

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA - Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie



Mémoire présenté par

HAFIR Houa & IDER Narimene

En vue de l'obtention du diplôme de

Master en Ecologie Microbienne et Environnement

Soutenu le 10 Juin 2013

THEME

Etude de la variabilité de deux populations de *Botrytis cinerea* vis-à-vis de la résistance au fenhexamid et de l'agressivité.

Devant le jury :

Président : Mr NABTI El Hafid
Promoteur : Mr AISSAT Kamel
Co-promoteur : Mr ADJEBLI Ahmed
Examineur : Mr KECHA Mouloud
Examinatrice : Mme OUANAS Souhila



Promotion 2013



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

Nous adressons nos vifs remerciements à notre très respectueux promoteur, Mr K. AISSAT qui nous a comblés avec son sérieux.

A Mr ADJEBLI Ahmed, Doctorant au sein de l'université ABDERRAHMANE MIRA - Bejaia, de nous avoir fourni une très utile documentation et qui a répondu à nos courriers avec soin et sérieux, de nous avoir aidé et orienté du mieux qu'il pouvait, qu'il retrouve ici notre sincère reconnaissance.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire de mycologie pour leurs orientations et leurs conseils.

A Mr H. NABTI de nous avoir fait l'honneur de présider le jury

Nous remercions Mr KECHA et M^{me} OUANAS d'avoir accepté d'examiner notre travail

Nous remercions également, Mr K. IDER, M^{lle} D. MANSOURI et M^{lle} N. OUKALA Pour leur précieuse aide

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

MERCI A TOUS



Dédicaces

Ce modeste mémoire est dédié avant tous, à mes chers parents, qui m'ont donné le savoir, le respect et la confiance en soi. Pour leurs encouragements, et leur soutien tout au long de mon parcours scolaire.

Grand merci

A mon grand frère Halim, à qui j'adresse mes remerciements, et à qui je souhaite un bon parcours professionnel

A mes frères Hakim et Hanin, à qui je souhaite une longue vie, succès et bonheur,

A ma collègue, et ma meilleure amie, Nanou, avec qui j'ai eu le plaisir de partager le travail, et qui m'a donné beaucoup de soutien et de compréhension.

A Bassou, Touta, Rédi, Siphou, wiwel et Rachid avec qui j'ai passé des moments de joie et qui m'ont enseigné la vraie valeur de l'amitié

A toute la promotion master II écologie microbienne et environnement

Houa



Dédicaces

Ce modeste mémoire est dédié avant tous, à mes chers parents, qui m'ont donné le savoir, le respect et la confiance en soi. Pour leurs encouragements, et leur soutien tout au long de mon parcours scolaire.

Grand merci

A ma sœur adorée Besma, à qui j'adresse mes remerciements, et à qui je souhaite un bon parcours professionnel

A mon petit frère Rami Kamel, a qui je souhaite une longue vie, succès et bonheur,

A ma binôme, et ma meilleure amie, Houa, avec qui j'ai eu le plaisir de partager le travail, et qui ma donner beaucoup de soutien et de compréhension.

A Radus, meriem, Rédi, Siphou, wiwel, chouchou et Djallel avec qui j'ai passé des moments de joie et qui m'ont enseigné la vraie valeur de l'amitié

A toute la promotion master II d'écologie microbienne et environnement

Narimene

Liste des figures

Figure 01 : observation sous microscope de conidiophores de <i>Botrytis cinerea</i> , portant à leurs extrémités des conidies.....	02
Figure 02 : Sclérotés de <i>Botrytis cinerea</i> observées sur milieu PDA, aux conditions de laboratoire.....	03
Figure 03 : symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par <i>Botrytis cinerea</i> . Sur différentes plantes et des organes	04
Figure 04 : Cycle de développement (production asexuée) de <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes cultures	06
Figure 05 : Apothécies de <i>Botryotinia fuckeliana</i> la téléomorphe de <i>Botrytis cinerea</i>	07
Figure 06 : Préparation des lames	14
Figure 07 : Préparation des folioles de tomate dans les boites.....	16
Figure 08 : préparation des pommes dans les boites	17
Figure 09 : Mesure de la nécrose sur pomme.....	17
Figure 10 : résistance de la croissance mycélienne des groupes de <i>Botrytis</i> au Fenhexamid	21
Figure 11 : Résistance de la sporulation des groupes de <i>Botrytis</i> au Fenhexamid	22
Figure 12 : Résistance de la germination des spores des groupes de <i>Botrytis</i> au Fenhexamid	23
Figure 13 : Formation de nécroses autour des points d'infection d'une souche de <i>Botrytis cinerea</i>	26
Figure 14 : Agressivité de souches de <i>B. cinerea</i> sur folioles de tomate	26
Figure 15 : Formation de nécroses autour des points d'infection d'une souche de <i>Botrytis cinerea</i>	28
Figure 16 : Agressivité de souches de <i>B. cinerea</i> sur feuilles détachées de laitue.....	28
Figure 17 : Formation de nécroses autour des points d'infection d'une souche de <i>Botrytis cinerea</i>	30
Figure 18 : Agressivité de souches de <i>B. cinerea</i> sur pommes entières	30

Liste des tableaux

Tableau 01 : les souches de <i>Botrytis cinerea</i> étudiées	11
Tableau 02 : Classification morphotypique des souches de <i>B. cinerea</i> sur milieu MA.....	12
Tableau 03 : Résultats de la Classification phénotypique des souches de « Groupe I » sur gélose à extrait de malt et PDA	19
Tableau 04 : Résultats de la Classification phénotypique des souches de « Groupe II » sur gélose à extrait de malt et PDA.....	20
Tableau 05 : Classement des groupes selon les valeurs de la résistance de la croissance du mycélium des souches testées, obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%	22
Tableau 06 : Classement des groupes selon les valeurs de la résistance de la sporulation des souches testées, obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95% .	23
Tableau 07 : Classement des groupes selon les valeurs de la résistance de la germination de spore des souches testées, obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.....	24
Tableau 08 : Classement des groupes selon les valeurs moyennes d'AUDPC de l'agressivité des souches testées sur tomate obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.	27
Tableau 09 : Classement des groupes selon les valeurs moyennes d'AUDPC de l'agressivité des souches testées sur laitue obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.	29
Tableau 10 : Classement des groupes selon les valeurs moyennes d'AUDPC de l'agressivité des souches testées sur pommes obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.	31

Liste des annexes

Annexe I: Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0.

Liste des abréviations

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphisms

Alg : Algérie.

AUDPC : Area Under the Disease Progress Curves

BC : *Botrytis cinerea*.

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisms

Glossaire

Glossaire

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

Amorce : Oligonucléotide qui, hybridé avec une matrice d'acide nucléique, permet à une enzyme polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire.

Anamorphe : Forme asexuée d'un champignon, appelé aussi « stade imparfait », aboutissant à la formation de conidies.

Apothécies : Structure en forme de disque ou de trompette sur laquelle se forment des ascospores chez les ascomycètes.

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

Ascospores : Spore issue de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes, se formant à l'intérieur d'un asque.

AUDPC : la surface sous la courbe de la régression de la maladie est un résumé quantitatif de l'intensité de la maladie au fil du temps, à titre de comparaison sur plusieurs années ou plusieurs endroits.

Chancre : Lésion nécrotique plus ou moins localisée.

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

Conidiophore : Hyphe spécialisé sur lequel se forment une ou plusieurs conidies.

Epidémiologie : Etude de l'apparition, du développement et de la dispersion d'une maladie en relation avec l'environnement.

IC50 : La concentration inhibitrice maximale moitié est une mesure de l'efficacité d'un composé à fonction biologique ou biochimique d'inhibition. Cette mesure quantitative indique combien d'un médicament ou autre substance (inhibiteur) est nécessaire pour inhiber un processus biologique donné.

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

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

Microsatellite : Séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétition fait d'une à six paires de base.

Morphotype : Appelé aussi « type morphologique », est la forme courante et classique d'une espèce.

Mycélium : Partie végétative des champignons composée d'un ensemble de filaments.

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

Polyphage : Un pathogène pouvant avoir plusieurs organismes hôtes.

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

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

Souche : Isolat caractérisé (génétiquement ou phénotypiquement).

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

Virulence : Une composante qualitative du pouvoir pathogène, qui présente la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte donné et à causer une maladie.

Introduction

Le nom *Botrytis cinerea* a été donné par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la vigne. Depuis sa découverte, la pourriture grise causée par un champignon *Botrytis cinerea* provoque l'une des maladies cryptogamiques les plus destructives qui cause d'énormes dégâts en agriculture jusqu'à nos jours. Elle est économiquement redoutable et importante, car ce champignon attaque une importante gamme d'espèces de plantes. Sur cultures maraîchères, en pré- ou en post-récolte, elle conduit à des pertes considérables de rendement. On ajoute aussi le fait qu'il développe des phénomènes de résistance à plusieurs familles de fongicides et une spécificité d'hôte variable dus à sa nature multi-nucléée. Cette capacité d'adaptation de *Botrytis cinerea* fait le sujet de nombreuses études. (Leroux *et al.*, 1999).

L'étude génétique récente a révélé l'apparition de deux groupes de *Botrytis cinerea*, groupe I « *pseudocinerea* » et groupe II « *Botrytis cinerea* » qui présente une variabilité génétique prouvée avec l'utilisation de marqueurs moléculaires et microsatellites. Le présent travail constitue une partie d'un projet de recherche sur les deux groupes et consiste à vérifier les hypothèses suivantes :

- Le niveau d'agressivité des deux groupes de *Botrytis cinerea* est-il identique ou différent sur ces différentes plantes hôte? Lequel d'entre eux est plus agressif ?
- La résistance des deux groupes de *Botrytis cinerea* est-elle la même face au fongicide, fenhexamid ?

Pour atteindre cet objectif :

- des tests d'agressivité ont été réalisés sur trois plantes hôtes : feuilles détachées de laitue, folioles de tomate et pomme entière ; afin de déterminer si les deux groupes de *Botrytis cinerea* pris de la collection du laboratoire de mycologie à l'université d'Abderrahmane Mira inoculés présenteront une différence d'agressivité selon leur plante hôte.
- Une autre étude a été entreprise sur la résistance des deux groupes de *Botrytis cinerea* à un fongicide, fenhexamid et son influence sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores.

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste de figures

Liste de tableaux

Glossaire

Liste des abréviations

Introduction 01

Synthèse bibliographique

I. Présentation générales de <i>Botrytis cinerea</i>	
1. Description de la pourriture grise.....	02
2. Taxonomie.....	03
3. Spectre d'hôte et importance économique	03
4. Symptômes.....	04
5. Cycle de vie et épidémiologie	05
II. Variabilité de <i>Botrytis cinerea</i>	
1. Diversité phénotypique	
a. Caractère morphotype	07
b. Agressivité	07
c. Résistance aux fongicides	08
2. Diversité génétique.....	08
III. Résistance de <i>Botrytis cinerea</i> aux fongicides.....	09

Matériel et méthodes

I. Présentation du matériel fongique.....	11
II. Caractérisation morphotype des souches de <i>Botrytis cinerea</i>	11
III. Test de résistance au fongicide fenhexamid.....	12
1. Effet de fenhexamid sur la croissance mycélienne	12
2. Effet de fenhexamid sur la sporulation	13
3. Effet de fenhexamid sur la germination	14
IV. Test d'agressivité des souches de <i>Botrytis cinerea</i>	
1. Test d'agressivité sur tomate et laitue.....	15
2. Test d'agressivité sur pomme.....	17
V. Analyse statistique	18

Résultats et discussions

I. Caractérisation morphotype des souches de <i>Botrytis cinerea</i>	19
II. Etude de la résistance des souches de <i>Botrytis cinerea</i> au fenhexamid	
1. Effet de fenhexamid sur la croissance mycélienne	21
2. Effet de fenhexamid sur la sporulation	22
3. Effet de fenhexamid sur la germination	23
4. Discussion	24
III. Etude de l'agressivité des souches de <i>Botrytis cinerea</i>	25
1. Test sur tomate	25
2. Test sur laitue	27
3. Test sur pommes	29
4. Discussion	31
 <i>Conclusion</i>	 33
<i>Références bibliographiques</i>	34
<i>Annexes</i>	37

Introduction

Introduction

Le nom *Botrytis cinerea* a été donné par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la vigne. Depuis sa découverte, la pourriture grise causée par un champignon *Botrytis cinerea* provoque l'une des maladies cryptogamiques les plus destructives qui cause d'énormes dégâts en agriculture jusqu'à nos jours. Elle est économiquement redoutable et importante, car ce champignon attaque une importante gamme d'espèces de plantes. Sur cultures maraîchères, en pré- ou en post-récolte, elle conduit à des pertes considérables de rendement. On ajoute aussi le fait qu'il développe des phénomènes de résistance à plusieurs familles de fongicides et une spécificité d'hôte variable dus à sa nature multi-nucléée. Cette capacité d'adaptation de *Botrytis cinerea* fait le sujet de nombreuses études.

L'étude génétique récente a révélé l'apparition de deux groupes de *Botrytis cinerea*, groupe I « *pseudocinerea* » et groupe II « *Botrytis cinerea* » qui présente une variabilité génétique prouvée avec l'utilisation de marqueurs moléculaires et microsatellites. Le présent travail constitue une partie d'un projet de recherche sur les deux groupes et consiste à vérifier les hypothèses suivantes :

- Le niveau d'agressivité des deux groupes de *Botrytis cinerea* est-il identique ou différent sur ces différentes plantes hôte? Lequel d'entre eux est plus agressif ?
- La résistance des deux groupes de *Botrytis cinerea* est-elle la même face au fongicide, fenhexamid ?

Pour atteindre cet objectif :

- des tests d'agressivité ont été réalisés sur trois plantes hôtes : feuilles détachées de laitue, folioles de tomate et pomme entière ; afin de déterminer si les deux groupes de *Botrytis cinerea* pris de la collection du laboratoire de mycologie à l'université d'Abderrahmane Mira inoculés présenteront une différence d'agressivité selon leur plante hôte.
- Une autre étude a été entreprise sur la résistance des deux groupes de *Botrytis cinerea* à un fongicide, fenhexamid et son influence sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores.

Synthèse bibliographique

I. Présentation générale de *Botrytis cinerea*

1. Description de la pourriture grise

Botrytis cinerea est un champignon causant des maladies sur végétaux, polyphage et provoque des mortifications des tissus végétaux appelées nécrose affectant les organes aériens et fruits de plantes (Blancard, 2009). C'est un champignon à plusieurs plantes hôtes capable d'attaquer plus de 230 espèces (Pande *et al.*, 2001). Responsable de la pourriture grise ; Cette maladie se développe plus facilement dans certaines circonstances liées aux conditions climatiques, à la sensibilité de la plante elle-même et aux facteurs culturaux. (Blancard, 2009).

L'agent pathogène, *Botrytis cinerea* produit un mycélium à filaments articulés, brunâtres ou olivâtres, quelque-fois cylindrique au niveau de la cloison médiane dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est au stade fructigène, il produit des touffes de conidiophores grisâtres, ramifiés arrondis contenant des grappes de conidies [Figure 01] qui sont libérées facilement par temps humide et sont portées par courants d'air. Le champignon produit des sclérotes irréguliers qui jouent un rôle important dans la survie du champignon ; ils se composent de deux parties différentes : le cortex et la médulla. (Holz *et al.*, 2004).



Figure 01 : observation sous microscope de conidiophores de *Botrytis cinerea*, portant à leurs extrémités des conidies. (Bryon, 2011)



Figure 02 : Sclérotos de *Botrytis cinerea* observés sur milieu PDA, en conditions de laboratoire. (Bryon, 2011)

2. Taxonomie

Botrytis cinerea connaît une double classification selon la forme sous laquelle il se reproduit : (Chardonnet *et al.*, 2000 ; Staats *et al.*, 2005)

- forme asexuée : *Botrytis cinerea* (anamorphe), appartenant à la classe des Hyphomycète, ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae.
- forme sexuée : *Botryotinia fuckeliana* (téléomorphe), appartenant à la classe des Discomycètes, ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.

3. Spectre d'hôte et importance économique

Botrytis cinerea ; plus souvent appelé agent de la pourriture grise ; attaque à travers le monde un nombre étendu de cultures fruitières, légumières et ornementales (Shtienberg *et al.*, 1998), aussi bien en plein champ et sous serre qu'après récolte, durant le stockage et le transport des produits (Fukumori *et al.*, 2004). Le risque d'infection est considérablement augmenté chez la culture de plantes hors saison, sous serres et sous tunnels plastiques, afin de produire davantage de fruits, de légumes, d'herbes et de fleurs particulièrement chez la tomate, le concombre et le poivron (Williamson *et al.*, 2007).

Dans les cultures fruitières, il serait responsable de pertes économiques considérables s'élevant à environ deux milliards de dollars par an (Valdès-Gómez *et al.*, 2008). *Botrytis cinerea* est devenu également un problème d'une grande importance pour les articles stockés tels les kiwis, les pommes et les poires. De la même façon, l'important commerce des fleurs coupées est très touché par cet agent pathogène et tout particulièrement les fleurs de rose et de gerbera (Williamson *et al.*, 2007).

4. Symptômes

Botrytis cinerea est responsable de la pourriture grise. Il s'attaque aux fleurs, aux pédoncules et aux fruits à toutes les étapes de leur croissance, entraînant ainsi leur pourriture et la formation d'une couche uniforme de matière soyeuse épaisse et grise qui abrite les spores. (Agrios, 2005). [Figure 03]

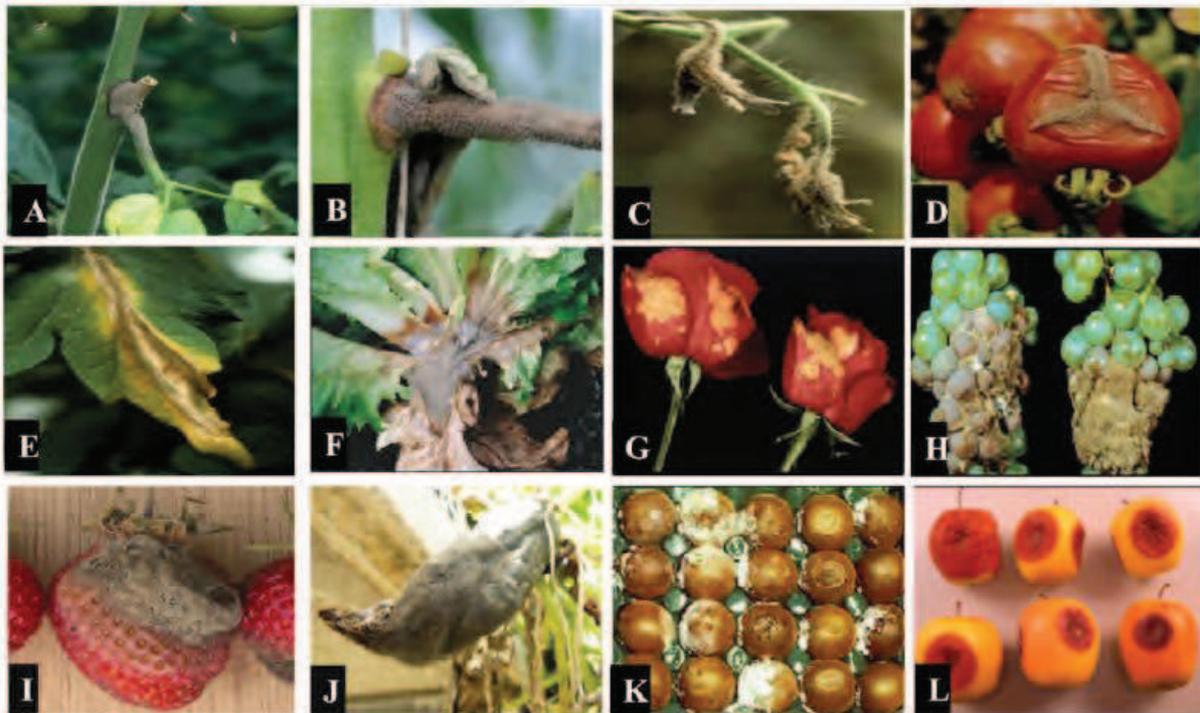


Figure 03 : symptômes de la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. sur différentes plantes et des organes. (A) Plaie d'ébourgeonnage sur tomate.(B) Tige de tomate. (C) Inflorescence. (D) Fruit de tomate. (E) Feuille de tomate. (F) Laitue. (G) Fleurs du rosier. (H) Grappe du raisin. (I) Fraise. (J) Poivron. (K) Kiwi. (L) Pomme (Agrios, 2005).

Pour de nombreux fruits et légumes, l'infection débute habituellement sur des fleurs affaiblies puis la pourriture se propage jusqu'à atteindre les fruits adjacents en formation, sur les pétales de fleurs, les symptômes varient de petites tâches à une décomposition généralisée, selon les conditions environnementales (Williamson *et al.*, 2007). Le processus se propage au pédoncule qui pourrit les bourgeons puis avance jusqu'à la destruction totale du fruit. Par conséquent, la tige pourrie devient succulente et molle. En conditions humides, les chancres sont recouverts d'un duvet mycélien sporulant provoquant ainsi la mort de la plante (Agrios, 2005).

5. Cycle de vie et épidémiologie

Le processus infectieux de *Botrytis cinerea* se décompose en plusieurs étapes [figure04] : la pénétration de la plante hôte, la formation de lésions primaires, l'expansion des lésions et la macération des tissus puis la sporulation (Agrios, 2005). Pendant les périodes d'hiver, *Botrytis cinerea* se développe dans le sol sous forme de mycélium dans les débris végétaux et sous sa forme de conservation sclérote, qui est considéré chez *Botrytis* comme étant l'inoculum principalement produit et dispersé (Holz *et al.*, 2004). Le champignon ne semble pas infecter les graines, mais il peut se propager avec semences contaminées par sclérotés ou avec des morceaux de débris végétaux infectés par le champignon. Le champignon nécessite des milieux frais (18-23 ° C) et humides pour une meilleure croissance, sporulation, libération et la germination des spores, et mise en place d'infection (Agrios, 2005).

Les spores germées pénètrent dans les tissus par les blessures dans la plante hôte et produit un mycélium sur les vieux pétales de fleurs, feuillages mourants et tige. *Botrytis cinerea* germe habituellement en produisant des filaments mycéliens qui peuvent infecter directement les plantes. Mais dans quelques cas il germe en produisant des apothécies et ascospores (Agrios, 2005).

Botrytis cinerea se reproduit majoritairement par la voie asexuée. Des spores sont produites en grande quantité par mitose, jusqu'à plusieurs millions par cm² (Nicot et Baille, 1996). Lorsque les conditions environnementales sont particulièrement défavorables au champignon, un autre type de spores est produit, les micro-conidies. Elles interviennent dans le processus de reproduction sexuée en permettant la fécondation des sclérotés. Suite à une exposition prolongée au froid, les sclérotés fécondés produisent des structures sexuées

nommées apothécies (Messiaen *et al.*, 1991) [figure 05]. Ces organes de fructifications libèrent par la suite des asques contenant huit ascospores binucléées (Williamson *et al.*, 2007).

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

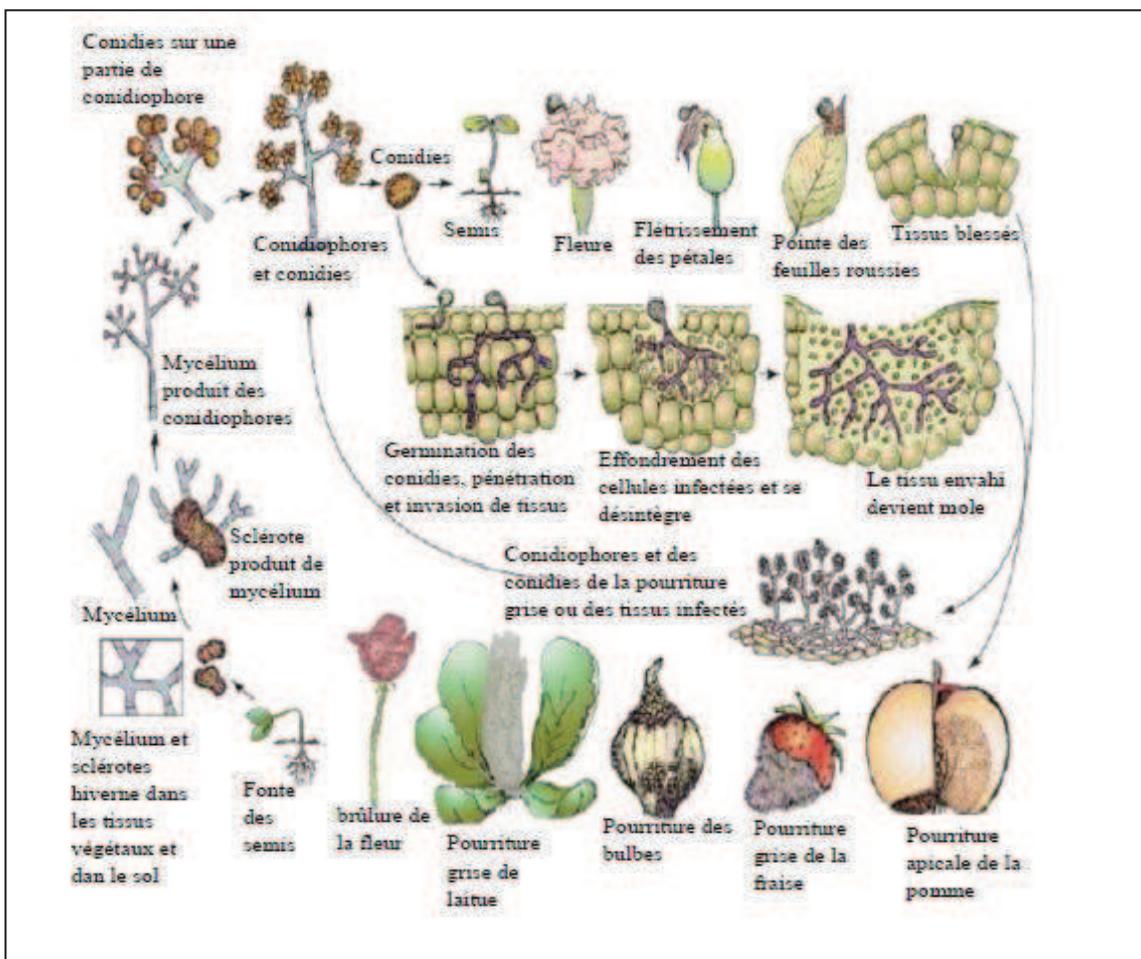


Figure 04 : Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (Agrios, 2005)



Figure 05 : Apothécies de *Botryotinia fuckeliana* la téléomorphe de *Botrytis cinerea* isolées sur une pêche en Nouvelle-Zélande (à gauche et au centre). Groupe d'apothécies produit en laboratoire (à droite). (Beever and Weeds, 2004)

II. Variabilité de *Botrytis cinerea*

1. Diversité phénotypique

De nombreuses études ont montré que ce champignon présente une grande variabilité phénotypique est principalement basée sur des différences de morphologie des colonies, la croissance du mycélium, l'intensité de la sporulation, la virulence, la production d'enzymes et de la résistance aux fongicides (Kuzmanovska *et al.*, 2012).

a. Caractère morphotype

Botrytis cinerea se caractérise par une grande variabilité phénotypique. Pour cette seule espèce, huit types morphologiques ont été déterminés par classification visuelle de la sporulation dont quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre sclérotiens (Martinez *et al.*, 2003). Ces morphotypes sont interprétés comme des adaptations des souches à l'écosystème ou au climat dans lequel elles ont été prélevées [Tableau 01].

b. Agressivité

La variabilité phénotypique se manifeste également dans l'agressivité des souches. C'est-à-dire que le caractère morphologique est en relation directe entre l'agressivité et la spécificité ou le choix d'hôte (Fournier, 2008).

L'ensemble des souches de *Botrytis cinerea* ne présentent pas le même degré d'agressivité sur une même plante hôte (Decognet *et al.*, 2009). En outre, *Botrytis cinerea* cause un éventail d'infection de la plus bénigne à la plus agressive et de la plus locale à la plus étendue (Williamson *et al.*, 1995). Un phénomène d'infection « non agressive » au cours de laquelle *Botrytis cinerea* est présent sur la plante hôte mais qui ne cause pas de dommage et ceci a été observé sur plusieurs hôtes (Williamson, 1994).

c. Résistance aux fongicides

Diverses études ont mis en évidence des niveaux différents de résistance aux fongicides dans les populations naturelles de *B. cinerea* (Yourman *et al.*, 2001). L'inefficacité du traitement chimique est généralement attribuée à l'apparition de souches résistantes. Leur maintien paraît lié à leur capacité à survivre dans les conditions naturelles et à entrer en compétition avec les souches sensibles en terme de potentiel d'infection, de sporulation ou encore de dissémination. (Leroux *et al.*, 2002).

2. Diversité génétique

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

Ce champignon serait en fait un complexe d'espèces pouvant être divisé en deux groupes distingués par la différenciation moléculaire et génétique ; plus exactement basé sur la présence ou l'absence de deux éléments transposables « Boty » et « Flipper ».

Les souches transposa porte « Boty » et « Flipper » ; tandis que ces deux éléments sont absents chez *vacuina*. Ces deux éléments sont utilisés pour caractériser les deux populations de *Botrytis cinerea* dans le monde entier. Le stricto sensu *Botrytis cinerea* c'est l'espèce prédominante également distinguée sous le nom du groupe II qui inclut les souches de « *vacuina* » et « *transposa* » ; les autres espèces connues sous le nom du groupe I qui inclut les souches de « *vacuina* » seulement, ce groupe I aussi ont également montré une résistance naturel au fenhexamid et qui possède le génotype HydR1 (Leroux *et al.*, 1999).

III. Résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides

La pourriture grise conduit couramment à des pertes économiques graves. La lutte chimique définie par l'utilisation de fongicides pour résoudre, décroître ou se débarrasser du champignon pathogène reste donc le primordial moyen pour diminuer l'impact de cette maladie sur les cultures majeures (Leroux *et al.*, 2002).

Cinq groupes de fongicides synthétiques sont définis et ordonnés selon leurs modes d'action biochimique sur le pathogène, les fongicides destinant : la respiration, le fonctionnement des microtubules, l'osmorégulation, la biosynthèse de méthionine et la biosynthèse des stérols. (Leroux, 2007).

Les fongicides restent des dispositifs nécessaires pour la lutte contre *Botrytis cinerea* en pré- et post-récolte, mais plusieurs familles sont touchées par les phénomènes de résistance due à la mutation de la cible, détoxication de la substance fongitoxique ou due au phénomène de contournement génétique. La variabilité génétique de *Botrytis cinerea* lui a permis de s'accommoder à de nombreuses familles de fongicides. (Yourman *et al.*, 2001 ; Leroux, 2007). Au cours des 25 dernières années, *Botrytis cinerea* développe une résistance à presque tous les fongicides typiques utilisés pour contrôler la pourriture grise (Martinez *et al.*, 2003). Nombreux auteurs ont mis en évidence des niveaux distincts de ténacité aux fongicides dans les populations naturelles de *B. cinerea* (Raposo *et al.*, 2000). Le phénomène de résistance aux fongicides pourrait être une des raisons de la diversité de ce champignon. (Hmouni *et al.*, 2003).

➤ Résistance de *Botrytis cinerea* au fenhexamid

Le fenhexamid un nouveau fongicide à spectre étroit issu de la société Bayer, appartient à la famille inédite des hydroxyanilides et ne présente pas de résistances croisées avec les autres familles utilisées dans la lutte contre le *Botrytis*. Il est autorisé en France depuis octobre 2000. (Brillant & Sauzay, 2000). Ce fongicide est un inhibiteur de la biosynthèse des stérols, dont la cible est la 3-cétoreductase intervenant dans les étapes de C4-déméthylation des stérols. Ce qui permet alors d'ajouter une nouvelle classe d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols à usages agricoles, à côté notamment de ceux affectant la 14 α -déméthylation (Leroux, 2007).

Les deux populations de *Botrytis cinerea* sont aussi distinguées l'une de l'autre par rapport à leur résistance et sensibilité à ce fongicide prouvées par l'utilisation de PCR-RFLP qui a permis de diviser *Botrytis cinerea* en deux variétés; « transposa » qui porte deux éléments transposables « *Boty* » et « *Flipper* » actifs, et « vacuma » inactifs ou qui ne porte pas ces éléments transposables. (Leroux *et al.*, 2002).

Matériel et méthode

I. Présentation du matériel fongique

Les souches utilisées dans cette étude ont été obtenues de la collection du laboratoire de mycologie. Ces souches ont été isolées à Bejaïa par la technique monospore. Elles sont génotypiquement différentes l'une de l'autre. Cette différence est définie par les marqueurs microsatellites [Tableau 01].

Quatre souches de *Botrytis pseudo-cinerea* « Groupe I » : ALG 40, ALG 42, ALG 45, ALG 183 et quatre souche de *Botrytis cinerea* « Groupe II » : ALG 20, ALG 26, ALG 66, ALG 85.

Tableau 01 : les souches de *Botrytis cinerea* étudiées. (Adjebli ,thèse en cours)

Souches	MS1	MS2	MS5	MS9	MS10	MS3	MS4	MS6	MS7	Origine	A n	P
ALG_40	231	158	159	142	164	221	124	84	122	Tichy	2007	Tomate
ALG_42	215	156	159	142	172	203	124	84	118	Tichy	2007	Tomate
ALG_45	229	158	159	142	164	213	124	84	122	Tichy	2007	Tomate
ALG_183	235	158	159	148	186	213	124	84	118	Tichy	2008	Tomate
ALG_20	231	142	159	148	186	221	124	122	122	Baccaro	2007	Tomate
ALG_25	231	158	159	148	186	221	124	122	128	Baccaro	2007	Tomate
ALG_66	213	142	159	142	182	213	124	122	128	Souk El tenine	2007	Tomate
ALG_85	215	158	159	136	172	219	124	122	122	Merdj-ouamane	2008	Tomate

MS= Microsatellite

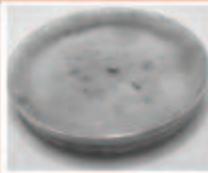
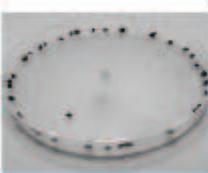
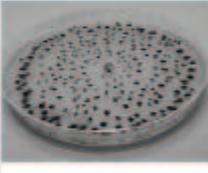
An= Année d'isolement

P = Plante hôte

II. Caractérisation morphotype des souches de *Botrytis cinerea*

Chaque souche a été cultivée dans des boîtes de Pétris contenant du milieu PDA et des boîtes de pétris contenant de la gélose à extrait de malt à 22° C à l'obscurité. Après 3 semaines, les observations phénotypiques sont réalisées sur la base de l'aspect du mycélium, sporulation et production de sclérotés. Huit différents types morphologiques sont définis: quatre mycélium (M1, M2, M3 et M4) et quatre sclérotés (S1, S2, S3 et S4). Les souches sont distribuées dans ces classes selon Martinez *et al.* (2003) [Tableau 02].

Tableau 02: Classification morphotypique des souches de *B. cinerea* sur milieu MA (Martinez *et al.*, 2003).

Type Mycélien "M"				
Présentation				
Phénotype	M 1	M2	M3	M4
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense
Sporulation	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés	0	0	0	0
Type Sclérotien "S"				
Présentation				
Phénotype	S1	S2	S3	S4
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant
Sporulation	1	1	1	0
Sclérotés	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillées	Nombreux, petits et éparpillés

Sporulation : 0: absence; 1: sporulation peu abondante; 2: sporulation très abondante.

Sclérotés : 0: absence; 1: rares; 2: très abondantes.

III. Test de résistance au fongicide, fenhexamid

1. Effet de fenhexamid sur la croissance mycélienne

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Leroux *et al.* (1999). 0,8mg /ml de fenhexamid a été mélangé avec 200 ml du milieu PDA (soit 0.4µg/ml, la dose discriminatoire permettant de déterminer la résistance ou la sensibilité des souches de *B. cinerea*). Un disque mycélien de 5mm a été prélevé d'une culture jeune âgée de 3 jours et déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant la dose discriminatoire puis les boîtes sont incubées à 22 °C.

La mesure du diamètre de croissance a été effectuée chaque jour sur deux diamètres perpendiculaires pendant quatre jours. Trois boîtes de Pétri sont utilisées pour chaque souche traitée avec le fenhexamid et le témoin. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne et celui de la résistance a été calculé selon les formules suivantes :

$$\% I = ((T - F)/T) \times 100$$

$$\% R = (F / T) \times 100$$

Avec :

T : Témoin.

F : Fongicide.

I : Inhibition.

R : Résistance.

2. Effet de fenhexamid sur la sporulation

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Leroux *et al.* (1999). A la fin du test d'effet du fenhexamid sur la croissance mycélienne, les boîtes ont été utilisées pour le test sur la sporulation après dix jours d'incubation. Un comptage des spores a été effectué pour chaque souche à l'aide d'une cellule de Malassez (Description de la cellule de Malassez voir annexe I).

1ml d'eau distillée stérile a été introduit dans chaque boîte de Pétri. La surface de la boîte a été raclée afin de récupérer une solution sporale dans un tube eppendorf. Chaque quadrillage de la cellule de Malassez a été rempli avec 17 µl de la suspension sporale. Les spores ont été comptées au microscope à l'objectif X10. La concentration de la suspension sporale de chaque souche ainsi que le pourcentage de résistance au fenhexamid ont été calculées selon les formules suivantes :

$$C = (N/V) \times f$$

$$\%RS = (Nsf/Nst) \times 100$$

Avec :

C : Concentration de la suspension en nombre de spores par ml.

N : Nombre total de spores comptées.

V : Volume total de comptage (en ml).

f : Facteur de dilution.

%RS: Pourcentage de résistance au fenhexamid.

Nsf : Nombre de spores des souches traitées.

Nst : Nombre de spore des souches témoins.

3. Effet de fenhexamid sur la germination

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Leroux *et al.* (1999). Un milieu eau gélosée est préparé à 15% (1.5g de bacto agar) dans 100 ml d'eau distillée et stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes. Le milieu eau gélosée précédemment préparé est additionné en surfusion avec 10 µl d'une solution de fenhexamid concentré à 4 mg/ml. Chaque lame est coulée avec 5 ml du milieu préparé. [Figure 06].

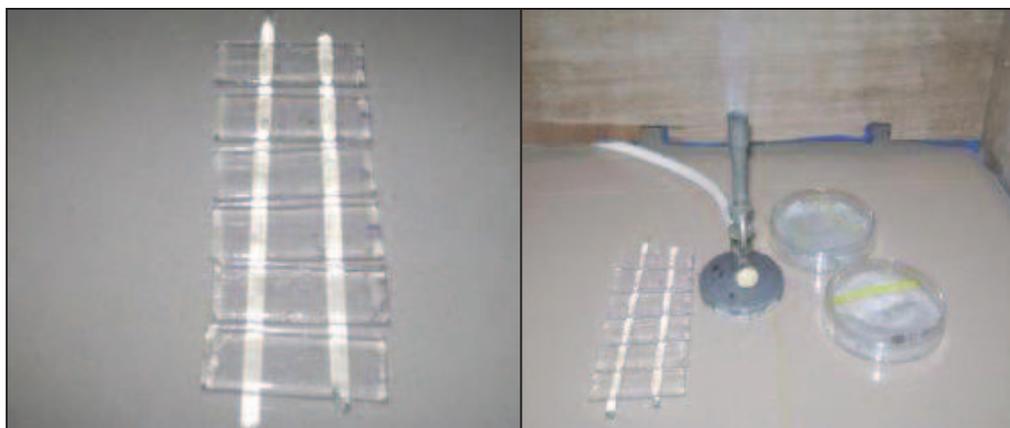


Figure 06 : Préparation des lames

Une suspension sporale est préparée à partir d'une culture âgée de 14 jours. Un comptage de spore est effectué sur une cellule de Malassez sous microscope à objectif X10 afin de standardiser toutes les concentrations des souches à 10^6 spores/ml. 17 µl de chaque souche sont étalés sur chaque lame. Trois lames sont utilisées pour chaque souche et un témoin est réalisé. Les lames sont ensuite incubées à 22 °C, à l'obscurité pendant 18 heures.

Le comptage des spores est effectué sous microscope à objectif **X10**. Une spore est considérée germée quand la taille du tube germinatif est deux fois supérieure à la taille de la spore elle-même. Le pourcentage de germination et le pourcentage de résistance au fenhexamid sont calculés selon les formules suivantes :

$$\%G = (G / (G + NG)) \times 100 \quad \text{et} \quad \%R = \%Gf / \%Gt$$

Avec :

G : nombre de spores germées.

NG : nombre de spores non germées.

% Gf : pourcentage de germination de spores traitées avec le fongicide.

% Gt : pourcentage de germination de spores non traitées.

IV. Test d'agressivité des souches

Le degré d'agressivité des souches de *B. cinerea* sélectionnées est réalisé sur les folioles prélevées de plants de tomate « *Lycopersicum esculentum* », feuilles détachées de laitue « *Lactuca sativa* » et pommes entières « *Malus communis* » variété Golden Delicious. Les folioles de tomate, feuilles de laitue et pommes sont déposées dans des boîtes appropriées, tapissées au préalable avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée, à raison de 5 folioles, trois feuilles de laitue par boîtes et par souche et six pommes par boîtes et deux souches.

1. Test d'agressivité sur tomate et laitue:

Ce test d'agressivité est inspiré de la technique de Marc et al (2008). Cinq folioles de tomate et trois feuilles de laitue ont été déposées dans des boîtes en plastique contenant du papier absorbant (couleur bleu) humidifié avec de l'eau distillée stérile.

Un implant mycélien de cinq mm de diamètre, prélevé d'une culture âgée de trois jours, est déposé au centre de chaque foliole de tomate et feuille de laitue. Les boîtes contenant les folioles et les feuilles inoculées sont incubées à 22 °C et à l'obscurité.

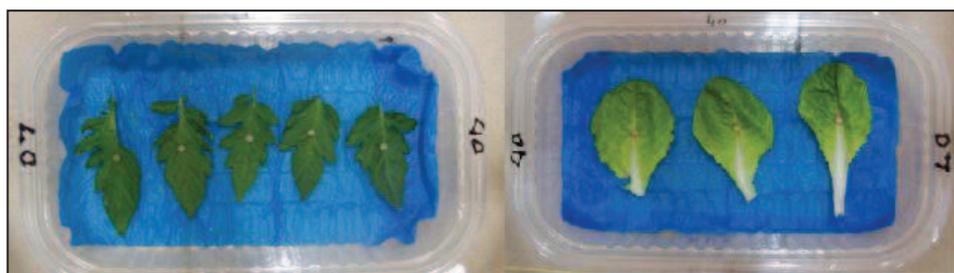


Figure 07 : Préparation des folioles de tomate et feuilles de laitue dans les boîtes

A partir de 24 h suivant l'inoculation, chaque foliole et feuille est photographiée quotidiennement et ce pendant 84 h pour les folioles et 96h pour les feuilles de laitue afin d'observer l'évolution des lésions causées par chaque souche. A partir des photographies, la surface (mm²) des lésions présentes sur chaque foliole et feuille est déterminée avec le logiciel ASSESS 2.0 [annexe II]. Les surfaces des lésions causées par chaque souche sont transformées en AUDPC (area Under disease progression curve), qui correspond à la surface sous la courbe de progression de la maladie (Aissat *et al.*, 2008).

L'AUDPC est calculée pour chacune des lésions avec des observations $n = 84$ heures pour la tomate et $n = 96$ heures pour laitue et $I = 12$ h d'intervalle et ceci du 24 h au 84 h pour tomate et du 24 h au 96 h pour laitue suivant l'inoculation. La formule permettant de calculer l'AUDPC est la suivante :

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

Avec :

Y_j : la surface de la lésion (en mm²) au temps d'observation j ;

n : le nombre total d'observations ;

I : l'intervalle de temps entre chaque observation (en heures).

2. Test d'agressivité sur pomme

Le test d'agressivité est inspiré de la technique de Marc *et al.*, (2008). Trois pommes (**Golden Delicious**) pour une souche sont déposées dans des boîtes en plastique [Figure 08].



Figure 08 : Préparation des pommes dans les boîtes

Une suspension sporale est préparée à partir d'une culture âgée de 14 jours. Un comptage de spore est effectué sur une cellule de Malassez sous microscope à objectif X10 afin de standardiser toutes les concentrations des souches à 10^6 spores/ml. 17 μ l de chaque souche sont inoculés dans chaque pomme et ce trois pommes pour chaque inoculum, ensuite les pommes sont incubées à 22 °C et à l'obscurité.

A partir du 24 h suivant l'inoculation, la longueur de lésion sur les pommes est mesurée pendant 24 h afin d'observer l'évolution des lésions causées par chaque souche [Figure 09]. Les longueurs des lésions causées par chaque souche sont transformées en AUDPC. L'AUDPC est calculée pour chacune des lésions avec des observations $n= 144$ heures et $I= 24$ h d'intervalle et ceci de 24 h à 144 h suivant l'inoculation.



Figure 09 : Mesure de la nécrose sur pomme

V. Analyse statistique

Afin de savoir s'il existe ou non une différence significative de résistance au fenhexamid et d'agressivité entre les deux populations de *Botrytis cinerea*, le test Newman-Keuls est appliqué à l'aide du logiciel STATISTICA Edition '99. Sur la base pourcentage de résistance et la base d'agressivité, une moyenne calculée pour chaque souche. Il a testé l'hypothèse H_0 : « Les deux populations sont identiques en terme de résistance et d'agressivité ». Celle-ci est rejetée, si la probabilité associée P est inférieure à 0.05.

Résultats et discussion

I. Résultats de la caractérisation phénotypique des souches de *Botrytis cinerea*

Les colonies de *Botrytis cinerea* sur gélose à extrait de malt et milieu PDA ont été classées visuellement en huit types morphologiques (tableau II). Deux grands types morphologiques, sans différences marquées dans la sporulation, ont été identifiés: «mycélium», caractérisé par une quasi-absence de sclérotés et «sclérotés», caractérisées par un mycélium plutôt rasant.

Tableau 03: Résultats de la Classification phénotypique des souches de « Groupe I » sur gélose à extrait de malt et PDA.

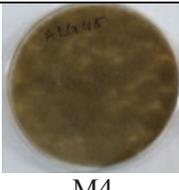
Souches	Sur milieu MEA		Sur milieu PDA	
	Types sclérotien « S »	Types mycélien « M »	Types sclérotien « S »	Types mycélien « M »
ALG 40	0	 M2	 S3	plutôt rasant
ALG 42	0	 M3	 S4	plutôt rasant
ALG 45	0	 M4	0	 M4
ALG 183	0	 M4	 S4	plutôt rasant

Tableau 04: Résultats de la Classification phénotypique des souches de « Groupe II » sur gélose à extrait de malt et PDA.

Souches	Sur milieu MEA		Sur milieu PDA	
	Types sclérotien « S »	Types mycélien « M »	Types sclérotien « S »	Types mycélien « M »
ALG 20	0	 M4	 S1	plutôt rasant
ALG 26	0	 M2	 S1	plutôt rasant
ALG 66	 S3	plutôt rasant	 S2	plutôt rasant
ALG 85	0	 M3	 S2	plutôt rasant

Selon Martinez et al. (2003), les colonies de souches *Botrytis cinerea* testées sont classées visuellement en huit morphotypes distincts.

Dans la présente étude, sous les conditions expérimentales appliquées, [température 22°C et obscurité] ; toutes les souches du groupe I « *Botrytis pseudo-cinerea* » sur milieu PDA sont de type sclérotien plutôt rasant à l'exception de la souche ALG 45 de type mycélien, caractérisée par l'absence de sclérote. Tandis que sur milieu malt agar toutes les souches sont de type mycélien [Tableau 03]. En revanche, toutes les souches du groupe II « *Botrytis cinerea* » sur milieu PDA sont de type sclérotien plutôt rasant. Les mêmes souches, sur milieux malt agar sont de type mycélien à l'exception de ALG 66 qui est de type sclérotien [Tableau 04].

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Walker *et al.*, (2011) qui ont déterminé qu'aucun des critères morphologiques examinés ne pouvait distinguer entre ces deux espèces « *Botrytis cinerea* » et « *Botrytis pseudocinerea* ».

II. Résultats de test de la résistance des souches de *Botrytis cinerea* au fenhexamid

1. Effet du fenhexamid sur la croissance mycélienne

Toutes les souches ont été résistantes à ce fongicide. Le test de Newman-Keuls n'a révélée aucune différence significative entre le groupe II et groupe I du point de vue de leur résistance ($P = 0,40480$).Elles présentent respectivement un pourcentage de résistance de moyenne de 19,01 et 16,58 [figure 10].

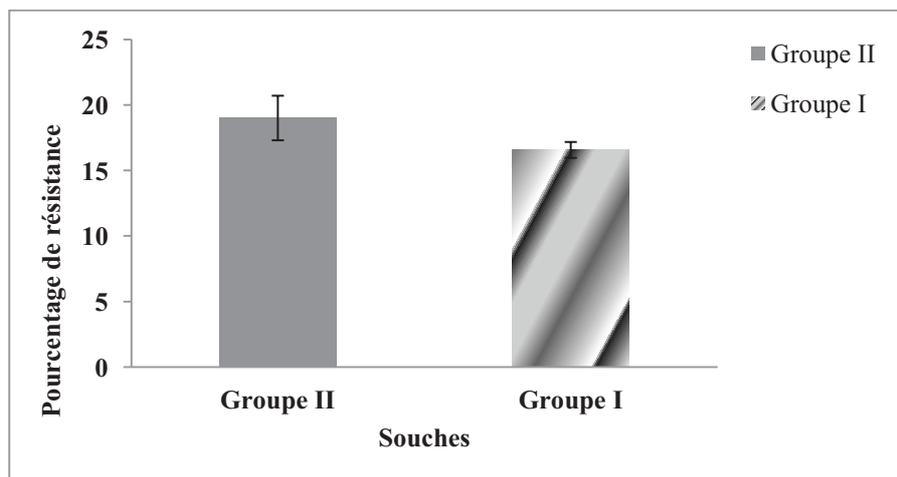


Figure 10 : Résistance de la croissance mycélienne des groupes de *Botrytis* au Fenhexamid.les barres représentent l'erreur standard des moyennes

Il est important de noter que l'analyse des souches appartenant au même groupe a révélé que quelques unes ont un comportement plus résistant que d'autres et significativement différent [Tableau 05].

Tableau 05 : Classement des groupes selon les valeurs de la résistance de la croissance du mycélium des souches testées, obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%

Souches	Valeur Moyenne de %R	Regroupements	
ALG 42 G1	9,92 ¹	a ²	
ALG 45 G1	10,00	a	
ALG 66 G2	11,98	a	
ALG 85 G2	15,38	a	b
ALG 40 G1	19,32	b	c
ALG 20 G2	23,40	c d	
ALG 26 G2	25,29	d	
ALG 183 G1	27,07	d	

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (8 souches × 3 répétitions) de la résistance de la croissance mycélienne des souches de *Botrytis cinerea*.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05) selon le test de Newman et Keuls.

G1 : Groupe I , G2 : Groupe II

2. Résultats de l'effet de fenhexamid sur la sporulation

Toutes les souches ont été résistantes au fongicide. Le test de Newman-Keuls n'a révélé aucune différence significative entre le groupe II et groupe I de point de vue de leur résistance (P = 0,1988). Elles présentent respectivement un pourcentage de résistance de moyenne de 37,28 et 21,58 [figure 11].

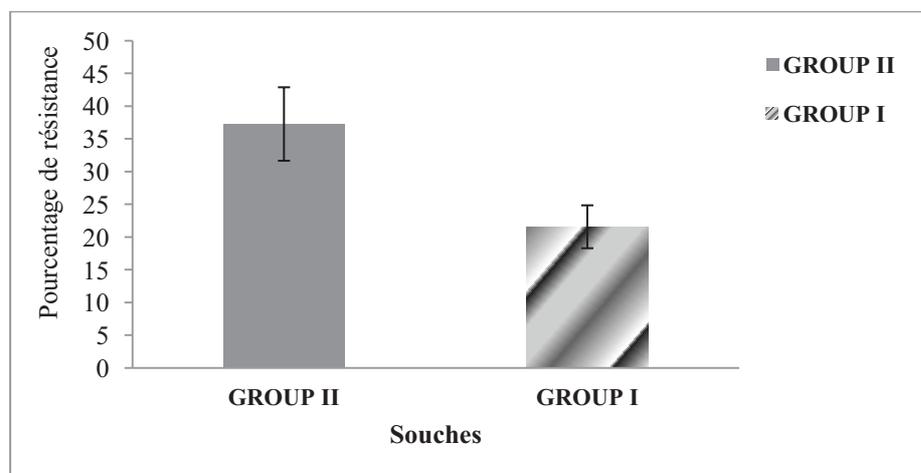


Figure 11: Résistance de la sporulation des groupes de *Botrytis* au fenhexamid. Les barres représentent l'erreur standard des moyennes.

Il est important de noter que l'analyse des souches appartenant aux groupes différents ou au même groupe a révélé des comportements plus résistants que d'autres avec une différence significative [Tableau 06].

Tableau 06 : Classement des groupes selon les valeurs de la résistance de la sporulation des souches testées, obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%

Souches	Valeurs moyennes de %R	Regroupements	
ALG 85 G1	2,86 ¹	a ²	
ALG 42 G2	6,01	a	
ALG 183 G2	12,18	a	
ALG 20 G1	20,07	a	b
ALG 45 G2	25,97	a	b
ALG 26 G1	32,09	a	b
ALG 40 G2	42,16	b	
ALG 66 G1	94,09	c	

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (8 souches × 3 répétitions) de la résistance de la sporulation des souches de *Botrytis cinerea*.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05) selon le test de Newman et Keuls.

G1 : Groupe I , G2 : Groupe II

3. Effet de fenhexamid sur la germination des spores

Toutes les souches ont été résistantes au fongicide. Le test de Newman-Keuls n'a révélé aucune différence significative entre le groupe II et groupe I du point de vue de leur résistance (P = 0,449). Elles présentent respectivement un pourcentage de résistance de moyenne de 60,19 et 54,07 [figure 12].

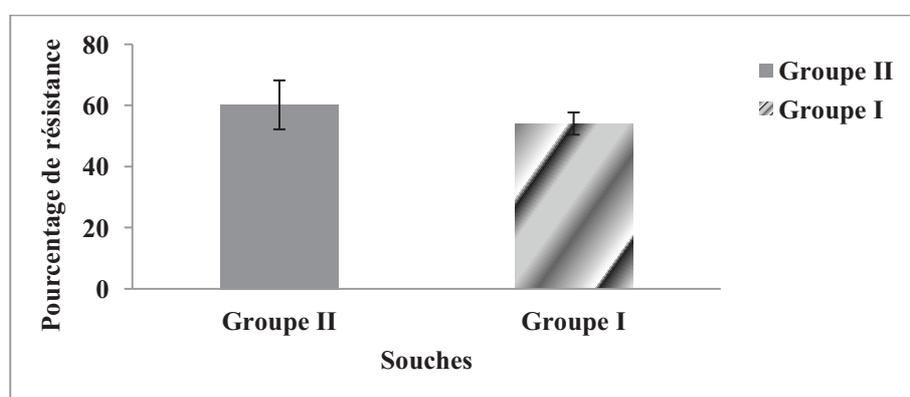


Figure 12 : Résistance de la germination des spores des groupes de *B cinerea* au fenhexamid.

Il est important de noter que l'analyse entre les souches appartenant aux deux groupes a révélé que quelques souches ont un comportement plus résistant que d'autres et significativement différent [Tableau 07].

Tableau 07 : Classement des groupes selon les valeurs de la résistance de la germination de spore des souches testées, obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%

Souches	Valeurs moyennes de %R	Regroupements	
ALG 183 G1	35,38 ¹	a ²	
ALG 42 G1	37,85	a	
ALG 20 G2	42,10	a	
ALG 26 G2	53,26	a	b
ALG 85 G2	63,75	a	b
ALG 45 G1	69,79	b	
ALG 40 G1	73,28	b	
ALG 66 G2	81,65	b	

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (8 souches × 3 répétitions) de la résistance de la sporulation des souches de *Botrytis cinerea*.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05) selon le test de Newman et Keuls

G1 : Groupe I , G2 : Groupe II

4. Discussion

Les études de Leroux *et al.* ; (2002) montrent que le fenhexamid n'affecte pas la germination des spores, mais empêche l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne à des basses concentrations. Dans la présente étude, le fenhexamid, à une concentration de 0,4 µg/ml, n'a affecté que modérément la germination des spores, mais a réduit considérablement la croissance du mycélium et la sporulation des souches.

Selon Martinez *et al.*, (2003), le groupe I est moins sensible au fenhexamid comparé au groupe II. Nos résultats diffèrent ces résultats. Le groupe II et le groupe I ne sont pas différents en termes de résistance au fenhexamid. Cette différence des résultats peut être expliquée par la méthodologie adoptée dans notre étude. Dans les travaux de Walker *et al.*, (2011), les résultats ont été obtenus par la détermination de la valeur du IC 50 (la concentration inhibitrice à moitié) qui est une mesure quantitative indiquant le nombre de

dose qu'il faut pour inhiber la croissance mycélienne, la sporulation et la germination de spore.

Vu qu'on a utilisé une dose discriminatoire de fenhexamid : 0,4 µg/ml, permettant de déterminer la résistance ou la sensibilité des souches de *B. cinerea* et n'ayant pas tenu compte de la détermination de l'IC50 des souches au fenhexamid dans notre test, comme cela a été fait dans d'autres études, la détermination de l'IC50 lèvera la contradiction des résultats obtenus lors de notre analyse.

III. Etude de l'agressivité des souches de *botrytis cinerea*

Le test d'agressivité a pour objectif de quantifier le pouvoir pathogène des deux groupes de *Botrytis cinerea*. Pour cela, les souches choisies sont inoculées sur folioles de tomate, feuilles détachées de laitue et pommes entières. Les surfaces des lésions produites sont mesurées et transformées en AUDPC.

Toutes les souches produisent des lésions rythmées sur ces trois plantes hôtes. Les lésions commencent à se produire à partir de 24 h de l'inoculation sous forme de petites taches, puis elles se développent de plus en plus à différentes vitesses de diffusion selon le degré d'agressivité des souches.

1. Test sur tomate :

Quelque soit le groupe auquel appartiennent les souches inoculées, elles infectent les folioles de tomate. Ce qui se traduit par la formation de nécrose autour de l'implant mycélien [Figure 13].

Le test de Newman-Keuls a montré que les souches de groupe I et groupe II ne sont pas significativement différentes en terme d'agressivité ($P = 0,32228309$) [Figure 14]. Leur AUDPC moyenne est de 21961 pour le groupe II et de 19681 pour le groupe I.

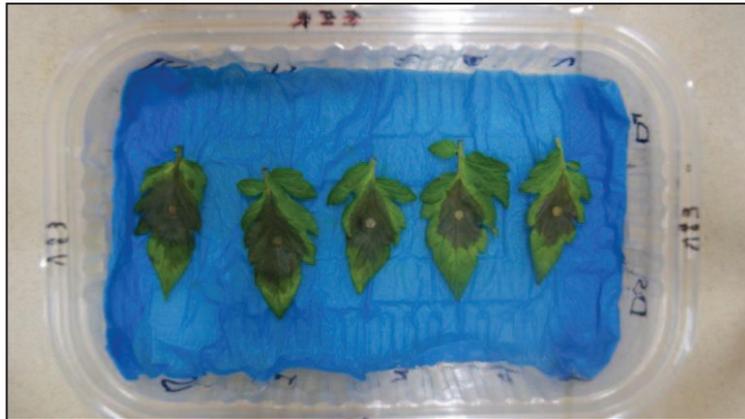


Figure 13 : Formation de nécroses autour des points d'infection d'une souche de *Botrytis cinerea*.

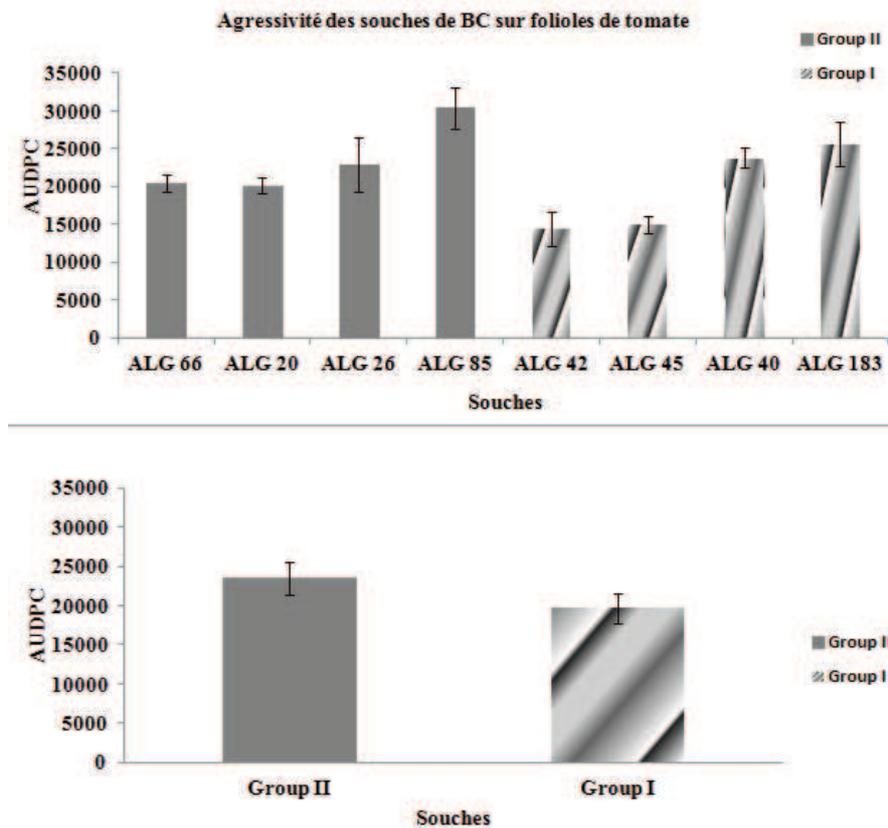


Figure 14 : Agressivité de souches de *B. cinerea* sur folioles de tomate. L'AUDPC moyenne a été déterminée pour chaque souche. Plus la valeur est élevée, plus la souche est agressive. Les souches testées proviennent du Groupe I ou du groupe II. Les barres représentent l'erreur standard des moyennes.

La réalisation d'une analyse entre toutes les souches des deux groupes a révélé une différence significative entre quelques souches du même groupe. Quelques souches du «Groupe I» sont significativement différentes de quelques souches du « Groupe II ». Cela signifie qu'elles ne présentent pas le même degré d'agressivité selon la souche. Certaines souches ne sont pas significativement différentes. Ceci signifie qu'elles ne se différencient pas selon leur agressivité [Tableau 08].

Tableau 08 : Classement des groupes selon les valeurs moyennes d'AUDPC de l'agressivité des souches testées sur tomate obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.

Souches	Valeurs moyenne d'AUDPC	Regroupements		
ALG 42 G1	14373 ¹	a ²		
ALG 66 G2	20474	a		
ALG 45 G1	14955	a		
ALG 20 G2	20138	a	b	
ALG 26 G2	22842	a	b	c
ALG 40 G1	23820	a	b	c
ALG 183 G1	25576		b	c
ALG 85 G2	30390			c

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (8 souches × 5 répétitions) de l'agressivité des souches de *Botrytis cinerea* sur tomate.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05) selon le test de Newman et Keuls

G1 : Groupe I , G2 : Groupe II

2. Test sur laitue.

Toutes les autres souches ont infecté les feuilles détachées de laitue quelque soit le groupe auquel appartient ces souches. Cela se traduit par la formation de nécrose autour de l'implant mycélien [Figure 15]. Le test de Newman-Keuls a montré que les souches du groupe II et groupe I sont significativement différentes en terme d'agressivité (P =0,00674)[figure 16]. Leur AUDPC moyenne est respectivement de 24541 et 18654.

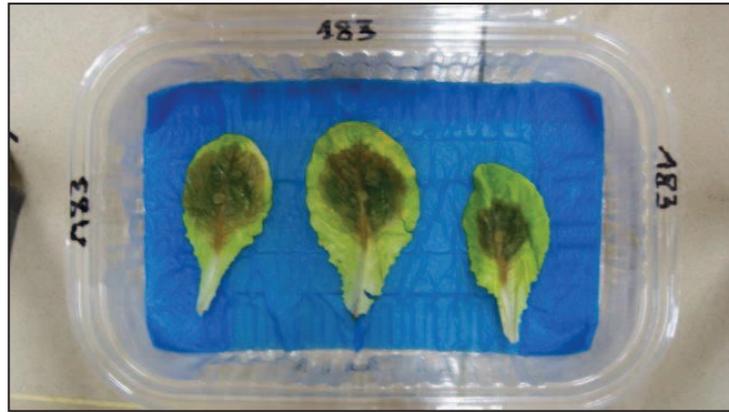


Figure15 : Formation de nécroses autour des points d'infection d'une souche de *Botrytis cinerea*

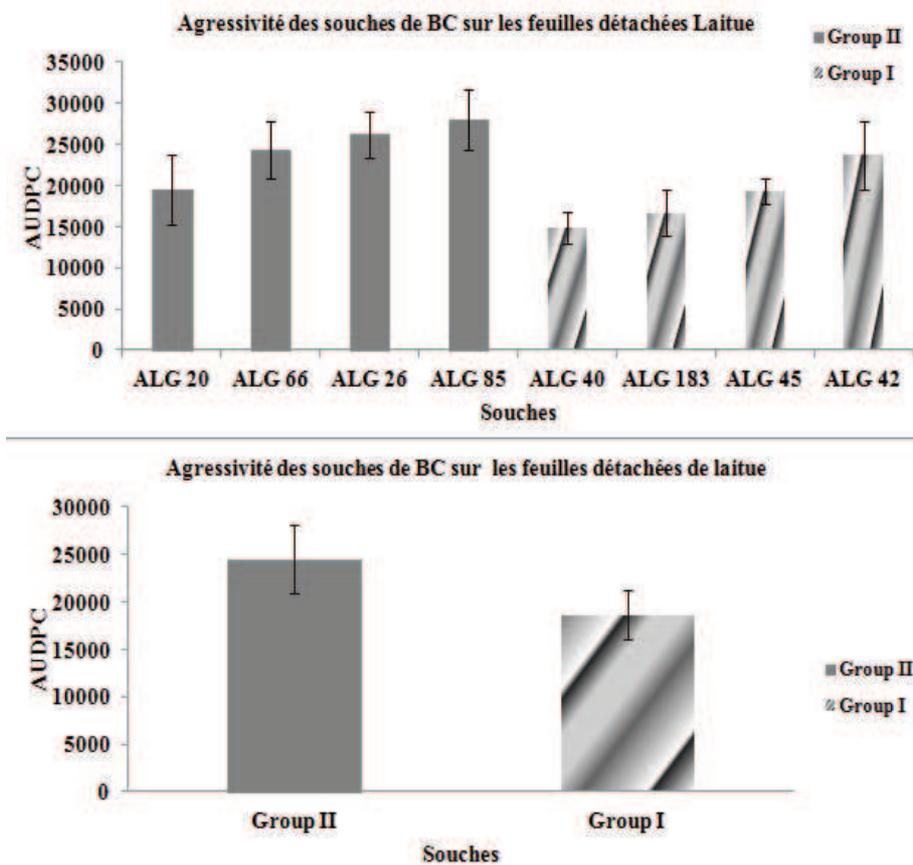


Figure 16 : Agressivité de souches de *B. cinerea* sur feuilles détachées de laitue. L'AUDPC Moyenne a été déterminée pour chaque souche. Plus sa valeur est élevée, plus la souche est agressive. Les souches testées proviennent du Groupe I ou du groupe II . Les barres représentent l'erreur standard des moyennes.

Il n’y a aucune différence significative entre les souches du même groupe. En revanche, quelques souches du «Groupe I» sont significativement différentes avec quelques souches du « Groupe II ». Cela signifie qu’elles ne présentent pas le même degré d’agressivité selon la souche. Certaines souches ne sont pas significativement différentes. Ceci signifie qu’elles ne se différencient pas selon leur agressivité [Tableau 09].

Tableau 09 : Classement des groupes selon les valeurs moyennes d’AUDPC de l’agressivité des souches testées sur laitue obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.

Souches	Valeurs moyenne d'AUDPC	Regroupements		
ALG 40 G1	14873 ¹	a ²		
ALG 183 G1	16705	a	b	
ALG 45 G1	19329	a	b	c
ALG 20 G2	19529	a	b	c
ALG 42 G1	23707	a	b	c
ALG 66 G2	24351	a	b	c
ALG 26 G2	26249		b	c
ALG 85 G2	28035			c

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (8 souches × 3 répétitions) de l’agressivité des souches de *Botrytis cinerea* sur laitue.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Newman et Keuls

G1 : Groupe I , G2 : Groupe II

3. Test sur pomme

Toutes les souches ont infecté les pommes quelque soit le groupe auquel appartiennent les souches inoculées. Ce qui se traduit par la formation de nécroses autour du point d’infection [Figure 17].

Le test de Newman-Keuls indique que les populations « Groupe I » et « Groupe II » ne sont pas significativement différentes du point de vue de leur agressivité ($P = 0,0576$) [figure 18]. Leur AUDPC moyenne était respectivement de 2490 et 2085.



Figure 17 : Formation de nécroses autour des points d'infection d'une souche de *Botrytis cinerea*

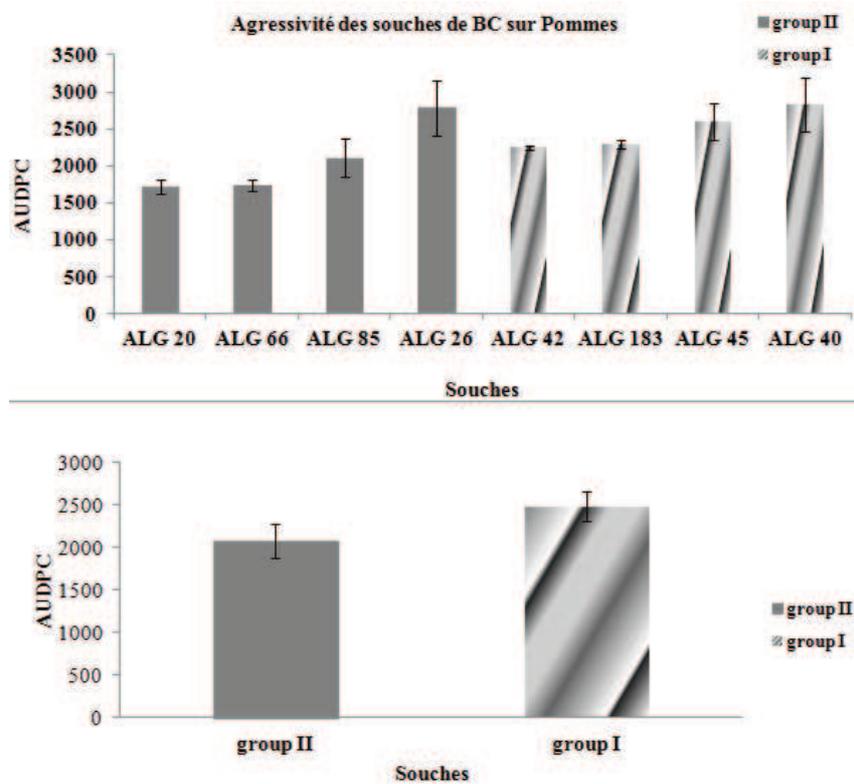


Figure 18 : Agressivité de souches de *B. cinerea* sur pommes entières. L'AUDPC moyenne a été déterminée pour chaque souche. Plus la valeur est élevée, plus la souche est agressive. Les souches testées proviennent du Groupe I ou du groupe II. Les barres représentent l'erreur standard des moyennes.

La réalisation d'une analyse entre les souches n'a révélé aucune différence significative [Tableau 10].

Tableau 10 : Classement des groupes selon les valeurs moyennes d'AUDPC de l'agressivité des souches testées sur pommes obtenues par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%.

Souches	Valeurs moyenne d'AUDPC	Regroupements
ALG 20 G2	1716	a
ALG 66 G2	1738	a
ALG 85 G2	2108	a
ALG 42 G1	2244	a
ALG 183 G1	2288	a
ALG 45 G1	2602	a
ALG 26 G2	2781	a
ALG 40 G1	2826	a

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (8 souches × 3 répétitions) de l'agressivité des souches de *Botrytis cinerea* sur laitue.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05) selon le test de Newman et Keuls

G1 : Groupe I, G2 : Groupe II

4. Discussion

L'existence d'une spécificité d'hôte a été recherchée sur deux groupe de *Botrytis*, le groupe I « *pseudo-cinerea* » et le groupe II « *Botrytis cinerea* ». A notre connaissance, aucune étude sur ce sujet ne s'était exclusivement intéressée à ces deux groupes.

Les tests réalisés ont montré que toutes les souches des deux groupes de *Botrytis cinerea* ont une agressivité variable sur tomate, pomme et laitue. Les souches appartenant aux « Groupe I » sont plus agressives sur tomate que sur laitue et pomme respectivement avec des valeurs moyennes d'AUDPC de 24541, 18654 et 2490. Tandis que les souches appartenant au groupe II sont plus agressives sur laitue que sur tomate et pomme avec des valeurs moyennes d'AUDPC respectivement de 24541, 21961 et 2085.

De plus, les tests d'agressivité sur tomate et pomme ont montré que cette différence d'agressivité n'est pas significative entre les deux groupes. Leurs P valeur est respectivement

de 0,322 et 0,0576. Par contre la différence d'agressivité sur laitue des deux groupes est significative ($P=0,00674$).

L'ensemble de ces résultats confirme fortement l'hypothèse d'une spécificité d'hôte chez *B. cinerea*, sur les hôtes tomate, laitue et pomme.

D'autres études se sont penchées sur ce sujet en réalisant des tests d'agressivité. Cotoras et Silva (2005) ont suggéré l'existence d'une spécificité d'hôtes chez *B. cinerea* en inoculant des souches génétiquement différentes issues de tomate et de vigne, sur des feuilles de tomate. Les souches provenant de tomate sont beaucoup plus agressives que les souches provenant de vigne. Des résultats similaires ont été obtenus par Pie et Brower (1993). Des souches de *B. cinerea* collectées sur des roses sont davantage agressives sur des pétales de rose que des souches provenant de fleurs de gerbéra ou de petits pois. Tous ces résultats viennent appuyer l'existence d'une spécificité d'hôte, autres que la laitue et la tomate.

Nos résultats ont montré que les souches appartenant au même groupe n'ont pas la même agressivité. ALG 85 est plus agressive sur tomate et laitue respectivement d'une AUDPC de 30390 et 28035. Chez la pomme ALG 45 est plus agressive d'une AUDPC de 2602. ALG 42 est moins agressive chez la tomate et laitue respectivement d'une AUDPC de 14373 et 14873. ALG 20 est la moins agressive chez la pomme d'une AUDPC de 1716. Cela nous a permis de mettre en évidence une grande diversité du niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea* étudiées. Ce qui a été démontré par Shen *et al.* (2009), qui ont réalisé une étude sur la pathogénicité de 26 souches de *B. cinerea* sur les feuilles de concombre. Ces auteurs ont remarqué une différence importante de pathogénicité entre les souches testées.

Conclusion

Conclusion

L'objectif fixé à cette étude est de caractériser la variabilité morphotypique, l'agressivité et la résistance au fenhexamid de deux groupes de *Botrytis* : *Botrytis cinerea* (II) et *pseudo cinerea* (I).

En premier lieu, l'étude phénotypique basée sur le morphotype n'a pas montré une grande variabilité entre les deux groupes. Deux principaux morphotypes sont identifiés : un type mycélien et un type sclérotien.

Nos résultats sur la résistance au fenhexamid ne montrent pas de différence entre le groupe I et le groupe II. Ces résultats diffèrent ceux obtenus par Walker *et al.*, (2011). Cette contradiction peut s'expliquer par la différence dans les techniques utilisées. Dans notre cas, nous avons utilisé la dose discriminatoire. Par contre Walker *et al.*, (2011) ont travaillé sur les IC50

Enfin, notre travail rejoint les résultats obtenus par les différentes études sur l'existence d'une spécificité d'hôte chez *B. cinerea* et *pseudo cinerea*. On notera que ces recherches se sont intéressées à d'autres plantes hôtes du champignon, et ont conclu sur cette caractéristique.

Comme perspectives :

- Les résultats de la résistance au fenhexamid doivent être confirmés par d'autres tests : la détermination d'IC50 et la détection des éléments transposables.
- Comparaison de nos résultats avec des souches d'origines différentes (France, Norvège, Maroc...).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agrios G. N. 2005.** Plant pathology. Ed. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, 922 p.
- Aissat K, Nicot P. C., Guechi A., Bardin M. et Chibane M. 2008.** Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for Sustainable Development*. 28, 403–409.
- Beever RE, Weeds PL, 2004.** Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 29-52.
- Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Cetrèse T. 2009.** Les maladies de la tomate, identifier, connaître maîtriser. Ed. Quae, Paris, 691p.
- Bryon Florian.2011.**Caractérisation des populations de *Botrytis cinerea* issues de cultures de laitues et de tomates sous abris. 4p
- Chardonnet C. O., Sams C. E., Trigiano R. N. et Conway W. S. 2000.** Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology*. 90, 769-774.
- Cotoras M. et Evelyn S .2005.** Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. In *Mycologia*, pp. 485-492
- Decognet V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y. et 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, 185-193.
- Fukumori Y, Nakajima M and Akutsu K, 2004.** Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 256-60.
- Fournier E. et Giraud T. 2008.** Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology*. 21, 122-132.
- Hmouni A., Oihabi L., Badoc A. et Douira A. 2003.** Étude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc). *Bulletin - Société de Pharmacie de Bordeaux*. 142, 79-100.
- Holz G, Coertze S and Williamson B, 2004.** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In. *Botrytis: biology, pathology and control*. 9-27.
- Kuzmanovska Biljana , Rusevski Rade, Jankuloski Ljupcho, Jankulovska Mirjana , Ivic Dario Bandzo Katerina. 2012 .**Phenotypic and genetic characterization of *Botrytis cinerea* isolates from tomato.*Genetika*, Vol44, N°3,633-647

- Leroux P.,Chapelet F., Desbrosses D., Gredt M. 1999.** Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. 18, 687-697
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., et Chapelet F. 2002.** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*. 58, 876-888.
- Leroux P. 2007.** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, 195-222, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Messiaen C, Blancard D, Rouxel F and Lafon R, 1991.** Diseases of market garden plants. *Maladies des plantes maraicheres*. In. *Maladies des plantes maraicheres.*, 552 pp.
- Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B. et Fermaud M. 2003.** Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 479-488.
- Nicot Pc and Baille A, 1996.** Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes. In. *Aerial plant surface microbiology*. 169-89.
- Pande S, Singh G, narayana rao J, Bakr MA, chaurasia PCP, Jashi S, Jonason C, Singh SD, Kumar J, Rahman M et Gowda CLL.2001.** Integrated management of *Botrytis cinerea* gray mold of chickpea. *International crops research*. Institute for the semi arid tropics. India. 34p.
- Pie K and Brower Yjc, 1993.** Susceptibility of cut rose flower cultivars to infections by different isolates of *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 137, 233-44.
- Raposo R., Gomez V., Urrutia T. et Melgarejo P. 2000.** Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology*. 90, 1246-1249.
- Ross E. Beever et Pauline L. 2007.** Weeds Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia* in *Botrytis: biology, pathology and control*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P et Delen N. Published by Springer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 29-34.
- Shen D., Li B., Li X., Song J., Shi Y., Wang H., Shen D., Li B.J., Li X. X., Song J. P., Shi Y. X., et Wang H. P. 2009.** Pathogenicity analysis of different *Botrytis cinerea* strains in cucumber. *China Vegetables*. 25-28.
- Shtienberg D, Elad Y, Niv A, Nitzani Y and Kirshner B, 1998.** Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 753-63.
- Staats M., van Baarlen P. et van Kan J. A. 2005.** Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*. 22, 333-346.

Valdes-Gomez H, Fermaud M, Roudet J, Calon nec A, Gary C. 2008. Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. *Crop protection*, 27, 1174-1186.

Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont, J., and Fournier, E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433-1445.

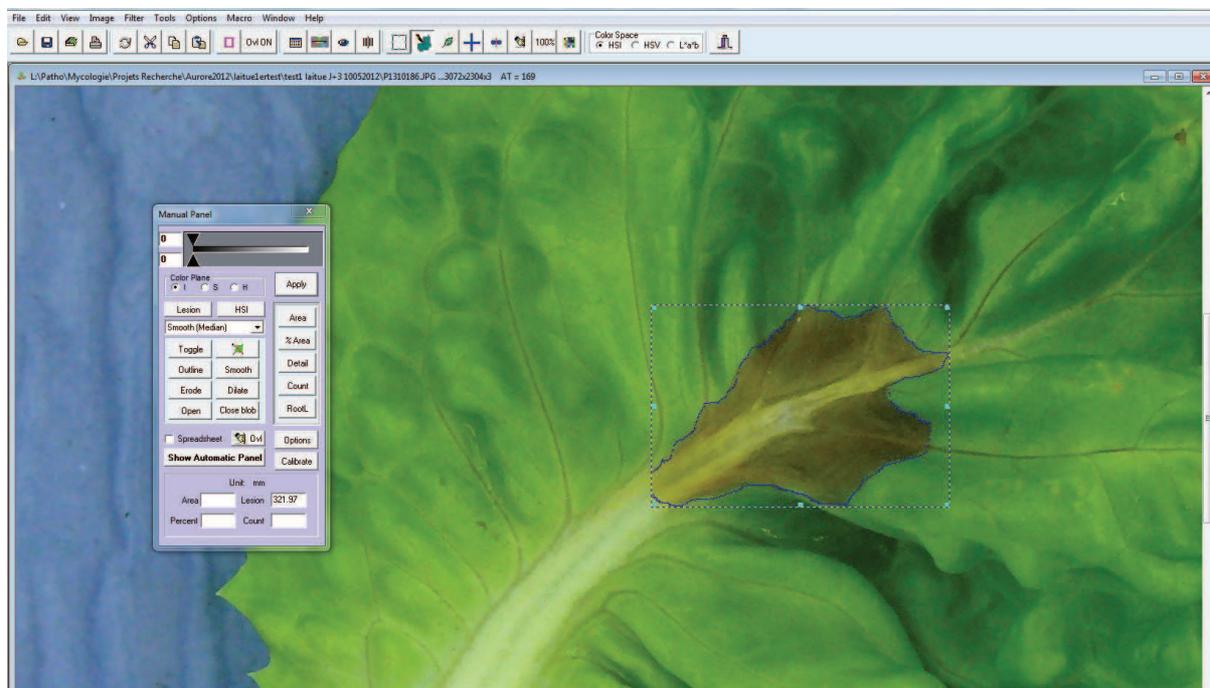
Williamson B, 1994. Latency and quiescence in survival and success of fungal plant pathogens. In: Blakeman JP and Williamson B (eds) *Ecology of Plant Pathogens*. (pp. 187-207) *CAB International*, Oxford, UK.

Williamson B, Ducan GH, Harrison JG, Harding LH, Elad Y and Zimand G, 1995. Effet of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99: 1303-3010.

Williamson B, Tudzynsk B, Tudzynski P and Van Kan Jal, 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-80.

Yourman L. F., Jeffers S. N. et Dean R. A. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology*. 91, 307-315.

Annexes

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

Résumé

La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est l'une des principales maladies aériennes fongiques sur diverses cultures d'importance agronomique. Des souches appartenant aux groupe I « *Botrytis pseudo-cinerea* » et groupe II « *Botrytis cinerea* », ont été étudiés en vue de comprendre la variabilité montrée par *B.cinerea* en vue de rependre au x problématiques suivantes : (I) *B.cinerea* présente-t-il une spécificité d'hôte ? (II) le niveau d'agressivité des deux groupes est-il identique ? (III) la résistance des deux groupes est-elle la même face au fenhexamid ?

La réalisation de test d'agressivité a indiqué qu'une spécificité d'hôte pouvait exister et une grande hétérogénéité entre les deux groupes ainsi que les souches testées appartenant au même groupe. D'ailleurs, une gamme importante de sensibilité au fenhexamid a été observée parmi les huit isolats de *B.cinerea*, les résultats ont d'autre part révélé que le groupe I et le groupe II sont identique en terme de résistance face a ce fongicide en utilisant une seule dose (0,4µg/ml) que sa soit dans la croissance mycélienne, sporulation ou la germination des spores.

Mots clés : *Botrytis pseudo-cinerea*, *Botrytis cinerea*, fenhexamid, agressivité.

Abstract

Gray rotteness caused by the fungus *Botrytis cinerea*, is one of the diseases that may affect crops of agronomical importance. Strains belonging to the group I “*Botrytis pseudo-cinerea*” and group II “*Botrytis cinerea*”, were studied in order to find an answer to the the variability shown by *B.cinerea* with the following issues: (I) Does *Botrytis cinerea* present a host specificity? (II) Is the level of aggressiveness of two groups similar? (III) The resistance of the two groups is the same face to fenhexamid?

The achievement test of aggression showed that the host specificity could as well as large heterogeneity between them; the two groups and the tested strains belonging to the same group. Furthermore, a wide range of sensitivity toward the fenhexamid was observed among the eight isolates of *B. cinerea*, the results revealed the group I and groups II are identical in term of resistance face has this fungicide while using a single dose (0,4µg/ml) either in the mycelial development, sporulation or spore germination without an significant difference.

Keywords: *Botrytis pseudo-cinerea*, *Botrytis cinerea*, fenhexamid, aggressiveness.