaine efficacité, elles comportent aussi des inconvénients et la durabilité de leur efficacité se voit menacée à l'instar de qui se passe avec la lutte chimique. La durabilité de la lutte biologique qui constitue une bonne alternative aux produits chimiques n'est quant à elle pas bien étudiée. Ce travail a pour objectif d'évaluer l'effet de deux agents de lutte biologique (*Bacillus methylotrophicus* T29 et *Bacillus sp* LK) à l'égard de dix souches de *B. cinerea* *in vitro* à différents stades de développement du champignon (croissance mycélienne, sporulation et germination des spores) mais aussi *in vivo* sur feuille laitue. Les résultats ont montré une bonne efficacité des bactéries testées *in vitro* pour limiter le développement des différentes souches fongiques testées, avec des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne variables allant de 64 à 86,33% pour le test de confrontation directe et de 0 à 63,5% pour le test de confrontation indirecte. La germination des spores de *B. cinerea* a été inhibée mais de manière variable en fonction des souches fongiques de 15 à 91%. Les pourcentages d'inhibition de la sporulation varient quant à eux de 6 à 100%. En revanche, l'efficacité *in vivo* des bactéries testées à l'égard des champignons n'a pas été mise en évidence dans cette étude. La diversité de sensibilité des souches de *B. cinerea* à l'égard des agents de lutte biologiques testés souligne l'importance de considérer plusieurs souches du pathogène et d'étudier la stabilité de l'efficacité de ces produits biologiques à long terme.

**Mots clés :** Agent de lutte biologique, *B. cinerea*, durabilité, diversité, croissance mycélienne, sporulation, germination, agressivité

## Abstract

*Botrytis cinerea* is responsible for gray mould, a very important crop disease. Different strategies are thus deployed to fight against this disease, although these methods give a certain effectiveness, they also have drawbacks and the sustainability of their effectiveness is threatened, as happens with chemical control. The sustainability of biological control, which constitutes a good alternative to chemical products, is not well studied. This work aims to evaluate the effect of two biological control agents (*Bacillus methylotrophicus* T29 and *Bacillus sp* LK) against ten strains of *B. cinerea* *in vitro* at different stages of development of the fungus (mycelial growth, sporulation and germination of spores) but also *in vivo* on lettuce leaves. The results showed good efficacy of the bacteria tested *in vitro* in limiting the development of the different fungal strains tested, with variable mycelial growth inhibition percentages ranging from 64 to 86, 33% for the direct confrontation test and from 0 to 63,5% for the indirect confrontation test. The germination of *B. cinerea* spores was inhibited but in a variable way depending on the fungal strains (between 15 to 91%). The percentages of inhibition of sporulation vary from 6 to 100%. On the other hand, the *in vivo* efficacy of the bacteria tested against fungi was not demonstrated in this study. The diversity of susceptibility of *B. cinerea* strains to the biological control agents tested underlines the importance of considering several strains of the pathogen and of studying the stability of the efficacy of these biological products in the long term.

**Keywords:** Biological control, *B. cinerea*, sustainability, diversity, mycelial growth, sporulation and germination of spores