

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH - ALGER -

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

Option : Biologie et génétique de l'interaction plante hôte / pathogène
en protection de cultures.

THEME

**Etude de la diversité génétique de *Botrytis cinerea*
Pers. :Fr. agent de la pourriture grise de la vigne.**

Présenté par : ALEM ETSOURI Meriem

Soutenu le : 06/11/2014

Jury :

Président	:	M. BOUZNAD Z.	Professeur ENSA
Promoteur	:	Mme. LOUANCHI M.	Maître de Conférence ENSA
Examineurs	:	Mme. BOUREGHDA H.	Maître de Conférence ENSA
		M. KEDAD A.	Chargé de Cours ENSA

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Mycologie du département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, Alger.

Mes remerciements s'adressent d'abord à Madame LOUANCHI M., Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach (Alger), pour son soutien, son attention, sa patience et ses conseils tout au long de mon parcours.

J'adresse aussi mes remerciements à Mr. BOUZNAD Z, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach (Alger), pour m'avoir honoré en présidant le jury.

Je remercie également Mme. BOUREGHDA H., Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach (Alger), pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements et mon profond respect s'adressent à M. KEDAD A., Chargé de Cours à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach (Alger), pour son aide et sa présence constante, et pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Une partie de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du CNCC. Je remercie de ce fait Mr. Kheddame, Directeur du CNCC pour m'avoir accueilli au sein de ces laboratoires, Mme Laala S. pour son aide, son orientation et sa disponibilité ainsi que Mr Beninal L. pour son aide et son soutien.

J'adresse également mes remerciements à Mme Benhassir Fatima et Mme Djebari Kenza pour leur soutien, leur présence et leur gentillesse.

Enfin je remercie toute personne ayant contribué à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1. LA VIGNE.....	4
II.1.1. EVOLUTION DE LA VITICULTURE EN ALGERIE.....	4
II.1.2. LES CEPAGES CULTIVES.....	5
II.1.3. LES MALADIES DE LA VIGNE	6
II.1.3.1. LES MALADIES VIRALES	6
II.1.3.2. LES MALADIES A PHYTOPLASMES (JAUNISSES)	6
II.1.3.3. LES MALADIES BACTERIENNES.....	6
II.1.3.4. LES MALADIES A NEMATODES	6
II.1.3.5. LES MALADIES FONGIQUES	7
II.2. LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE	7
II.2.1. DESCRIPTION DE LA MALADIE	7
II.2.1.1. SUR LES FEUILLES ET LES RAMEAUX	9
II.2.1.2. SUR LES INFLORESCENCES ET LES GRAPPES.....	9
II.2.2. L'AGENT CAUSAL DE LA MALADIE : <i>BOTRYTIS CINEREA</i> PERS. :FR.....	10
II.2.2.1. POSITION TAXONOMIQUE	10
II.2.2.2. DESCRIPTION DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	10
II.2.2.3. CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	12
II.2.2.4. DIVERSITE GENETIQUE DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	12
II.2.2.4.1. Marqueurs moléculaires utilisés pour l'étude de la diversité génétique de <i>Botrytis cinerea</i>	14
II.2.2.5. DIVERSITE PHENOTYPIQUE DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	17
II.2.2.5.1. Morphologie sur milieu de culture.....	17
II.2.2.5.2. Agressivité sur plantes	19
II.2.2.5.3. Réponse aux fongicides	19
II.2.3. LUTTE CONTRE LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE.....	21
II.2.3.1. LES MESURES PROPHYLACTIQUES	21

II.2.3.2. LA PROTECTION BIOLOGIQUE.....	22
II.2.3.3. LA LUTTE CHIMIQUE	22
III. MATERIEL ET METHODES	27
III.1. MATERIEL FONGIQUE	27
III.1.1. PROSPECTIONS ET ECHANTILLONNAGE	27
III.1.2. MILIEUX DE CULTURE UTILISES	27
III.1.3. ISOLEMENT	27
III.1.4. PURIFICATION ET CONSERVATION	27
III.1.5. IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON	29
III.2. MATERIEL VEGETAL	29
III.3. FONGICIDE UTILISE.....	29
III.4. DETERMINATION DES MORPHOTYPES.....	29
III.5. CROISSANCE MYCELIENNE	29
III.6. TEST DE VIRULENCE	30
III.7. SENSIBILITE AU FONGICIDE FENHEXAMIDE.....	31
III.8. DETECTION DES ELEMENTS TRANSPOSABLES.....	33
III.8.1. EXTRACTION DE L'ADN.....	33
III.8.1.1. PREPARATION DU MYCELIUM	33
III.8.1.2. PROTOCOLE D'EXTRACTION.....	33
III.8.2. ESTIMATION DE LA QUALITE ET DE LA CONCENTRATION EN ADN	34
III.8.3. DETECTION DES ELEMENTS TRANSPOSABLES PAR PCR	36
III.8.3.1. PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL	36
III.8.3.2. REALISATION DE L'AMPLIFICATION	36
III.8.3.3. VISUALISATION DES PRODUITS DE L'AMPLIFICATION.....	37
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	39
IV.1. DETERMINATION DES MORPHOTYPES	39
IV.2. CROISSANCE MYCELIENNE.....	40
IV.3. POUVOIR PATHOGENE DES ISOLATS.....	42
IV.4. SENSIBILITE AU FENHEXAMIDE	45
IV.5. DETECTION DES ELEMENTS TRANSPOSABLES	49
IV.5.1. CONTROLE DE LA QUALITE DES ADN EXTRAITS.....	49
IV.5.2. DETECTION DES ELEMENTS TRANSPOSABLES	51
IV.6. DISCUSSION	54
V. CONCLUSION	60
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63
ANNEXES	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	: Adénosine
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AFLP	: Amplified Fragment length Polymorphism
ANOVA	: Analysis Of Variance
ARN	: Acide ribonucléique
BET	: Bromure d'Ethidium
C	: Cytosine
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CI50	: Concentration d'Inhibition de 50% de la population.
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
dNTP	: désoxynucléotide tri Phosphate
DO	: Densité Optique
EDTA	: acide éthylène diamine tétracétique
G	: Guanine
IAM	: Indice d'Attaque Moyen
IGS	: Intergenic Spacer
ITAF	: Institut Technique de l'Arboriculture fruitière et de la Vigne
ITS	: Internal Transcribed Region
Kb	: Kilobases
LSD	: Least Significant Difference
LTR	: Long Terminal Repeat
ONCV	: Office National de la Commercialisation de Produits Vitivinicoles
pb	: paire de base
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar
PNDA	: Plan National de Développement Agricole.
q.s.p.	: quantité suffisante pour
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SCARs	: Sequence Characterized Amplification Regions
SDS	: Sodium-Dodecyl-Sulfate
SSRs	: Single Sequence Repeats
T	: Thymine
TAE	: Tris, Acétate, EDTA
Taq Polymerase	: <i>Thermus aquaticus</i> Polymerase DNA
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris-EDTA
UV	: Ultra Violet
vol	: volume

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CYCLE DE LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE (ELMER ET MICHAILIDES, 2007).....	13
FIGURE 2 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU TEST DE VIRULENCE	30
FIGURE 3 : BOITE DE PETRI CONTENANT LE MILIEU DE CULTURE ADDITIONNE DE FONGICIDE ET ENSEMENCEE PAR UN EXPLANT MYCELIEN DE 6MM DE DIAMETRE.....	31
FIGURE 4 : SOLUTIONS FONGICIDE PREPAREES POUR ETRE INCORPOREES AU MILIEU DE CULTURE	32
FIGURE 5 : LE SPECTROPHOTOMETRE NANODROP 2000	34
FIGURE 6 : DEPOT DES PRODUITS DE L'AMPLIFICATION DANS LES PUIITS ET CUVE D'ELECTROPHORESE UTILISEE POUR LA MIGRATION	37
FIGURE 7 : LE TRANSILLUMINATEUR GEL DOC XR MOLECULAR IMAGER (BIO RAD).....	37
FIGURE 8 : FREQUENCE DE DISTRIBUTION DES MORPHOTYPES	40
FIGURE 9 : VITESSE DE LA CROISSANCE MYCELIENNE DES ISOLATS	41
FIGURE 10 : CLASSEMENT DES ISOLATS TESTES EN FONCTION DES INDICES D'ATTAQUES MOYENS	45
FIGURE 11 : FREQUENCE DE DISTRIBUTION DES DEGRES DE RESISTANCE.....	48
FIGURE 12 : CLASSEMENT DES ISOLATS EN FONCTION DES DEGRES DE RESISTANCE.....	48
FIGURE 13 : POURCENTAGES D'INHIBITION PROVOQUES PAR LES DIFFERENTES DOSES DE FENHEXAMIDE	49
FIGURE 14 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES BOTY F4/BOTY R4 (ISOLATS BCV01 A BCV10).....	51
FIGURE 15 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES BOTY F4/BOTY R4 (ISOLATS BCV11 A BCV20).....	51
FIGURE 16 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES BOTY F4/BOTY R4 (ISOLATS BCV20 A BCV30).....	52
FIGURE 17 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES BOTY F4/BOTY R4 (ISOLATS BCV31 A BF2240)	52
FIGURE 18 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES F300/F1550 (ISOLATS BCV01 A BCV10).....	52
FIGURE 19 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES F300/F1550 (ISOLATS BCV11 A BCV20).....	53
FIGURE 20 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES F300/F1550 (ISOLATS BCV21 A BCV30).....	53
FIGURE 21 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES OBTENUS AVEC LA PAIRE D'AMORCES F300/F1550 (ISOLATS BCV31 A BF2240)	53

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : EVOLUTION DES SUPERFICIES DE LA PRODUCTION ET DU RENDEMENT VITICOLE DEPUIS LA MISE EN ŒUVRE DU PNDA A 2010.....	5
TABLEAU 2 : PRINCIPALES MALADIES FONGIQUES DE LA VIGNE	8
TABLEAU 3 : CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> SUR MILIEU MALT-AGAR	18
TABLEAU 4 : PRINCIPAUX AGENT BIOLOGIQUES DE LUTTE CONTRE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	23
TABLEAU 5 : PRINCIPALES MATIERES ACTIVES ANTI BOTRYTIS.....	24
TABLEAU 6 : CODE ET ORIGINE DES ISOLATS ETUDIES	28
TABLEAU 7 : SYSTEME DE NOTATION A 6 DEGRES D'ATTAQUE	31
TABLEAU 8 : DOSES DE FENHEXAMIDE UTILISEES POUR L'ETUDE DE LA SENSIBILITE DES ISOLATS	32
TABLEAU 9 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES POUR LA DETECTION DES ELEMENTS TRANSPOSABLES	36
TABLEAU10 : CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE DES ISOLATS.....	39
TABLEAU 11 : VITESSE MOYENNE DE LA CROISSANCE MYCELIENNE DES ISOLATS DE LA COLLECTION	41
TABLEAU 12 : CLASSEMENT DES VITESSES DE CROISSANCE MYCELIENNE DES ISOLATS.....	42
TABLEAU 13 : PHOTOS ET INDICES D'ATTAQUE MOYENS DES LESIONS PROVOQUEES PAR LES ISOLATS TESTES	43
TABLEAU 14 : POURCENTAGES D'INHIBITIONS PROVOQUEES PAR LES CINQ DOSES DE FENHEXAMIDE	46
TABLEAU 15 : CI50 ET DEGRES DE RESISTANCE DES ISOLATS TESTES.....	47
TABLEAU 16 : PURETES ET CONCENTRATIONS DES EXTRAITS D'ADN	50
TABLEAU 17 : ENSEMBLE DES RESULTATS OBTENUS LORS DES DIFFERENTS ESSAIS	57

LISTE DES PLANCHES

PLANCHE 1 : ASPECTS DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	11
---	----

INTRODUCTION

II. INTRODUCTION

La vigne est une plante très anciennement cultivée par l'homme, si bien que l'histoire de la viticulture et du vin se confond avec l'histoire de l'homme. De nos jours, les vignes couvrent près de 8 millions d'hectares dans le monde et produisent plus de 67 millions de tonnes de raisins (FAOstat, 2012). En Algérie, la viticulture a connu un important développement, notamment au cours de la dernière décennie. En effet la superficie du vignoble algérien est passée de 50000 hectares en 2000 à plus de 70000 en 2012.

De même que toutes les autres plantes cultivées la vigne est sujette à de nombreux problèmes sanitaires. Les parasites, les pathogènes ainsi que les conditions climatiques provoquent d'importantes pertes de récoltes au cours des années. Les champignons sont les agents qui causent les plus importants dégâts sur les vignes. Les maladies qu'ils provoquent sont très redoutées car ils peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante en occasionnant la diminution sensible du volume des récoltes ainsi que l'altération considérable de la qualité des produits (Robert, 2007).

De ce fait et dans le cadre de notre projet de recherche, nous nous sommes penchés sur les problèmes causés par les bio-agresseurs de la vigne. Notre modèle d'étude, *Botrytis cinerea* Pers. :Fr. (téléomorphe *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) est l'un des champignons les plus répandus dans les cultures, il est très polyphage et s'attaque à plus de 230 espèces de plantes cultivées et sauvages. Il est entre autre, l'agent responsable de la pourriture grise de la vigne.

Botrytis cinerea peut causer d'importants dégâts sur toutes les cultures attaquées car il a la capacité de se développer aussi bien en parasite qu'en saprophyte sur les débris végétaux. Il provoque ainsi des pertes correspondant à 20% des récoltes mondiales des cultures sensibles et dont le coût a été estimé à plus de 100 milliards d'euros par an. Dans les vignobles français, les pertes occasionnées peuvent atteindre 40% des récoltes (www.genoscope.cns.fr, 2008).

Botrytis cinerea est doté d'une grande variabilité génétique et phénotypique. Sa diversité génétique est attribuée à son état plurinucléé et hétérocaryotique, à l'état aneuploïde de ses noyaux aneuploïde, à la reproduction sexuée ainsi qu'à la présence d'éléments transposables (Faretra et Antonacci, 1987), alors que la diversité phénotypique serait due à divers mécanismes de répression de certains noyaux (Hamada *et al*, 1997) et s'exprime notamment par sa morphologie sur milieu de culture, son agressivité sur plante et sa réponse aux fongicides.

Au regard de l'importance de cet agent pathogène et au manque d'informations concernant la situation dans les vignobles algériens, il nous a été proposé d'étudier la diversité génétique d'un groupe d'isolats de *Botrytis cinerea* collectés à partir de vignobles situés dans 6 wilayates du nord de l'Algérie (Alger, Boumerdès, Bejaia, Jijel, Tipaza, Médéa).

La première partie de ce travail porte sur la description phénotypique de notre collection, à savoir la détermination des morphotypes, l'estimation de la vitesse de croissance mycélienne, le test de la pathogénicité ainsi que la sensibilité au fongicide Fenhexamide.

La seconde partie est une caractérisation génétique de nos isolats, et ce par la détection des éléments transposables par réaction d'amplification en chaîne (PCR).

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. LA VIGNE

La vigne *Vitis vinifera* L. est une plante lianescente à tiges sarmenteuses appartenant à la famille des Vitacées. Cette famille comprend quatorze genres, dont le genre *Parthenocissus* auquel appartiennent les vignes vierges originaires d'Asie et d'Amérique du Nord, et le genre *Vitis* originaire des zones tempérées de l'hémisphère nord.

II.1.1. ÉVOLUTION DE LA VITICULTURE EN ALGÉRIE

La vigne est une espèce cultivée depuis des temps immémoriaux en Europe, dans l'ouest de l'Asie (Moyen-Orient, Caucase), et dans le nord et l'extrême sud de l'Afrique. Dès l'antiquité, l'Afrique du nord produisait déjà des vins qu'elle exportait dans les territoires bordant la Méditerranée. On a trouvé en Algérie des traces certaines de cet ancien vignoble, notamment dans les ruines de Cherchell et de Tipaza (Soler, 2003). Après la conquête de l'Afrique du Nord par les Musulmans, les populations locales ne s'intéressent plus à la vigne que pour la production de raisins de table.

A l'arrivée des français en Algérie, en 1830, la vigne ne couvre que 2.000 hectares. Le vignoble algérien s'est constitué en deux temps. De 1878 à 1905, les plantations se poursuivent sans arrêt, elles se ralentissent quand le Phylloxéra parvient en Algérie et quand les colons doivent se résigner à remplacer les vignes françaises dépérissantes par des porte-greffes américains. Ce vignoble fit la prospérité de l'Algérie et il s'étendait en 1918 sur 200.000 hectares. La deuxième phase d'extension fut plus brève : entre 1929 et 1935. Les surfaces en production passent de 226.000 à 396.000 hectares (Larnaude, 1948). La production moyenne est de 17,5 millions d'hectolitres et les vins algériens sont alors d'excellente qualité. L'Algérie est le 4^e producteur mondial et la vente de ses vins représente 45 % de la valeur de ses exportations. Les vignes à raisin de table, couvrent 6.700 hectares et donnent une production de l'ordre de 25.000 à 30.000 tonnes.

Pendant la seconde guerre mondiale, les moyens réduits dont dispose l'Algérie, coupée de la Métropole, sont réservés par priorité aux cultures vivrières, la vigne périclité et les surfaces régressent. En 1947, il ne reste plus que 340.000 hectares et la production vinicole n'est plus que de 9 millions d'hectolitres.

Au cours de la période 1946 – 1952, 112.000 hectares de vignes sont replantés, la taille de rajeunissement est largement étendue et l'équipement des exploitations est modernisé. Fin 1952, la vigne couvre à nouveau 400.000 hectares (Soler, 2003).

Après l'indépendance, le blocage des vins d'Algérie en France et l'absence d'un marché intérieur incita le gouvernement algérien à reconsidérer sa politique vitivinicole. Les superficies consacrées à la vigne diminuent d'une manière importante et graduelle, elles sont tombées de 350.000 hectares en 1965 à 215.000 en 1977, et de 170.000 hectares en 1985 à 95.000 hectares en 1993, pour atteindre 51.000 hectares en 2000 (Abrous 1993).

Au cours de la dernière décennie, la viticulture algérienne a connu un développement très important, et ce depuis la mise en œuvre du PNDA. La superficie du vignoble a atteint 68669 hectares en 2012 avec une production de plus de 543000 tonnes (FAOSTAT, 2012). Actuellement l'Algérie occupe la 20^e place parmi les pays producteurs de raisins dans le monde. Le tableau 1 représente l'évolution des superficies, de la production et du rendement viticole depuis le lancement du PNDA.

Tableau 1 : évolution des superficies de la production et du rendement viticole depuis la mise en œuvre du PNDA à 2012.

Année	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Superficie (ha)	51010	51450	54200	60465	62532	69633	75187	76754	73739	69110	68700	72042	68669
Production (t)	30050	196159	234397	277968	283900	334021	398018	244999	401992	492525	582000	402592	543169
Rendement (Hg/ha)	20850	38126	43246	45971	45400	47968	52937	31920	54515	71266	84716	55883	79099

Source : FAOStat, 2012.

II.1.2. LES CÉPAGES CULTIVÉS

Un grand nombre de cépages sont cultivés en Algérie mais le marché algérien connaît la dominance d'un certain nombre de variétés, telles que Sabel, Cardinal et Ahmer bou Amar pour les cépages de table, et Carignan et Cinsault pour les cépages de cuve.

L'Arrêté du 27 novembre 2008 paru dans le journal officiel du 28 janvier 2009 fixe la liste provisoire des espèces et variétés viticoles de table (40 variétés), de cuve (31 variétés) de

séchage (5 variétés) ainsi que de porte-greffes (10 variétés) autorisées à la production et à la commercialisation (Annexe1).

II.1.3. LES MALADIES DE LA VIGNE

II.1.3.1. LES MALADIES VIRALES

Ces maladies sont très graves car les vignes infectées ne peuvent être traitées et constituent une source de contamination. Plus d'une soixantaine de virus différents peuvent attaquer la vigne (Du Preez *et al.*, 2011), ils provoquent des troubles entraînant la diminution du rendement, l'affaiblissement et le vieillissement prématuré des ceps, ainsi qu'une reprise difficile au greffage et au bouturage (Reynier, 2000). En Algérie, plusieurs virus ont été mis en évidence dont les types viraux du GLRaV agent de l'enroulement foliaire (Lehad *et al.*, 2013).

II.1.3.2. LES MALADIES À PHYTOPLASMES (JAUNISSES)

Les jaunisses de la vigne sont dues à la présence de l'agent vecteur et du matériel végétal porteur de la maladie (Reynier, 2000). Ce sont des maladies graves qui peuvent entraîner la diminution de la croissance, de la productivité des ceps et de la qualité des produits de la vigne. Chez celle-ci deux maladies importantes sont reportées : la flavescence dorée, une maladie de quarantaine transmise par la cicadelle *Scaphoïde ustitanus*, et le « bois noir », transmis par *Hyalesthes obsoletus* (Reynier, 2000).

II.1.3.3. LES MALADIES BACTÉRIENNES

Bien qu'ayant un développement sporadique et limité, les bactérioses de la vigne ne sont pas négligeables. Six genres bactériens sont signalés sur vigne : *Agrobacterium*, *Xyllophilus*, *Xylella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Enterobacter* (Boudon-Padieu *et al.*, 2000) ; toutefois, seulement deux bactéries causent des maladies assez graves : *Xylella fastidiosa* : agent de la maladie de Pierce (Varela *et al.*, 2001) et *Xanthomonas ampelina* : qui cause le « Bacterial blight » (Panagopoulos, 1998).

II.1.3.4. LES MALADIES À NÉMATODES

Elles sont particulièrement insidieuses et difficiles à diagnostiquer par l'observation car les symptômes induits sont souvent confondus avec des stress hydriques ou minéraux. Elles ne sont connues que depuis un siècle, et ce n'est que vers la moitié des années 1950 que les recherches ont montré qu'un large éventail de nématodes est inféodé la vigne (Raski, 1998).

Cinq genres de nématodes peuvent s'attaquer à la vigne : *Meloidogyne* (« Root-Knot Nematodes »), *Xyphinema* (« Dagger Nematodes »), *Longidorus* (« Needle Nematodes »), *Pratylenchus* (« Lesion Nematodes ») et *Tylenchulus* (« Slow Decline Nematodes »).

II.1.3.5. LES MALADIES FONGIQUES

La vigne est sensible à de nombreux champignons phytopathogènes qui causent des dégâts aux conséquences économiques graves. Certains de ces champignons s'attaquent aux racines et au bois causant des maladies de dépérissement telles que l'Esca et l'eutypiose; d'autres s'attaquent au feuillage et aux grappes comme le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise. Le tableau 2 regroupe les principales maladies fongiques, leurs agents causaux ainsi que les symptômes provoqués.

II.2. LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE

La pourriture grise de la vigne est une maladie très redoutée des agriculteurs et qui est due à *Botrytis cinerea* Pers. :Fr.

Botrytis cinerea est un champignon polyphage et ubiquiste (Agrios, 2005) et qui peut se présenter dans la nature sous trois formes caractéristiques (Galet, 1977) :

- * Une forme mycélienne stérile, qui provoque la « maladie de la toile » dans les caisses de greffes-boutures placées en stratification dans les chambres chaudes ;
- * Une forme conidienne appelée *Botrytis cinerea*, la plus répandue dans la nature et qui est retrouvée sur les fleurs, les fruits et les feuilles ;
- * Une forme parfaite, ascosporee et peu rencontrée dans la nature, appelée *Botryotinia fuckeliana*, observée sur les sarments de vigne à l'automne, sur les débris de culture au printemps ou sur les raisins de table conservés durant l'hiver en chambres froides.

II.2.1. DESCRIPTION DE LA MALADIE

Les symptômes de la pourriture grise apparaissent sur presque tous les organes de la vigne, mais ce sont les attaques sur grappes à partir de la véraison qui sont les plus préjudiciables (Reynier, 2000).

Tableau 2 : Principales maladies de la vigne dues aux champignons et oomycètes.

MALADIES	AGENTS CAUSAUX	SYMPTOMES
LES MALADIES DE DEPERISSEMENT		
ESCA	<i>Phaeoacremonium chlamydosporium</i> ; <i>P. aleophilum</i> ; <i>P. viticola</i> <i>Stereum hirsutum</i> <i>Phellinus punctatus</i>	-Sur feuilles : affaiblissement progressif avec taches jaunâtres ou rougeâtres et nécroses marginales (forme lente). -Dépérissement total du cep en quelques heures (apoplexie).
Eutypiose	<i>Eutypa lata</i>	Affaiblissement des rameaux, déformation et chlorose des feuilles, rabougrissement de la végétation.
Pourridiés	<i>Roesleria subterranea</i> . <i>Rosellinia necatrix</i> . <i>Armillaria mellea</i> .	-Dépérissement progressif, avortement des bourgeons, décoloration et chute prématurée des feuilles (forme lente). -Flétrissement brutal (apoplexie).
LES MALADIES DES PARTIES AERIENNES		
Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i>	« Tâches d'huile », et poussière blanchâtre à la face inférieure des feuilles. Sur fruits : poussière blanche « Rot Gris » ou taches livides brunissant et se déprimant « Rot Brun ».
Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i>	Sur rameaux : ponctuations noires ou lésions étendues, brun-marron, avec striations liégeuses ; détachement en hiver. Dessèchement partiel ou total de la grappe.
Anthraxose	<i>Elsinoë ampelina</i>	Lésions isolées brun violet sur rameaux ; sur feuilles : lésions similaires dont le centre devient grisâtre, se dessèche et tombe ; mêmes lésions sur les baies, le centre violet devient grisâtre, la nécrose atteint la pulpe, en les faisant éclater et écouler leur jus
Oïdium	<i>Erysiphe necator</i>	Sur rameaux : ralentissement de la croissance avec raccourcissement des entre-nœuds et revêtement d'une poussière blanche caractéristique. Sur feuilles : taches diffuses de poussière blanchâtre à la face supérieure. Sur baies : poussière grisâtre puis nécroses noires et éclatement.
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	Grappes pourries et recouvertes d'un feutrage grisâtre abondant.

D'après :Dubos, 1999, 2002;Reynier, 2000.

II.2.1.1. SUR LES FEUILLES ET LES RAMEAUX

C'est au cours des printemps humides et frais que se manifestent les symptômes sur les feuilles. Celles-ci présentent des tâches marginales brunâtres de forme triangulaire (Planche 1, A). Dans certains cas, ces taches se recouvrent d'un feutrage grisâtre correspondant aux fructifications asexuées du champignon (Reynier, 2000). En général, les attaques foliaires sont de faible gravité car seulement quelques feuilles par pied sont atteintes (Dubos, 1999).

Les infections des rameaux sont rares et se manifestent lors des printemps pluvieux par des nécroses brunes, recouvertes de fructifications correspondant à la forme conidienne du champignon. Elles entraînent généralement le flétrissement et le dessèchement de la partie du rameau située au-dessus (Reynier, 2000). Pendant le repos végétatif, des croûtes noires caractéristiques peuvent être observées sur les sarments mal aoûtés, ce sont les sclérotés (Planche 1, B) (Viret et Siegfried, 1995) ; ainsi que des blanchissements de l'écorce liés à la présence de mycélium sous l'épiderme (Dubos, 1999). Au printemps suivant, les sclérotés et les zones blanchies se recouvrent de conidiophores portant des conidies qui constituent une source de contamination des autres organes.

II.2.1.2. SUR LES INFLORESCENCES ET LES GRAPPES

Les attaques du champignon avant la floraison entraînent le dessèchement et la chute des boutons floraux (Reynier, 2000). A la floraison, le champignon peut se développer à la base de l'ovaire, à la limite du réceptacle de la fleur ou sur les capuchons floraux sénescents qui restent emprisonnés à l'intérieur de la grappe, constituant ainsi une importante source d'inoculum pour les attaques ultérieures sur le pédicelle, le rachis et les baies de la grappe.

Les attaques du pédicelle et du rachis se traduisent par de petites nécroses qui se développent en fonction des aléas climatiques et provoquent le flétrissement de la partie de la grappe se situant en dessous.

Les attaques du pédoncule de la grappe près du point d'attache sur le rameau provoquent le faciès « pourriture pédonculaire » ; la grappe se dessèche et tombe au sol, ou reste accrochée au sarment, mais ne mûrit pas convenablement (Dubos, 1999).

Les jeunes baies ne sont généralement réceptives qu'à la véraison. A ce stade, la contamination s'effectue soit par les conidies directement sur les blessures et les micro-blessures, soit par le mycélium déjà installé sur des débris végétaux coincés entre les baies (Anonyme, 2007). La baie devient progressivement marron clair (Planche 1, C),

les conidiophores apparaissent ensuite au niveau des lignes de fracture de la pellicule du fruit, qui selon les conditions climatiques, se ride et se ratatine.

A partir d'une baie attaquée, le champignon se développe pour envahir complètement l'ensemble de la grappe (Planche 1, D) (Dubos, 1999).

Pendant le stockage au froid des raisins de table, un mycélium gris, généralement stérile, se développe au niveau du rachis des grappes. Les baies infectées présentent des nécroses circulaires de couleur marron claire qui vont petit à petit envahir l'ensemble du fruit. Ensuite la pourriture se développe de proche en proche. Exceptionnellement, des apothécies apparaissent sur les grappes (Galet, 1977).

II.2.2. L'AGENT CAUSAL DE LA MALADIE : *BOTRYTIS CINEREA*PERS. :FR.

Botrytis cinerea Pers. :Fr. est un champignon nécrotrophe saprophyte (Whetzel, 1945) qui cause la pourriture grise sur de nombreuses espèces économiquement importantes (vignes et autres baies, fruits, légumes et plantes ornementales). Il a été identifié sur plus de 235 espèces (Mac Farlane, 1968).

II.2.2.1. POSITION TAXONOMIQUE

La grande variabilité phénotypique de ce champignon a conduit les mycologistes à le considérer comme un anamorphe collectif (Whetzel, 1945). *Botrytis cinerea* est un deuteromycète appartenant à la classe des hyphomycètes, l'ordre des moniliales et à la famille des moniliacées.

Le téléomorphe, *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel est rarement rencontré dans la nature. Il appartient au phylum des Ascomycota, au sous-phylum des Pezizomycotina, à la classe des Leotiomycetes, à l'ordre des Helotiales et à la famille des Sclérotiniacées.

II.2.2.2. DESCRIPTION DE *BOTRYTIS CINEREA*

Botrytis cinerea est un champignon polyphage se développant sur les tissus matures ou sénescents des plantes dicotylédones. Il peut demeurer quiescent durant de longues périodes avant de provoquer la pourriture des tissus, quand la physiologie de l'hôte se modifie et l'environnement devient favorable (Holz *et al.*, 2007). L'infection peut avoir lieu tout le long du cycle de développement de la plante, du semis à la maturation des fruits ; et des dommages sérieux peuvent se produire après la récolte, pendant le stockage, le transport et la commercialisation des produits.

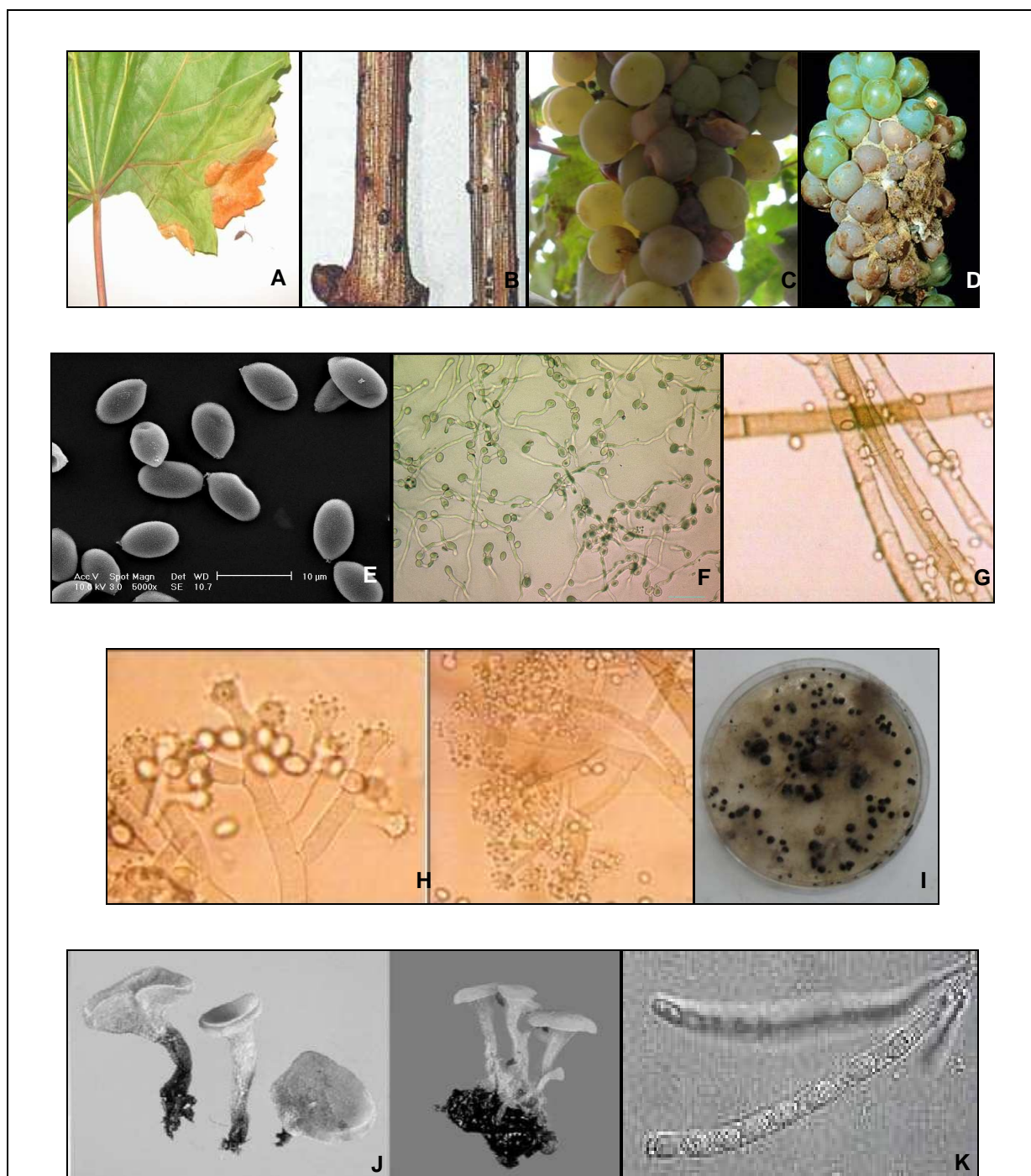


Planche 1 : Aspects de *Botrytis cinerea*.

A : Symptôme sur feuille de vigne (Bourahla, 2010) ; **B** : Sclérotés produits sur des sarments de vigne en hiver (Viret et Siegfried, 1995) ; **C** : Pourriture des baies. **D** : Pourriture de la grappe (Ajouz, 2009) ; **E** : Conidies observées au microscope électronique à balayage (Ajouz, 2009) ; **F** : Germination des conidies sous microscope optique (Ajouz, 2009) ; **G** : Mycélium sous microscope optique ; **H** : Conidiophores ramifiés sous microscope optique ; **I** : Sclérote formés sur une culture âgée en boîte de Pétri ; **J** : Apothécies du téléomorphe s'élevant sur un sclérote produit au laboratoire (Beever et Weeds, 2007) ; **K** : Asque avec huit ascospores (Viret et Siegfried, 1995).

La conidie, unicellulaire et dormante (Planche 1, E) marque le point de départ du cycle de *Botrytis cinerea*. Se retrouvant dans des conditions favorables, son métabolisme s'active, sa dormance se lève et les processus de divisions cellulaires s'entament. Une première cellule fille est produite, elle constitue le filament germinatif (Planche 1, F). Celui-ci va se diviser pour produire un hyphes qui va se ramifier et former un réseau de plus en plus important : le mycélium. Des facteurs nutritionnels et environnementaux vont inhiber cette croissance mycélienne et induire la formation de conidiophores (Planche 1, H), sur lesquels un grand nombre de conidies est produit. Le mycélium peut aussi donner naissance à des amas très denses et mélanisés, considérés comme des structures de résistance du champignon : les sclérotés (Planche 1, I). Ces sclérotés peuvent produire soit des conidiophores portant un grand nombre de conidies, soit des apothécies (Planche 1, J) portant de nombreux asques (Planche 1, K) et qui constituent la phase sexuée du champignon (Perret, 2001).

II.2.2.3. CYCLE BIOLOGIQUE DE *BOTRYTIS CINEREA*

Pendant l'hiver, *Botrytis cinerea* se conserve sous forme de sclérotés, de chlamydospores, de mycélium ou de conidies sur le bois et les débris végétaux. Au printemps, quand les conditions deviennent favorables, toutes ces structures germent produisant des conidiophores portant de grands nombres de conidies. Dispersées par le vent, la pluie et les insectes, ces conidies germent à la surface des organes et les infectent. Le champignon se développe alors et produit de nouvelles fructifications qui assureront la dissémination de la maladie durant l'été. En automne, quand les conditions climatiques redeviennent défavorables, le champignon produit des sclérotés, des chlamydospores ou resta dormant sous forme de mycélium ou de conidies au niveau du bois et des débris végétaux. La figure 1 représente le cycle détaillé de la pourriture grise de la vigne (Elmer et Michailides, 2007).

II.2.2.4. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *BOTRYTIS CINEREA*

La diversité génétique de *Botrytis cinerea* a longtemps été reportée. Elle est attribuée à l'état plurinucléé et hétérocaryotique du champignon, qui est principalement dû à l'anastomose mycélienne (Faretra et Antonacci, 1987), à la reproduction sexuée, à la présence d'éléments transposables, ainsi qu'à l'hétéropléidie des noyaux.

La reproduction sexuée se fait par le croisement d'isolats compatibles portant des allèles de type sexuels différents, MAT1-1 et MAT1-2. Les descendants obtenus sont tous hétérothalliques et portent l'un ou l'autre allèle du gène du type sexuel (Beever et Weeds, 200).

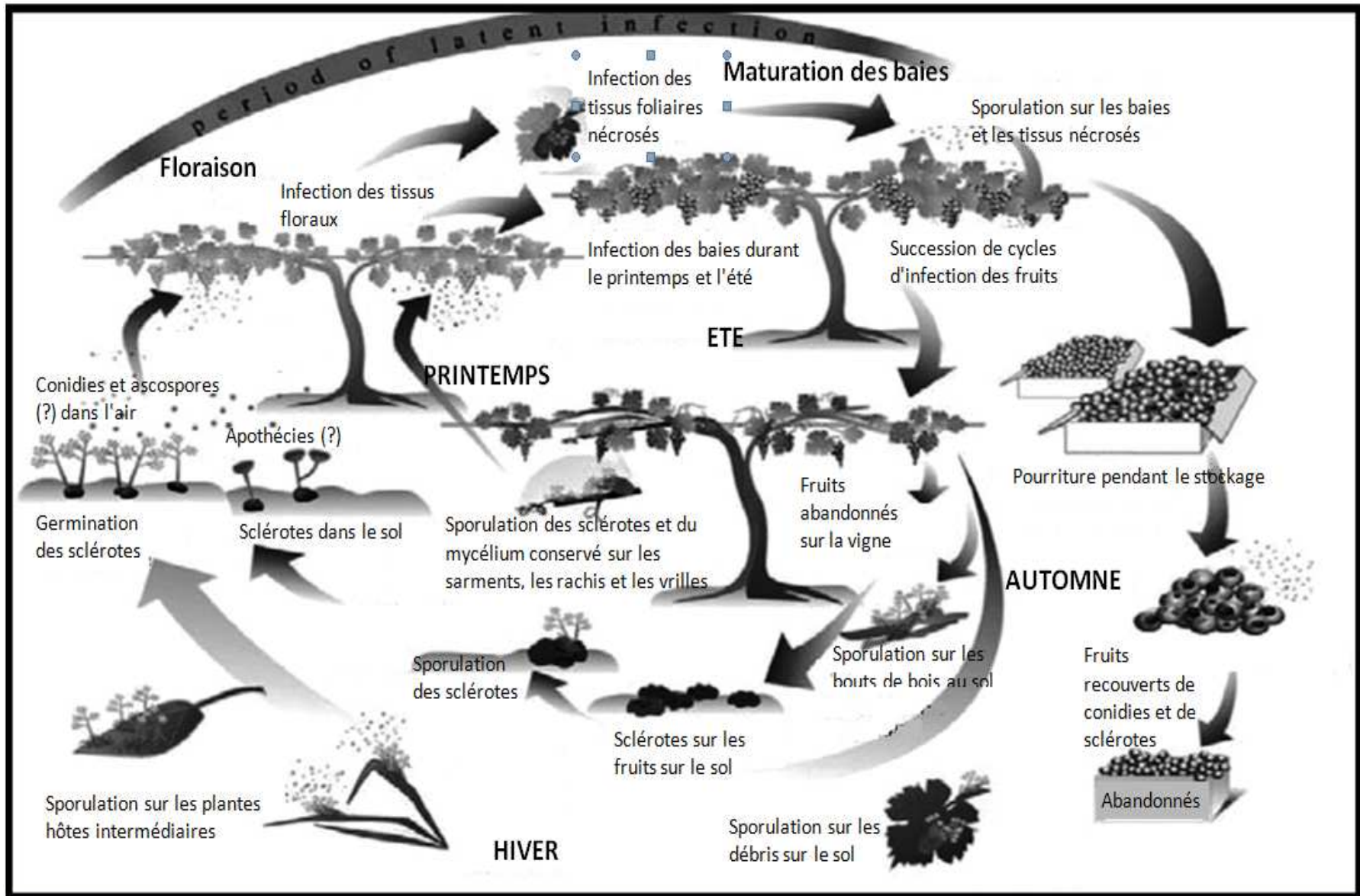


Figure 1 : Cycle de la pourriture grise de la vigne (Elmer et Michailides, 2007).

Bien que les apothécies soient rarement observées dans la nature, des études de génétique des populations semblent indiquer que la reproduction sexuée est plus importante que généralement supposée ; mais ceci dit, les conditions environnementales inhibent fortement la formation des apothécies, qui se développent généralement dans des sols humides et froids situés dans des zones ombragées (Lorbeer, 1980).

L'hétéropléidie chez les champignons peut être due à un dysfonctionnement mitotique ou à une perte ou un gain chromosomique lors de la fusion de noyaux. Différents degrés de pléidie ont été décrits chez *Botrytis cinerea*. Les isolats peuvent être haploïdes, diploïdes ou encore triploïdes (Büttner *et al.*, 1994).

La présence d'éléments transposables suggère que *Botrytis cinerea* est un complexe d'espèces avec un flux génétique restreint entre les groupes génétiques (Giraud *et al.*, 1997, 1999 ; Albertini *et al.*, 2003 ; Fournier *et al.*, 2003). Initialement, deux espèces sœurs sympatriques, ou types transposon, ont été décrits : *Vacuma*, qui ne possède aucun élément transposable et *Transposa*, possédant les deux éléments transposables Boty et Flipper, (Giraud *et al.*, 1997). Les isolats type *Vacuma* auraient des conidies plus grandes, une croissance mycélienne plus rapide et un mode de vie tendant vers le saprophytisme ; alors que les isolats du type *Transposa* semblent plus agressifs sur vigne (Martinez *et al.*, 2003 ; 2005).

Des études plus récentes des gènes nucléaires ont montré que les populations de *Botrytis cinerea* étaient regroupées en deux clades différentes dans la phylogénie, Groupe I et Groupe II (espèces phylogénétiques) (Albertini *et al.*, 2003 ; Fournier *et al.*, 2003, 2005). Les isolats du Groupe I sont exclusivement du type *Vacuma* et présentent une résistance naturelle au fongicide Fenhexamide ; alors que ceux du Groupe II peuvent être soit du type *Transposa*, *Flipper* (possédant l'élément transposable Flipper uniquement), *Boty* (possédant l'élément Boty uniquement) ou *Vacuma* (Fournier *et al.*, 2005 ; Ma and Michailides, 2005 ; Isenegger *et al.*, 2008 ; Esterio *et al.*, 2011).

II.2.2.4.1. MARQUEURS MOLÉCULAIRES UTILISÉS POUR L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *BOTRYTIS CINEREA*

De nombreux marqueurs moléculaires ont été adaptés pour l'étude de la diversité génétique de *Botrytis cinerea*, ils dérivent de deux principaux modes de préparation des fragments d'ADN à analyser :

- Soit l'ADN est découpé par des enzymes de restriction, séparé par électrophorèse, isolé à l'aide de sondes par hybridation moléculaire et analysé ;
- Soit l'ADN est amplifié à l'aide de paires d'amorces spécifiques, sans être découpé, par la réaction d'amplification en chaîne.

➤ Marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Ce marqueur repose sur la présence ou non d'un site de restriction. L'ADN à étudier est extrait puis digéré par une ou plusieurs endonucléases. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse puis sont transférés sur une membrane. Celle-ci est ensuite mise en contact avec une sonde marquée qui s'hybride alors avec elle. La membrane est ensuite mise en contact avec une sonde marquée qui s'hybride alors avec le ou les fragments compatibles et des profils de restriction sont obtenus. Ces profils sont analysés et permettent de mettre en évidence le polymorphisme. Cette technique de marquage moléculaire est très utilisée, car elle fournit des profils peu complexes permettant de caractériser l'empreinte génétique d'une espèce. Elle est fiable et robuste et les résultats observés peuvent être répétés. Toutefois, elle est lourde à mettre en œuvre car elle nécessite des quantités importantes d'ADN, une banque de sondes appropriées et l'étape de transfert et d'hybridation empêche une automatisation du travail.

Giraud *et al.* (1997) ont utilisé cette technique chez *Botrytis cinerea*, elle a permis de caractériser 27 allèles pour le gène de la région ribosomique IGS (Intergenic Spacer), 4 allèles pour le gène de l'ATP Synthase, 2 allèles pour le gène de l'ADP/ATP Translocase et 5 allèles pour le gène de la Nitrate Réductase. Ce polymorphisme serait dû à des mutations ponctuelles sauf pour le cas du gène de l'ATP Synthase où il est dû à la présence d'introns de tailles différentes.

➤ Marqueurs AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

C'est une technique combinée entre PCR et RFLP et basée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire. Le génome à étudier est digéré par des enzymes de restriction puis des adaptateurs nucléotidiques spécifiques complémentaires des extrémités générées par les digestions enzymatiques sont ligués. Ces fragments sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces oligo nucléotidiques complémentaires des séquences des adaptateurs, prolongées de quelques nucléotides arbitraires (bases débordantes). Après électrophorèse, des profils constitués des plusieurs dizaines de bandes distinctes sont obtenus puis analysés sur gel de polyacrylamide.

Ces marqueurs permettent un balayage rapide du génome complet pour identifier des polymorphismes (Najimi *et al.*, 2003). La mise en œuvre ne nécessite pas d'informations préalables au niveau des séquences d'ADN et les résultats sont reproductibles. En revanche, ils nécessitent une automatisation élevée pour leur analyse (Diguta, 2010).

Une étude comparative du polymorphisme existant chez *Botrytis cinerea* a été réalisée en utilisant des marqueurs RAPD et AFLP. Les dendrogrammes obtenus ont montré plus de polymorphisme avec la technique RAPD qu'avec la technique AFLP (Moyano *et al.*, 2003).

Une analyse du polymorphisme génétique d'une population de 206 isolats a révélé une grande diversité génétique et a permis de les classer dans 8 groupes génétiques mais aucune relation n'a été mise en évidence quant à l'origine géographique et la plante hôte (Valiuskaite *et al.*, 2010).

➤ **Marqueurs RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA**

Cette technique consiste à réaliser une PCR en utilisant une amorce courte (6 à 10 pb) non spécifique. L'amorce s'hybride au hasard dans le génome et amplifie une région donnée. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse et les profils permettent de mettre en évidence la variabilité. Cette technique est simple et facile à mettre en œuvre et ne nécessite pas des quantités importantes d'ADN ; mais elle présente une faible résolution et une reproductibilité moyenne. Les marqueurs RAPD sont utilisés pour des études de diversité intraspécifiques.

Des analyses RAPD de huit isolats de *Botrytis cinerea* ont révélé une grande variabilité génétique en raison d'un grand nombre de fragments polymorphiques obtenus (Pande *et al.*, 2010). Ces résultats ont permis de classer ces isolats en 3 groupes génétiquement distincts mais n'ont pas mis en évidence une relation entre l'agressivité, le groupe génétique et la distribution géographique, indiquant ainsi un flux génétique important entre les populations de *Botrytis cinerea*. L'analyse RAPD de la variabilité génétique de 20 isolats avec 4 amorces ont permis d'observer des fragments polymorphes et de distinguer 1 isolat supposé appartenir à une espèce voisine du *Botrytis cinerea*, le *Botrytis alcada* (Meamiche-Neddaf, 2010).

➤ **Marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)**

Appelée aussi PCR-RFLP, cette méthode consiste d'abord à amplifier un fragment d'ADN cible par une PCR classique puis à le digérer par une enzyme de restriction. Après électrophorèse, les profils obtenus sont spécifiques à une espèce ou à une souche.

Les marqueurs CAPS réalisées au niveau des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique ont montré que l'espèce *Botrytis cinerea* serait proche des espèces *Botrytis Byssoides* et *Botrytis Squamosa*. Les variations au niveau des régions ITS sont faibles et pas efficaces pour la détection d'amorces spécifiques à chaque espèce de *Botrytis sp* (Nielsen *et al.*, 2002). L'étude de région IGS (Intergenic Spacer) d'une population chilienne de *Botrytis Cinerea* présente, par contre, des différences significatives entre les isolats des différents hôtes.

➤ Marqueurs SSR – Microsatellites

Les microsatellites sont de courtes séquences constituées de 1 à 4 nucléotides répétées en tandem (SSR : Single Sequence Repeats) et distribuées à différents endroits du génome. Le nombre de répétitions est très variable d'un locus à un autre, ce qui donne des loci de différentes longueurs. L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme qui repose sur le nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. Ces loci sont amplifiés par PCR avec un amorce spécifique des bordures droite et gauche du microsatellite et peuvent servir de marqueurs moléculaires pour caractériser des populations d'espèces.

Des études ont permis de caractériser neuf microsatellites chez *Botrytis cinerea* (Fournier *et al.*, 2003). Karchani-Balma *et al.*, (2008) ont confirmé ces résultats sur une collection tunisienne de 153 isolats issus de différentes cultures. Cette collection présente une grande diversité génotypique qui modelée par le lieu d'échantillonnage (serre, plein champ), la plante hôte et l'origine géographique des isolats.

II.2.2.5. DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE DE *BOTRYTIS CINEREA*

Botrytis cinerea présente également une forte diversité phénotypique, notamment pour sa morphologie sur milieu de culture, son agressivité sur plante et sa réponse aux fongicides. Cette diversité serait due à divers mécanismes de répression de certains noyaux, conduisant à leur inactivation (Hamada *et al.*, 1997).

II.2.2.5.1. MORPHOLOGIE SUR MILIEU DE CULTURE





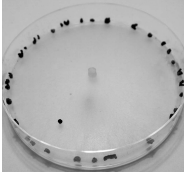

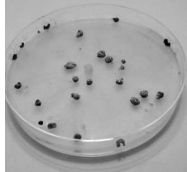
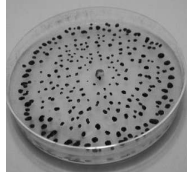
Martinez *et al.*, 2003 ont étudié la diversité morphologique du champignon sur milieu Malt-Agar. Les 111 isolats étudiés ont été classés visuellement en 8 types morphologiques : 4 mycéliens caractérisés par une quasi absence de sclérotés et 4 sclérotiens (Tableau 3).

Ces mêmes types morphologiques ont été décrits par Tanovicet *al.*, 2009. Ils ont testé 26 isolats sur milieu PDA et Malt-Agar. Les isolats étaient majoritairement du type sclérotiens sur milieu PDA (61.3%) alors que sur milieu Malt-Agar 50% était du type sclérotien et 50% mycélien. Aussi, la sporulation des isolats était notée chez 6.4% des isolats sur milieu PDA, alors que sur milieu Malt-Agar 36.7% des isolats avaient produit des conidies.

Parmi 39 isolats de *Botrytis cinerea* isolés de différentes plantes hôtes, 26 présentaient les caractères culturels communs du champignon sur milieu PDA (mycélium gris abondant et sporulation aérienne) ; les 13 autres isolats présentaient un mycélium moins aérien, une sporulation moins abondante, des sclérotés plus nombreux ainsi qu'une pigmentation jaune libérée dans le milieu de culture. Cette pigmentation n'a toutefois été détectée sur aucun autre

milieu de culture usuel tel que le Corn Meal Agar, Malt Extract Agar, Lima bean Agar et Cooke rose Bengal Agar (Rigotti *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Classification phenotypique de *Botrytis cinerea* sur milieu Malt-Agar

Type Mycélien « M »				
Représentation				
Phénotype	M1	M2	M3	M4
Mycélium	Rasant	Aérien	Masses Mycéliennes	Epais et dense
Sporulation	-	+	+/-	-
Sclérotos ⁽¹⁾	0	0	0	0
Type Sclérotien « S »				
Représentation				
Phénotype	S1	S2	S3	S4
Mycélium	Plutôt rasant	Plutôt rasant	Plutôt rasant	Plutôt rasant
Sporulation	+/-	+/-	+/-	-
Sclérotos ⁽¹⁾	En bordure des boites de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grande taille, éparpillé	Nombreux, petits et éparpillés

(1) Sclérotos : 0 : Absence ; 1 : rares ; 2 : très abondants.

D'après Martinez *et al.* ; 2003

II.2.2.5.2. AGRESSIVITÉ SUR PLANTES

L'agressivité sur plante a fait l'objet de nombreuses études. Tiedemann (1997) rapporte une différence d'agressivité sur haricots verts, *Phaseolus vulgaris*. Decognet *et al.*, (2009) ont

également montré une variation d'agressivité de 17 souches de *Botrytis cinerea* sur tomate. Sur vigne, 9 isolats sur 44 testés semblent incapables d'infecter des feuilles de vigne en conditions contrôlées de laboratoire (Mirzaei *et al.*, 2009). Meamiche-Neddaf (2010) a également observé une grande variabilité du pouvoir pathogène des isolats testés sur feuilles détachées de fève, de haricot, d'oignon, de tomate et de vigne.

II.2.2.5.3. RÉPONSE AUX FONGICIDES

De nombreuses familles de fongicides ont été développées contre *Botrytis cinerea* (Leroux 2007). Ils peuvent affecter la respiration fongique (Phényl piridinamines), Les microtubules (Benzimidazoles), l'osmorégulation (Phénylpyrroles, Dicarboximides), la biosynthèse des acides aminés (Anilinopyrimidines) et la biosynthèse des stéroïdes (Hydroxyanilides).

Différents niveaux de résistance aux fongicides ont été mis en évidence au sein des populations naturelles de *Botrytis cinerea*.

Les fongicides affectant la respiration fongiques sont de puissants inhibiteurs de la germination des conidies (Corbett *et al.*, 1984). Dans plusieurs pays Européens des cas de résistance au Dichlofluanide ainsi qu'au Chlorothalonil ont été rapportés. Les tests *in-vitro* du Dichlofluanide ont montré des niveaux de résistance modérés à faibles avec des rapports CI50 souches résistantes/.CI50 souches sensibles compris entre 2 et 20 (Malathrakis, 1989; Rewalet *et al.*, 1991; Pollastro *et al.*, 1996). Cette résistance serait déterminée par deux gènes majeurs, nommés *Dic1* et *Dic2* (Pollastro *et al.*, 1996).

Parmi les fongicides anti-microtubules, les Benzimidazoles ont été les premiers fongicides systémiques à large spectre d'activité utilisés. Chez *Botrytis cinerea*, ils inhibent la croissance mycélienne et causent la déformation des filaments germinatifs (Leroux *et al.*, 1999). Peu de temps après le début de l'utilisation des Benzimidazoles, plusieurs cas de résistances ont été enregistrés (Bollen et Scholten, 1971 ; Leroux et Clerjeau, 1985; Smith, 1988). La majorité des souches résistantes aux Benzimidazoles présentent des niveaux de résistances supérieurs à 1000, et sont simultanément très sensibles aux N-Phénylcarbammates (phénotype Ben R1, Leroux *et al.*, 1999). L'association de Carbendazime et de Diéthofénocarbe a provoqué l'apparition de souches résistantes aux deux fongicides (phénotype Ben R2 ; Leroux *et al.*, 1999). Ce phénotype a été détecté dans plusieurs pays et sur de nombreuses cultures, et il présente des niveaux modérés de résistance aux Benzimidazoles (niveaux de résistance compris entre 30 et 100) (Yarden et Katan, 1993; Nakazawa et Yamada, 1997). Chez les deux phénotypes, la résistance aux Benzimidazoles est conférée par des allèles d'un même gène appelé *Mbc1* codant pour la β -tubuline (Faretra et Pollastro, 1991).

Les Dicarboximides et les Phénylpyrroles sont des fongicides affectant l'osmorégulation. Ils provoquent des altérations morphologiques similaires (éclatement des extrémités des tubes

germinatifs), ils entraînent aussi l'accumulation cellulaire des polyols, glycérol, mannitol... Chez *Botrytis cinerea*, il a été démontré que les souches de laboratoire fortement résistantes à ces fongicides comportaient des mutations dans le gène *Os1* codant pour une protéine histidine-kinase (Leroux *et al.*, 2002a).

Les Anilinopyrimidines sont efficaces vis-à-vis d'une large gamme de champignons pathogènes car ils affectent la biosynthèse des acides aminés. Les essais *in-vitro* sur *Botrytis cinerea* ont révélés qu'ils inhibent fortement l'élongation des tubes germinatifs, mais leurs effets sur la croissance mycélienne varient en fonction du milieu de culture. Les prospections réalisées dans les vignobles de plusieurs pays (France, Suisse, Croatie, Chili...) ont détectés des souches fortement et spécifiquement résistantes (phénotype Ani R1 ; Birchmore et Forster, 1996; Leroux *et al.*, 1999). L'usage intensif des Anilinopyrimidines provoque le développement rapide de résistances (Forster et Staub, 1996; Latorre *et al.*, 2002; Petsikos-Panayotarou *et al.*, 2003).

Les Hydroxyanilides, tels que le fenhexamide sont des fongicides inhibant la biosynthèse des stéroïls (Rosslénbroich et Stuebler, 2000). Quand *Botrytis cinerea* est cultivé en présence de ce fongicide, le contenu en ergostéroïls est réduit, et trois 3-keto composés s'accumulent, suggérant l'inhibition de la 3-keto réductase, impliqués dans la C4- déméthylation (Debieu *et al.*, 2001).

Avant son lancement sur le marché, des souches résistantes au Fenhexamide ont été détectées. Il s'agit du phénotype Hyd R1, qui en fait, recouvre une entité génétique, pouvant correspondre à une espèce (Groupe I ou *B. pseudocinerea*) et appartenant au type *Vacuma*. On est alors en présence d'une résistance naturelle, qui pourrait être déterminée par une détoxification accrue du Fenhexamide et /ou par une cible peu sensible (Leroux *et al.*, 2002b). Dans les vignobles, les souches Hyd R1 ne semblent pas affecter les performances de cet anti-Botrytis (Sutty *et al.*, 1999; Baroffio *et al.*, 2003).

Le séquençage du gène (ERG27) codant pour la 3-keto réductase a montré que la protéine enzymatique codée est composée de 535 acides aminés (Albertini et Leroux, 2004). Une douzaine d'acides aminés différents ont été recensés entre les souches Hyd R1 et les souches non Hyd R1. Ce polymorphisme constitue une preuve supplémentaire de la différence génétique des deux groupes de souches (Groupe I et Groupe II) et suggère que la résistance *in-vitro* au Fenhexamide parmi les souches Hyd R1 résulterait de la baisse de sensibilité du site ciblé.

Chez certains isolats de *Botrytis cinerea* (Groupe II), la résistance (révélée par des tests *in-vitro*) n'est pas associée à une sensibilité accrue aux inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïls. Parmi ceux-ci, un phénotype (Hyd R2) est faiblement résistant au Fenhexamide au stade de

l'élongation des tubes germinatifs (Leroux *et al*, 2002a). La séquence du gène ERG 27 chez les isolats Hyd R2 est identique à celle des isolats non Hyd R1, ceci suggère que la résistance chez ces isolats se fait par le biais par le cytochrome P-450. Un deuxième phénotype (Hyd R3) est fortement résistant au Fenhexamide à tous les stades de développement. Le séquençage du gène ERG27 a révélé deux mutations expressives spécifiques à ce phénotype, l'isoleucine remplace la phénylalanine en position 412 et la thréonine remplace l'arginine en position 496. Ces résultats, ainsi que le fait que la 3-keto réduction ne soit pas affectée à des doses supérieures à 30mg/ml de Fenhexamide, suggèrent que la résistance chez ce phénotype serait due à une insensibilité du site cible. De ce fait, les souches du type Hyd R3 constituent une menace réelle pour l'avenir de l'utilisation du Fenhexamide et devraient faire objet d'un suivi rigoureux au sein des populations naturelles de *Botrytis cinerea* (Couteux et Lejeune, 2003).

II.2.3. LUTTE CONTRE LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE

À l'heure actuelle, il n'existe aucune variété commerciale résistante à la pourriture grise pour l'ensemble des cultures attaquées par le champignon (Dik et Wubben, 2004). La lutte contre *Botrytis cinerea* repose principalement sur l'utilisation des produits phytosanitaires, bien que d'autres moyens de lutte soient disponibles.

II.2.3.1. LES MESURES PROPHYLACTIQUES

Elles consistent à prendre des mesures culturales destinées à réduire les causes de développement de la maladie (Girard, 2001 ; Dubos, 1999) :

- En premier lieu, il est nécessaire de choisir des cépages dont la compacité des grappes n'est pas importante et des porte-greffes n'induisant pas de vigueur excessive, ce choix dépendant du cépage et des conditions environnementales (la nature du sol et sa fertilité, le régime hydrique, l'exposition...)
- Tenir compte d'un certain nombre de facteurs tels que l'orientation des rangs, la densité de plantation, le système de conduite... avant la plantation pour permettre une bonne circulation de l'air dans le vignoble ;
- Adopter ensuite des itinéraires culturaux ne favorisant pas l'excès de vigueur, l'entassement des grappes et l'abondance du feuillage ;
- Lutter efficacement contre les autres maladies et ravageurs (Oïdium, vers et tordeuses de la grappe...) qui pourraient constituer des portes d'entrée au *B. cinerea* dans les baies ;
- Eliminer les sources d'inoculum pouvant contaminer les grappes (baies endommagées, feuilles desséchées, rameaux portant des sclérotés, mauvaises herbes pouvant servir de relais au champignon...).

II.2.3.2. LA PROTECTION BIOLOGIQUE

Le contrôle biologique des maladies causées par le *Botrytis* au moyen de champignons filamenteux, levures, et bactéries a fait l'objet de nombreux travaux de recherche (Blakeman, 1993 ; Blakeman et Fokkema, 1982 ; Dubos, 1992 ; Tronsmo, 1992 ; Elad et Freeman, 2002 ; Elad et Stewart, 2007 ; Reynier, 2007 ; Bala et al, 2009). Le contrôle biologique offre des alternatives ou des compléments intéressants aux moyens de lutte conventionnels, surtout que ces agents biologiques sont moins préjudiciables à l'environnement et leur mode d'action, généralement complexe, est moins sujet au développement de résistances. L'estimation du marché mondial des produits fongicides anti-*Botrytis* varie entre 15 et 25 millions de dollars américains (Elad et Stewart, 2007). Ceci reflète le besoin de développer de nouveaux produits de bio-contrôle de meilleurs coûts, autant pour l'agriculture conventionnelle, que pour l'agriculture biologique.

Le comportement de *Botrytis cinerea* à la surface de l'hôte et l'importance relative des tissus nécrosés dans la culture entant que source d'inoculum déterminent la stratégie de lutte biologique à adopter. *Botrytis cinerea* est extrêmement sensible à la compétition de par sa dépendance aux sources exogènes de nutriments pour sa germination, la croissance du filament germinatif et l'infection. A la surface de la plante, les conidies et les tubes germinatifs sont sensibles aux antibiotiques et aux enzymes lytiques produites par les microorganismes (Elad et Stewart, 2007). Les principaux agents de lutte biologique contre *Botrytis cinerea* et leurs mécanismes d'action sont regroupés dans le tableau 4.

II.2.3.3. LA LUTTE CHIMIQUE

Le contrôle chimique reste toujours le principal moyen pour réduire l'incidence de la pourriture grise. La plupart des fongicides utilisés affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (Leroux, 2004) le tableau 5 regroupe les principales matières actives anti-*Botrytis*. Les interventions les plus communes consistent à pulvériser les parties aériennes avec le fongicide. Les doses d'application varient entre 250g/ha et 6000g/ha et le nombre de traitements durant une saison varie de un jusqu'à plus de vingt (Leroux, 2007).

Tableau 4 : Principaux agent biologiques de lutte contre *Botrytis cinerea*.

Agent	Type	Mécanismes d'Action
<i>Pseudomonas</i> spp.	Bactéries	Modification des propriétés de la surface de la plante hôte la rendant peu réceptive au champignon.
<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Candida pulcherrima</i>	levures	Attachement à la surface du pathogène et inactivation.
<i>Pseudomonas</i> sp <i>Candida oleophila</i>	Bactérie Levures	Compétition.
<i>Trichoderma</i> ; <i>Gliocladium</i> ; <i>Pythium</i> spp <i>Serratia</i> <i>plymuthica</i>	Champignons filamenteux Bactérie	Dégradation des parois cellulaires du pathogène et parasitisme.
<i>Trichoderma</i> et <i>Gliocladium</i> spp. <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Bacillus brevis</i> , <i>B. subtilis</i>	Champignons filamenteux Bactéries	Antibiose.
<i>Ulocladium atrum</i> <i>Serratia</i> <i>lique faciens</i>	Champignon filamenteux Bactérie	Suppression de la production d'inoculum par le pathogène.
<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Champignon filamenteux Bactérie	Induction de la résistance de l'hôte.
<i>T. harzianum</i> , <i>T. pseudokoningii</i> et <i>T. viride</i>	Champignons filamenteux	Combinaison de plusieurs mécanismes (hyperparasitisme résistance induite et antibiose).

D'après : Elad et Stewart, 2007.

Tableau 5 : Principales matières actives anti *Botrytis*.

Mode d'action biochimique	Famille chimique	Matière active	Spécialités commerciales	Doses d'application	Résistance
Affectant la respiration	Les Multi Sites				
	Dithiocarbamates	Thirame	Pomarsol, Thiram	2000 g/ha	Aucune
	Sulfamides	Dichlofluanide	Elvaron, Euparen	2000 g/ha	Modérée
	N-Chloroalkylmercaptane	Folpel	Folpan	1500 g/ha	Faible
	Découplage de la Phosphorylation Oxydative				
	Aminopyridine	Fluazinam	Frownicide, Shirlan	750 g/ha	Aucune
Anti-microtubules	Benzimidazole	Carbendazime	Bavistin, Derosal	500 g/ha	Elevée
	N-phénylcarbamate	Diéthofencarbe	Sumico ^a	500 g/ha	Elevée
Affectant l'osmorégulation	Dicarboximides	Iprodione	Kidan, Rovral	750 g/ha	Elevée
		Procymidone	Sumiclex	750 g/ha	Elevée
	Phénylpyrroles	Fludioxonil	Switch ^b , Geoxe	500 g/ha	Elevée
Affectant la biosynthèse des acides aminés et des protéines	Anilinopyrimidine	Cyprodinil	Chorus, Switch ^b	375 g/ha	Modérée à élevée
		Pyriméthanil	Scala	800 g/ha	
Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols	Triazoles	Tébuconazole	Folicur, Horizon	250 g/ha	Modérée à élevée
		Prochloraz	Octave, Sportak	250 g/ha	
	Hydroxyanilide	Fenhexamid	Teldor	750 g/ha	

a. Association : Carbendazime - Diéthofencarbe ; b. Association : Cyprodinil - Fludioxonil.

D'après : Leroux et Moncomble, 1993a et b ; Leroux *et al.*, 1998 ;

Leroux *et al.*, 2002 ; Leroux, 2007.

L'utilisation massive de produits phytopharmaceutiques a conduit au développement de souches résistantes à la majorité des familles chimiques de botryticides et est limitée par la perception publique négative dans le cadre de la sécurité alimentaire. En conséquent, les autorités de régulation de nombreux pays ont restreint l'usage de nombreux pesticides (Gullino et Kuijpers, 1994).

Plusieurs stratégies de lutte sont proposées :

- **La méthode dite « standard »** : fait référence à quatre périodes d'intervention :
 - en début nouaison ;
 - à la fermeture de la grappe ;
 - en début véraison ;
 - trois semaines avant les vendanges.

Cette méthode qui a été mise au point par Agulhon (1980) consiste à réaliser quatre traitements systématiques. Elle a donné des résultats satisfaisants jusqu'à l'apparition des résistances aux Benzimidazoles et aux Imides cycliques. L'application de ces quatre traitements représente aussi un coût très élevé.

- **La lutte raisonnée** : repose sur l'évaluation du risque réel des dégâts dus à la pourriture grise. Pour cela des modèles sont construits comme outils d'aide à la décision :
 - Soit en appréciant l'intensité des atteintes en suivant le comportement épidémiologique du champignon à partir du système parasite-vigne-environnement, c'est le modèle **EPI (Etat Potentiel d'Infection)** ;
 - Soit en appréciant la variation de réceptivité de la grappe vis-à-vis de *Botrytis cinerea*, ce sont les modèles de **Potentiel Système Pourriture Grise**. Ce sont des modèles construits à l'aide de données climatiques et posant comme principe que le champignon possède une énergie constante et qu'il est présent en permanence en quantité suffisante pour provoquer une infection.

Ce sont les Avertissements Agricoles et les organismes de conseil qui manipulent ces modèles et préviennent de l'opportunité d'un traitement. Les stratégies de traitement tiennent compte de la sensibilité et de la réceptivité des cépages ainsi que de l'alternance des familles chimiques des fongicides utilisés afin de limiter le développement de résistances.

MATERIEL ET METHODES

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1. MATÉRIEL FONGIQUE

III.1.1. PROSPECTIONS ET ÉCHANTILLONNAGE

L'étude a été menée sur une collection de 39 isolats de *Botrytis cinerea* et 2 isolats de *Botrytis fabae*. Les prospections ont été réalisées dans 6 wilayates (Alger, Boumerdès, Bejaia, Jijel, Tipaza, Médéa) et ont visé principalement les vignobles. Le tableau 6 présente tous les isolats étudiés ainsi que la date et le lieu de leur prélèvement.

III.1.2. MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

Botrytis cinerea étant un champignon polyphage et peu exigeant, les milieux de culture utilisés pour l'isolement, la culture et la conservation des isolats ainsi que pour les différents tests sont le PDA (Potato Dextrose Agar) et le Malt-Agar. Ce sont des milieux organiques de base dont les compositions sont en annexe (Annexe 2).

III.1.3. ISOLEMENT

Après prélèvement des échantillons, ceux-ci sont conservés au réfrigérateur à 4°C. jusqu'au moment de les utiliser. Par la suite, ses échantillons sont répertoriés et découpés en morceaux pour être incubés en chambre humide. Au bout de 48 à 72 heures les conidiophores naissant du champignon sont observés. A l'aide d'une pipette Pasteur effilée quelques conidiophores sont prélevés sous la loupe binoculaire et déposés sur du milieu PDA préalablement coulé en boîtes de Pétri stériles. Les boîtes ainsi inoculées sont mises à incuber dans la chambre d'incubation du laboratoire à une température de 20°C. ($\pm 2^\circ\text{C}$.) et sous lumière blanche continue.

III.1.4. PURIFICATION ET CONSERVATION

- Purification par repiquages successifs : Dès l'apparition des jeunes colonies ayant les caractéristiques du champignon recherché, celles-ci sont repiquées plusieurs fois de suite et ce dans le but de se débarrasser des contaminations fongiques et bactériennes.
- Purification par la culture monospore : A partir de cultures âgées de 7 à 10 jours, des explants mycéliens sont prélevés pour servir à la préparation de suspensions de spores dont la concentration est ajustée à 10^2 à 10^3 spore/ml. 0,5 ml de chaque suspension sont prélevés et étalés sur une fine couche d'eau gélosée (à 2%) coulée en boîte de pétri. Après 24 à 48 heures d'incubation, les spores en germination sont repérées sous loupe binoculaire, prélevées individuellement et repiquées sur du milieu PDA. Les colonies ainsi purifiées sont repiquées pour servir aux différents essais.
- Conservation : Les isolats purifiés sont conservés en tubes à essai avec capuchon vissé à 4°C. sur du milieu Malt-Agar à 1%. Tous les 6 mois, des repiquages sont effectués afin de maintenir la collection.

Tableau 6 : Code et origine des isolats étudiés.

CODE	ANNEE D'ISOLEMENT	HÔTES	ORIGINE
BCV01	2011	Vigne - Sabel	SI MUSTAPHA (BOUMERDES)
BCV02	2011	Vigne – Red Globe	SI MUSTAPHA (BOUMERDES)
BCV03	2011	Vigne - Sabel	BORDJ M'NAÏL (BOUMERDES)
BCV04	2011	vigne - Sabel	BORDJ M'NAÏL (BOUMERDES)
BCV05	2011	vigne - Sabel	BORDJ M'NAÏL (BOUMERDES)
BCV06	2011	vigne - Sabel noir	SIDI DAOUD (BOUMERDES)
BCV07	2011	vigne - Sabel	DELLYS (BOUMERDES)
BCV08	2011	Vigne - Carignan	ONCV BOURKIKI (TIPAZA)
BCV09	2008	Vigne – Dattier de Beyrouth	ITAF TESSALA MERDJA (ALGER)
BCV10	2011	Vigne - Carignan	ONCV AHMER EL AÏN (TIPAZA)
BCV11	2011	Vigne – Pinot noir	K'HRECIA (ALGER)
BCV12	2011	Vigne – Sabel	MEDEA
BCV13	2011	Vigne – Sabel	MEDEA
BCV14	2010, (Nador)	Vigne – Sabel	MEDEA
BCV15	2010, (Nador)	vigne – Sabel	MEDEA
BCV16	2010, (Nador)	vigne – Sabel	AMIZOUR (BEJAÏA)
BCV17	2010, (Nador)	vigne – Sabel	AMIZOUR (BEJAÏA)
BCV18	2010, (Nador)	vigne – Sabel	OUED GHIR (BEJAÏA)
BCV19	2010, (Nador)	vigne – Sabel	OUED GHIR (BEJAÏA)
BCV20	2010, (Nador)	vigne – Sabel	OUED GHIR (BEJAÏA)
BCV21	2010, (Mechaiï)	vigne – Sabel	MEDEA
BCV22	2010, (Mechaiï)	vigne – Sabel	MEDEA
BCV23	2010, (Mechaiï)	vigne – Sabel	MEDEA
BCV24	2010, (Mechaiï)	vigne – Sabel	MEDEA
BCV25	2010, (Mechaiï)	Vigne – muscat	ITAF TESSALA MERDJA (ALGER)
BCV26	2010, (Mechaiï)	Vigne – Dattier de Beyrouth	ITAF TESSALA MERDJA (ALGER)
BCV27	2011, (Dernane)	Vigne, Sabel	Jijel
BCV28	2011, (Dernane)	Vigne, Sabel	Jijel
BCV29	2011, (Dernane)	Vigne, Sabel	Jijel
BCV30	2009, (Bourahla)	Vigne - Sabel	BOUMERDES
BCV31	2010, (Nador)	Vigne – Sabel	AMIZOUR (BEJAÏA)
BCV32	2010, (Nador)	Vigne – Sabel	AMIZOUR (BEJAÏA)
BCV33	2010, (Nador)	Vigne - Sabel	AMIZOUR (BEJAÏA)
BCB	2012, (Abdellah)	Blé (agar test)	SETIF
BCPC	2011	Pois chiches	OUED SEMAR
BCR1	2011	Rose (blanche)	
BCR2	2011	Rose (jaune)	
BCR3	2011	Rose (rose)	
BCR4	2011	Rose (rouge)	
BF2219 (<i>Botrytis fabae</i>)		Fève	Mycothèque ENSA
BF2240 (<i>Botrytis fabae</i>)		Fève	Mycothèque ENSA

III.1.5. IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON

Les isolats de *Botrytis cinerea* sont identifiés sur la base des symptômes provoqués, de la morphologie des colonies et de l'observation microscopique des conidies et conidiophores.

III.2. MATÉRIEL VÉGÉTAL

L'étude du pouvoir pathogène de notre collection d'isolats a été réalisée sur des explants foliaires issus de vignes du cépage Muscat d'Alexandrie qui est moyennement sensible à la pourriture grise de la vigne (ITAF, 2003).

III.3. FONGICIDE UTILISÉ

Le Fenhexamide (ou KBR 2738) est un fongicide appartenant à la famille chimique des Hydroxyanilides, mis au point à la fin des années 1990 par Bayer Crop Science. Il affecte la biosynthèse de l'ergostérol qui est le principal stérol présent chez les champignons filamenteux. Il a une action préventive spécifique à la pourriture grise et aux monilioses. La spécialité commerciale porte le nom de Teldor® et contient 50% de matière active et son usage est préconisé à la dose de 750 g/Ha. La fiche technique du Fenhexamide est en Annexe 3.

III.4. DÉTERMINATION DES MORPHOTYPES

Cette classification morphologique de *Botrytis cinerea* a été décrite par Martinez *et al.*, (2003). Les isolats sont cultivés à raison de trois répétitions dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Malt-Agar à 20°C et à l'obscurité pendant 21 jours. Des observations macroscopiques sont réalisées et les phénotypes sont décrits sur la base de l'aspect mycélien, l'abondance de la sporulation et sur la formation de sclérotés. Les phénotypes des isolats sont classés selon les huit types morphologiques décrits par Martinez *et al.*, (2003) (Tableau 3, partie Bibliographie).

III.5. CROISSANCE MYCÉLIENNE

L'estimation de la vitesse de croissance mycélienne de nos 41 isolats se fait par dépôt sens dessus-dessous d'un explant mycélien de 6 mm de diamètre, prélevé à la périphérie d'une culture âgée de 4 jours, au centre d'une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu Malt-Agar. Ces boîtes sont mises à incuber à 20°C. (Température optimale de croissance de *Botrytis cinerea*) et à l'obscurité, à raison de trois boîtes par isolat.

Les boîtes ainsi incubées sont quotidiennement observées. Au bout du 3^{ème} jour d'incubation deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie sont mesurés et un diamètre moyen est calculé. A partir de là, la vitesse moyenne de chaque isolat est estimée

Les résultats obtenus lors de ce test ont subi une analyse de la variance (ANOVA à 1 facteur) ainsi qu'un test des étendues multiples (LSD de Fisher) au moyen du logiciel Minitab version 16.2.1.

III.6. ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGÈNE

La pathogénicité des 41 isolats a été testée sur de jeunes feuilles détachées de vignes du cépage Muscat d'Alexandrie. Les feuilles sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium, séchées entre deux feuilles de papier absorbant stérile et des disques de 2,5 cm de diamètre sont prélevés. Ces disques foliaires sont inoculés par dépôt, sur la face supérieure, d'un explant mycélien de 6 mm de diamètre et incubés en chambre humide (i.e. boîte de Pétri en verre tapissées de papier absorbant stérile, régulièrement humidifié avec de l'eau distillée stérile) pendant 6 jours à 20°C. et sous lumière blanche continue (Martinez *et al.*, 2003). 4 disques par isolat et par boîte sont inoculés (Figure 2). Les témoins de l'expérience sont des disques foliaires non inoculés et incubés dans les mêmes conditions.

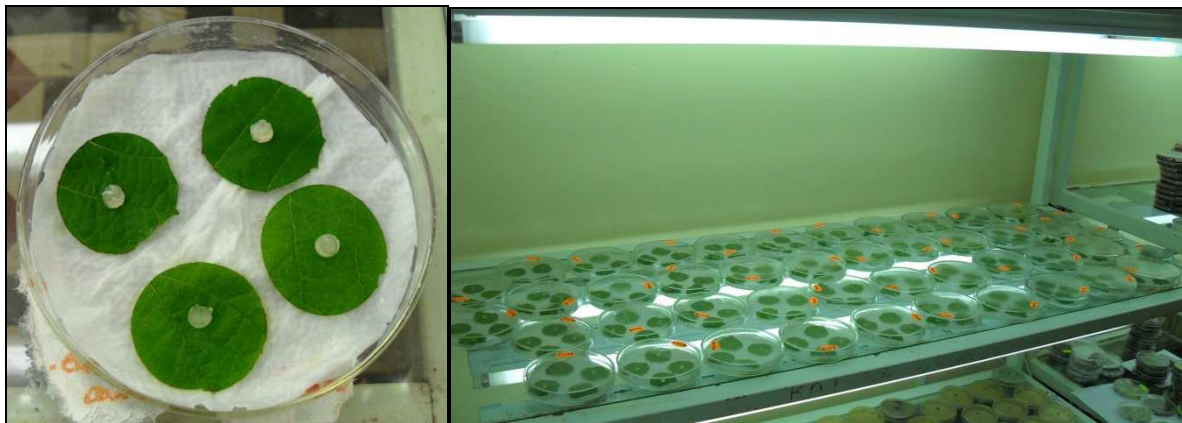


Figure 2 : Dispositif expérimental du test de virulence

Le développement de la maladie sur chaque disque est estimé visuellement selon une échelle semi-quantitative à 6 degrés (tableau 7) et un indice d'attaque moyen (IAM) est calculé selon la formule de Macartney *et al.*, (2002) :

$$\text{IAM} = \frac{\text{Somme des degrés d'attaque des feuilles}}{\text{nombre des feuilles observées}}$$

(CI50) de référence (D2) (Korolev *et al.*, 2011). Le tableau 8 représente les doses de Fenhexamide utilisées dans ce test.



Figure 4 : Solutions fongicides préparées pour être incorporées au milieu de culture.

Tableau 8 : Doses de Fenhexamide utilisées pour l'étude de la sensibilité des isolats

Dose	Concentration en matière active (µg/ml)
D1	0,005
D2	0,01
D3	0,1
D4	1,0
D5	10,0

Trois (03) boîtes par dose et par isolat ont été cultivées à 20°C et à l'obscurité pendant 4 jours. Au terme de ce délai deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie sont mesurés et un pourcentage d'inhibition, par rapport au témoin, est calculé.

$$I\% = \frac{D_t - D_x}{D_t} \times 100$$

Où : D_t : Diamètre de la colonie du témoin
 D_x : Diamètre de la colonie à la dose x

A partir des pourcentages d'inhibition calculés, des courbes Dose/Réponse sont tracées, les CI50 sont calculées, les groupes de sensibilité sont décrits (les isolats sont considérés comme résistants si la CI50 est supérieure à la Dose Discriminante qui est de 0,1 µg/ml) et les facteurs de résistance sont estimés (ratio CI50 isolat testé/CI50 de référence) (Leroux 2007 ; Baroffio *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus lors de ce test ont subi une analyse de la variance (ANOVA à 2 facteurs) ainsi qu'un test des étendues multiples (LSD de Fisher) au moyen du logiciel Minitab version 16.2.1.

III.8. DÉTECTION DES ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES

Boty est un retrotransposon de 6kb caractérisé par une LTR (Long Terminal Repeat), présent en de multiples copies dans différentes régions du génome de *Botrytis cinerea* (Diolez *et al.*, 1995 ; Giraud *et al.*, 1999). *Flipper* est un élément transposable mobile de 1842 pb présent en une vingtaine de copies par génome (Levis *et al.*, 1997). Les isolats de *Botrytis cinerea* (Type *Transposa*) possèdent ces deux éléments transposables alors que d'autres (Type *Vacuma*) n'en possèdent aucun. D'autres encore peuvent ne posséder qu'un seul transposon, *Boty* ou *Flipper* (Giraud *et al.*, 1999 ; Muñoz *et al.*, 2002 ; Albertini *et al.*, 2003).

Initialement, la méthode d'hybridation Dot Blot était utilisée pour la détection des éléments transposables chez *Botrytis cinerea*. Plus récemment des techniques basées sur la PCR ont été développées (Muñoz *et al.*, 2002).

III.8.1. EXTRACTION DE L'ADN

De nombreux protocoles d'extraction d'acides nucléiques ont été décrits pour *Botrytis cinerea*. L'un des plus courants est celui à base de CTAB (Cethyl Trimthyl Ammonium Bromide), il a été élaboré pour la première fois par Murray et Thompson en 1980 (Murray et Thompson, 1980) et publié en 1987 par Wagner *et al.* Ce protocole est adapté pour l'extraction et la purification d'ADN de végétaux et de champignons et convient particulièrement pour la suppression des composés polyphénoliques affectant la pureté de l'ADN et donc la qualité de l'extrait. Plusieurs variantes ont été élaborées pour adapter ce protocole aux entités biologique à analyser.

III.8.1.1. PRÉPARATION DU MYCÉLIUM

Le mycélium ayant servi à l'extraction de l'ADN a été obtenu à partir de cultures en boîte âgées de 7 jours. Ces cultures ont été grattées à l'aide d'une spatule et le mycélium récupéré dans des micro-tubes de 2ml et conservé à -20°C. jusqu'au moment de l'extraction.

III.8.1.2. PROTOCOLE D'EXTRACTION

Le principe général de l'extraction de l'ADN repose sur quatre étapes majeures :

- Lyse des cellules par un tampon de lyse à base de détergent (le CTAB) ;
- Elimination des protéines et débris cellulaires à l'aide de solvants organiques (mélange chloroforme – alcool isoamilique) ;
- Précipitation de l'acide nucléique par de l'isopropanol froid ;
- Réhydratation et conservation de l'ADN dans un tampon Tris-EDTA ;

Le protocole détaillé est décrit dans la planche 2 et la composition des différentes solutions utilisées décrite dans l'annexe 4.

III.8.2. ESTIMATION DE LA QUALITÉ ET DE LA CONCENTRATION EN ADN

Les acides nucléiques peuvent être mesurés directement dans des solutions aqueuses en mesurant la densité optique dans une longueur d'onde spécifique. Si l'échantillon est pur, la mesure spectrophotométrique est une opération facile et précise. La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par des mesures effectuées à une longueur d'onde de 260nm. L'interférence par des contaminants se reconnaît par le calcul d'un ratio : DO_{260}/DO_{280} (l'absorption à 280nm reflète la contamination par des protéines). Ce ratio est donc utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. Un ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis qu'un ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Un échantillon pur doit donc avoir un ratio DO_{260}/DO_{230} d'environ 2,2.

Quant à la concentration (c) d'une solution donnée en un acide nucléique spécifique, elle se calcule à l'aide des équations suivantes :

- * ADN monobrin: $c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = DO_{260}/0,027$.
- * ADN double brin $c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = DO_{260}/0,020$.
- * ARN $c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = DO_{260}/0,025$.

L'estimation de la qualité et de la concentration en ADN de nos extraits a été réalisée au moyen du spectrophotomètre NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientifique) au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du CNCC. Cet appareil (figure 5), lié à un ordinateur, permet de réaliser des spectres d'absorbance sur une large gamme de longueurs d'ondes (dans le visible et l'UV) en utilisant de très faibles volumes (0,5 à 2 μ l), et ce sans avoir recours à des cuves et aux dilutions.



Figure 5 : le spectrophotomètre NanoDrop 2000.

Protocole d'extraction d'ADN à base de CTAB

(Leyronas, 2005)

- 1) Remplir le 1/3 du micro-tube de 2ml par du mycélium et ajouter 900µl de tampon de lyse CTAB (avec 0,2% de mercaptoéthanol) à 65°C. Agiter à l'aide d'un cure-dent, vortexer et incubé 30 mn à 65°C. avec agitation.
- 2) Additionner 900µl de mélange chloroforme-alcool isoamilique (24 :1 vol : vol) et mettre en agitation rotative pendant 20mn.
- 3) Centrifuger 10mn à 15000 g.
- 4) Répéter l'opération (élimination des protéines) en transférant la phase aqueuse (supérieure) dans un tube contenant 500µl de mélange chloroforme-alcool isoamilique (24 :1 vol :vol) et agiter pendant 10mn.
- 5) Centrifuger 10mn à 15000 g.
- 6) Transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un autre micro-tube contenant 500µl d'isopropanol froid (-20°C.) et agiter à la main jusqu'à précipitation de l'acide nucléique. Mettre au réfrigérateur (à 4°C.) pendant 30mn.
- 7) Centrifuger 10mn à 15000g.
- 8) Éliminer le surnageant en vérifiant la présence du culot d'ADN.
- 9) Ajouter 500µl de tampon de lavage et incubé à 4°C. pendant 1h.
- 10) Centrifuger 10mn à 15000g.
- 11) Éliminer le surnageant, égoutter sur du papier absorbant et placer les tubes ouverts sous la hotte jusqu'à évaporation totale du tampon.
- 12) Reprendre le culot d'ADN dans 500µl de tampon TE et conserver à 4°C.

III.8.3. DÉTECTION DES ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES PAR PCR

La détection des éléments transposables se fait au moyen des paires amorces PCR F300/F1550 (Levis *et al.*, 1997) pour Flipper et BotyF4/BotyR4 (Ma et Michailides, 2005) pour Boty. La paire F300/F1550 amplifie un fragment de 1250 pb représentant Flipper et la paire Boty F4/Boty R4 amplifie un fragment de 510 pb. Les séquences des deux paires d'amorces figurent dans le tableau 9.

Tableau 9 : séquences des amorces utilisées pour la détection des éléments transposables.

Amorce	Séquence
F300	5'- GCA CAA AAC CTA CAG AAG A -3'
F1550	5'- ATT CGT TTC TTG GAC TGT A -3'
BotyF4	5'- CAG CTG CAG TAT ACT GGG GGA -3'
BotyR4	5'- GGT GCT CAA AGT GTT ACG GGA G -3'

III.8.3.1. PRÉPARATION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur C1000™ Thermal Cycler BIO RAD dans un volume réactionnel total de 50µl comprenant :

- ✓ 3µl d'extrait d'ADN
- ✓ 0,2mM de chaque amorce
- ✓ 0,2mM de chaque dNTP
- ✓ 2,0mM de MgCl₂
- ✓ 2 Unités de *Taq* Ploymérase
- ✓ 10µl de tampon d'amplification
- ✓ Eau ultra-pure qsp 50µl.

III.8.3.2. RÉALISATION DE L'AMPLIFICATION

L'amplification a été réalisé selon les conditions décrites par Ma et Michailides (2005) et qui se déroule comme suit :

- Une phase de préchauffage de 3mn à 95°C.
- 40 cycles :
 - dénaturation : 40s à 94°C.
 - Hybridation de l'amorce : 40s à 60°C. (pour la paire d'amorces F300 et F1550), ou à 68°C. (pour la paire d'amorces Boty F4 et Boty R4)
 - Extension : 1mn à 72°C.
- Une phase d'extension finale de 10mn à 72°C.

III.8.3.3. VISUALISATION DES PRODUITS DE L'AMPLIFICATION

Les produits de la PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%. Le gel est préparé en dissolvant 1,5g d'agarose pure dans 100ml de tampon TAE (annexe 5), coulé sur un support contenant un peigne pour la formation des puits et après solidification mis dans la cuve d'électrophorèse contenant du TAE.

Les produits de l'amplification sont déposés à raison de 8 μ l par puits et un marqueur de poids moléculaire est déposé en parallèle afin de pouvoir déterminer la taille des fragments amplifiés (figure 6).

La migration est réalisée en soumettant le gel à un courant électrique continu de 100 volts pendant 30 minutes puis le gel est immergé dans une solution de Bromure d'Ethidium pendant 30 minutes. La visualisation se fait en exposant le gel à des rayons UV dans un transilluminateur Gel Doc XR Molecular Imager (BIO RAD) (figure 7).



Figure 6 : dépôt des produits de l'amplification dans les puits et cuve d'électrophorèse utilisée pour la migration.



Figure 7 : le transilluminateur Gel Doc XR Molecular Imager (BIO RAD).









RESULTATS ET DISCUSSION

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. DÉTERMINATION DES MORPHOTYPES

Les colonies de *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae* cultivées sur milieu Malt-Agar ont été classées visuellement en huit types morphologiques selon les critères de Martinez *et al.*, 2003 (Tableau 10).

Tableau10 : Classification morphologique des isolats.

Phénotype	Aspect	M1	M2	M3	M4
					
Mycélium		Court à rasant	Aérien	Masses mycéliennes	Epais et dense
Sporulation		-	+	+/-	+/-
Sclérotés		-	-	-	-
Isolats		BCV33	BCV32	BCV31	BCV15 ; BCV26
Fréquence		1/41 2,44%	1/41 2,44%	1/41 2,44%	2/41 4,88%
Phénotype	Aspect	S1	S2	S3	S4
					
Mycélium		Rasant	Rasant	Rasant	Rasant
Sporulation		+/-	+/-	+/-	-
Sclérotés		En bordure de la boîte	+/- grands, en cercles concentriques	+/- grands, éparpillés	Nombreux, petits et éparpillés
Isolats		BCV07 ; BCV18	BCV05 ; BCV11 ; BCV16 ; BCV17 ; BCV19 ; BCV21 ; BCV23 ; BCV25 ; BCV28 ; BCV30 ; BCB	BCV01 ; BCV02 ; BCV03 ; BCV08 ; BCV09 ; BCV10 ; BCV12 ; BCV13 ; BCV14 ; BCV22 ; BCV24 ; BCV27 ; BCR2 ; BCR3	BCV04 ; BCV06 ; BCV20 ; BCV29 ; BCPC ; BCR1 ; BCR4 BF2219 ; BF2240
Fréquence		2/41 4,88%	11/41 26,83%	14/41 34,15%	9/41 21,95%

Deux principaux types morphologiques ont été décrits, un type 'Mycélien' caractérisé par l'absence de sclérotés, et un type 'Sclérotien' dont les colonies produisent de nombreux sclérotés. Cette classification tenait compte de la capacité des isolats à produire des sclérotés et ne concernait pas la sporulation qui n'est pas un caractère discriminant de ces types morphologiques.

Sous nos conditions d'expérimentation, nos isolats sont majoritairement du type sclérotien (36/41). La figure 8 présente la fréquence de distribution des isolats en type Mycélien et Sclérotien.

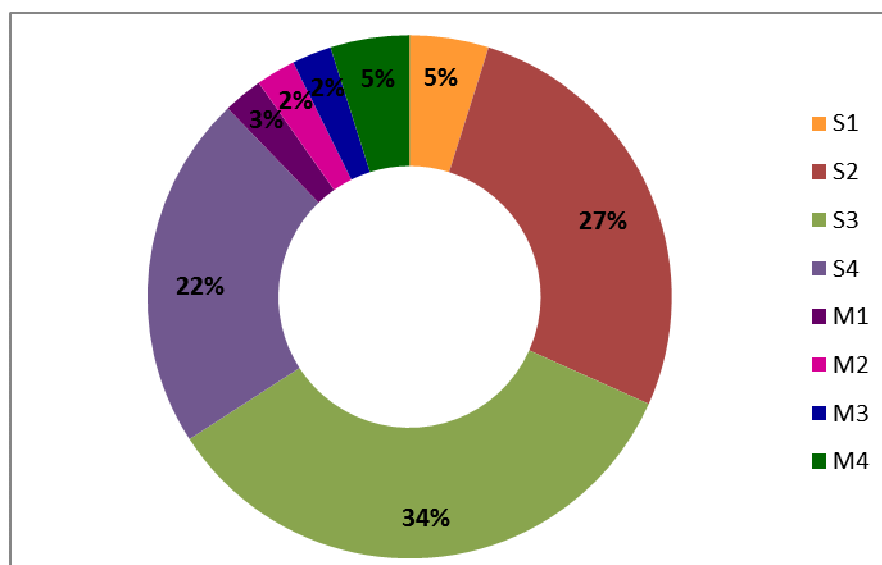


Figure 8 : Fréquence de distribution des morphotypes.

IV.2. CROISSANCE MYCÉLIENNE

La vitesse de croissance mycélienne de nos isolats a été estimée au terme de 3 jours d'incubation à 20°C. et à l'obscurité. La vitesse moyenne de croissance mycélienne de chaque isolat a été calculée (Tableau 11) et les vitesses de tous les isolats ont été classées par ordre décroissant (Figure 9).

Tableau 11 : vitesse moyenne de la croissance mycélienne des isolats de la collection.

Isolats	Vitesse de croissance (mm/j)	Isolats	Vitesse de croissance (mm/j)
BCV01	18,00	BCV22	19,33
BCV02	18,33	BCV23	15,00
BCV03	19,50	BCV24	19,39
BCV04	22,44	BCV25	18,33
BCV05	22,67	BCV26	21,78
BCV06	18,39	BCV27	17,39
BCV07	18,39	BCV28	19,06
BCV08	19,44	BCV29	17,33
BCV09	20,89	BCV30	18,33
BCV10	20,44	BCV31	18,33
BCV11	22,39	BCV32	18,06
BCV12	22,17	BCV33	19,06
BCV13	22,83	BCB	19,17
BCV14	19,50	BCPC	18,44
BCV15	22,11	BCR1	18,06
BCV16	23,11	BCR2	17,39
BCV17	19,44	BCR3	15,28
BCV18	19,44	BCR4	18,39
BCV19	18,17	BF2219	18,94
BCV20	18,67	BF2240	15,06
BCV21	15,39		

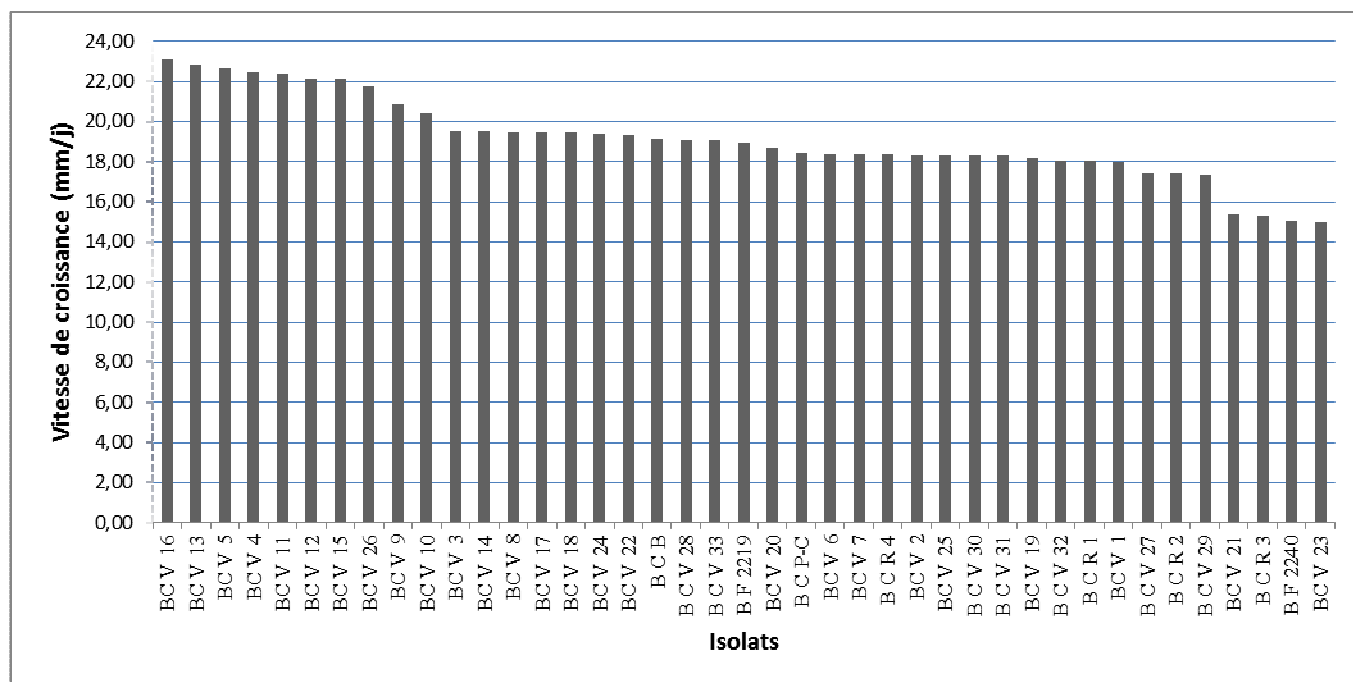


Figure 9 : Vitesse de la croissance mycélienne des isolats.

L'analyse des résultats a permis de définir 4 groupes d'isolats (Tableau 12). Les vitesses moyennes de croissance mycélienne de nos isolats ont varié entre 15,0 et 23,11 mm/jour chez les isolats BCV23 et BCV16 respectivement. Le classement des isolats nous a permis de mettre en évidence 4 catégories d'isolats : les isolats les plus lents dont la vitesse est comprise entre 14 et 16 mm/j, les plus rapides dont la vitesse est supérieure à 20 mm/j, et deux autres catégories intermédiaires.

Tableau 12 : Classement des vitesses de croissance mycélienne des isolats.

Vitesse de croissance mycélienne	Isolats	Proportions
14 - 16 mm/j	BCV 21 ; BCR3 ; BF2240 ; BCV23	4/41 9,75%
16,01 - 18 mm/j	BCV 01 ; BCV27 ; BCR2 ; BCV29	4/41 9,75%
18,01 - 20 mm/j	BCV03 ; BCV14 ; BCV08 ; BCV17 ; BCV18 ; BCV24 ; BCV22; BCB; BCV28; BCV33; BF2219 ; BCV20; BCPC ; BCV06 ;BCV07 ;BCR4 ; BCV02 ; BCV25 ; BCV30 ; BCV31 ; BCV19 ; BCV32 ; BCR1	23/41 56,09%
> 20mm/j	BCV16 ; BCV13 ; BCV05 ; BCV04 ; BCV11 ; BCV12 ; BCV15 ; BCV26 ; BCV09 ; BCV1	10/41 24,39%

IV.3. POUVOIR PATHOGÈNE DES ISOLATS

Le pouvoir pathogène des 41 isolats a été testé sur des disques foliaires découpés de jeunes feuilles de vigne du cépage Muscat d'Alexandrie. Après 6 jours d'incubation, le développement de la maladie est estimé visuellement selon une échelle semi-quantitative à 6 degrés d'attaque et un indice d'attaque moyen pour chaque isolat est calculé.

Le tableau 13 représente les photos et les indices d'attaque moyens des lésions provoquées par les différents isolats de *Botrytis* testés.

Tableau 13 : photos et indices d'attaque moyens des lésions provoquées par les isolats testés.



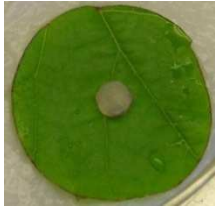









































BCV01  1,75	BCV02  2,5	BCV03  0	BCV04  2,5	BCV05  3
BCV06  1,5	BCV07  0,75	BCV08  1,5	BCV09  1,75	BCV10  0,75
BCV11  0,5	BCV12  2	BCV13  0,75	BCV14  1,75	BCV15  1,75
BCV16  0,25	BCV17  0,25	BCV18  0,5	BCV19  3,5	BCV20  1,75
BCV21  1,5	BCV22  2	BCV23  1,75	BCV24  1,5	BCV25  2,75

Tableau 13 (suite)

BCV26  0	BCV27  0,75	BCV28  0,75	BCV29  1	BCV30  1,5
BCV31  3,75	BCV32  1	BCV33  1,75	BCB  0,75	BCPC  1
BCR1  0,5	BCR2  2,5	BCR3  2	BCR4  3	BF2219  0
BF2240  1,75	T1  0	T2  0	T3  0	

Ces résultats montrent que sur nos 41 isolats, seulement 3 ont été avirulents et n'ont de ce fait causé aucune nécrose sur les disques foliaires, à savoir BCV03, BVC26 et BF2219. Pour les autres isolats, des degrés différents d'attaque ont été enregistrés, allant des moins agressifs (BCV16, BCV17) avec des IAM de 0.25, aux plus agressifs (BCV19 et BCV31) avec des IAM de 3,5 et 3,75 respectivement. Le graphique de la figure 10 montre le classement des isolats selon les indices d'attaque moyens provoqués.

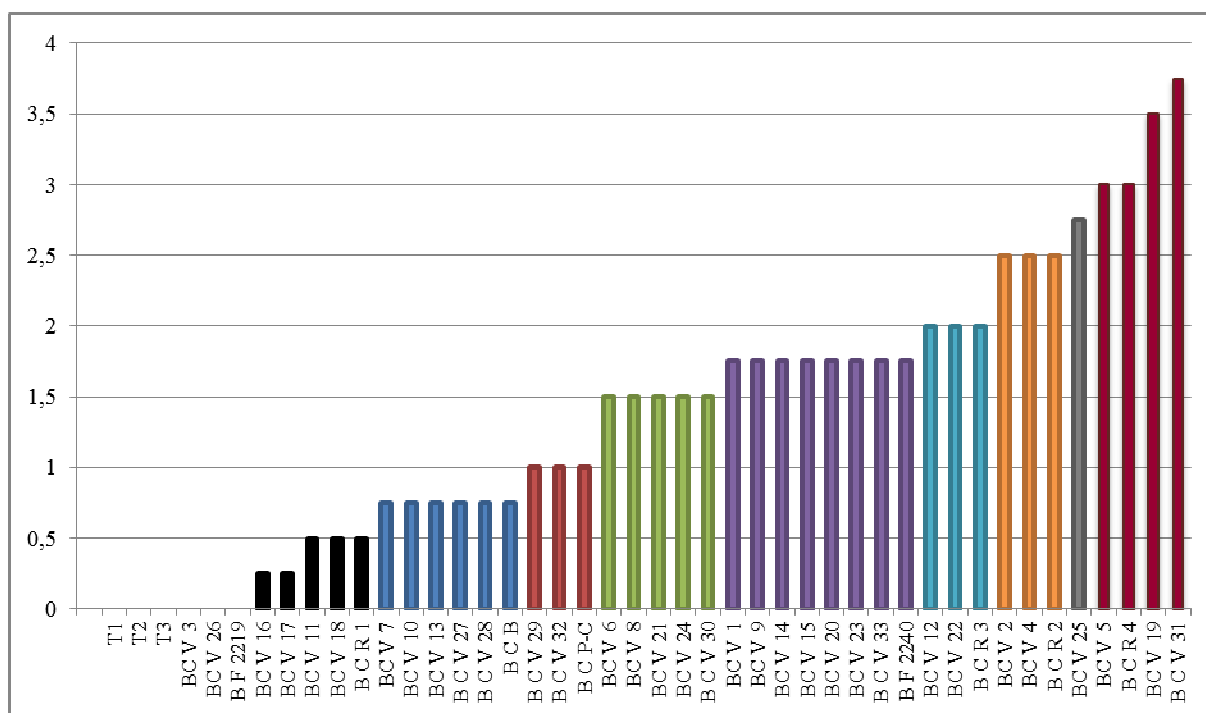


Figure 10 : Classement des isolats testés en fonction des indices d'attaques moyens.

IV.4. SENSIBILITÉ AU FENHEXAMIDE

L'effet du fongicide Fenhexamide sur les 41 isolats de la collection a été évalué *in-vitro* par la méthode de l'incorporation au milieu de culture. Cinq concentrations de fongicide ont été testées et trois répétitions par dose et par isolat ont été réalisées. Au terme de quatre jours d'incubation, les diamètres des colonies sont mesurés et les pourcentages d'inhibition calculés. Le tableau 14 représente les pourcentages d'inhibitions provoquées par les cinq doses de Fenhexamide.

Tableau 14 : Pourcentages d'inhibitions provoquées par les cinq doses de Fenhexamide.

Isolat	% inhibition D1 (0,005mg/l)	% inhibition D2 (0,01mg/l)	% inhibition D3 (0,1mg/l)	% inhibition D4 (1,0mg/l)	% inhibition D5 (10,0mg/l)
BCV01	3,94	5,56	66,20	100,00	100,00
BCV02	0,90	8,33	56,53	84,68	100,00
BCV03	2,37	6,67	57,85	78,92	94,41
BCV04	4,43	5,49	52,32	74,89	92,83
BCV05	1,48	3,59	59,07	83,54	89,87
BCV06	7,19	24,49	66,07	87,64	96,40
BCV07	3,17	7,26	45,80	89,12	99,32
BCV08	1,49	2,77	54,89	69,36	87,02
BCV09	0,84	2,11	71,10	75,32	99,16
BCV10	7,59	11,18	66,88	88,40	98,31
BCV11	0,00	3,16	72,36	79,11	96,62
BCV12	0,00	0,00	51,05	69,20	67,30
BCV13	1,69	4,64	68,35	81,22	85,02
BCV14	6,21	11,99	53,32	60,39	68,52
BCV15	0,00	0,63	59,28	71,10	87,55
BCV16	4,22	9,70	56,54	77,53	100,00
BCV17	3,23	14,19	70,32	96,99	92,90
BCV18	19,57	26,38	56,81	65,96	92,55
BCV19	19,27	33,26	64,45	85,78	87,84
BCV20	12,22	20,22	52,22	72,67	93,78
BCV21	39,40	43,75	55,71	99,46	97,01
BCV22	5,38	17,85	59,14	76,77	77,20
BCV23	33,89	39,44	57,78	72,78	88,89
BCV24	19,40	43,50	56,08	86,99	99,15
BCV25	25,68	48,20	81,53	83,56	97,52
BCV26	8,44	33,33	55,70	71,31	91,98
BCV27	18,27	25,48	61,78	79,09	96,39
BCV28	7,17	18,04	55,43	81,96	97,61
BCV29	15,70	18,36	45,65	71,26	85,99
BCV30	16,59	33,18	63,64	93,64	100,00
BCV31	5,87	17,38	60,72	86,91	98,87
BCV32	14,71	24,14	57,70	87,36	99,08
BCV33	7,86	16,38	57,42	62,66	87,99
BCB	5,16	22,58	70,32	95,70	98,92
BCPC	6,50	18,83	63,90	89,01	93,27
BCR1	2,31	21,48	71,59	96,77	99,31
BCR2	2,64	3,84	68,82	99,28	99,52
BCR3	7,40	8,77	61,37	96,16	100,00
BCR4	11,76	17,87	75,11	94,12	98,19
BF2219	3,30	14,95	77,80	96,48	99,78
BF2240	9,14	31,58	68,98	95,01	99,70

A partir des pourcentages d'inhibition calculés, les courbes dose/réponse sont tracées (Annexe 6). De ces courbes, les CI50 sont calculées et les facteurs de résistance sont estimés (Tableau 15).

Tableau 15 : CI50 et degrés de résistance des isolats testés.

Isolat	CI50	Degré de résistance	Isolat	CI50	Degré de résistance
BCV01	0,042	4,19	BCV22	0,055	5,51
BCV02	0,072	7,20	BCV23	0,039	3,86
BCV03	0,077	7,72	BCV24	0,035	3,45
BCV04	0,096	9,60	BCV25	0,011	1,07
BCV05	0,066	6,58	BCV26	0,068	6,78
BCV06	0,038	3,84	BCV27	0,048	4,83
BCV07	0,114	11,40	BCV28	0,068	6,80
BCV08	0,086	8,60	BCV29	0,136	13,64
BCV09	0,062	6,15	BCV30	0,030	3,03
BCV10	0,045	4,54	BCV31	0,052	5,18
BCV11	0,053	5,31	BCV32	0,049	4,87
BCV12	0,091	9,10	BCV33	0,079	7,90
BCV13	0,050	5,00	BCB	0,033	3,25
BCV14	0,084	8,40	BCPC	0,042	4,20
BCV15	0,092	9,21	BCR1	0,032	3,24
BCV16	0,086	8,55	BCR2	0,041	4,09
BCV17	0,035	3,45	BCR3	0,047	4,74
BCV18	0,090	8,98	BCR4	0,030	3,01
BCV19	0,029	2,95	BF2219	0,031	3,12
BCV20	0,086	8,60	BF2240	0,029	2,89
BCV21	0,054	5,37			

La réponse de nos isolats au fongicide Fenhexamide a été variable. Les isolats sont considérés comme résistants si la CI50 \geq 0,1mg/l. les valeurs des CI50 ont varié de 0,011mg/l pour l'isolat BCV25 à 0,136mg/l pour BCV29.

A la dose D3 qui est la dose discriminante (dose séparant les isolats en deux groupes : sensibles et résistants) 8 isolats ont été inhibés à plus de 70%, 12 isolats à plus de 60%, 19 isolats à plus de 50% et seulement 2 isolats ont été inhibés à moins de 50% et sont de ce fait considérés comme résistants au Fenhexamide (phénotype HydR). Ces isolats, BCV07 et BCV29, ont des CI50 respectives de 0,114 et 0,136mg/l avec des degrés de résistance de 11,4 et 13,6 (Tableau 15). Les autres isolats sont plus ou moins sensibles (phénotype HydS). Les plus sensibles ont des degrés de résistance inférieurs à 4, les isolats à sensibilité réduite ayant des degrés de résistance inférieurs à 6, et les faiblement résistants dont les degrés de résistance sont compris entre 6,1 et 10. La figure 11 représente la fréquence de distribution des

degrés de résistance et le graphique de la figure12 représente le classement des isolats en fonction des degrés de résistance.

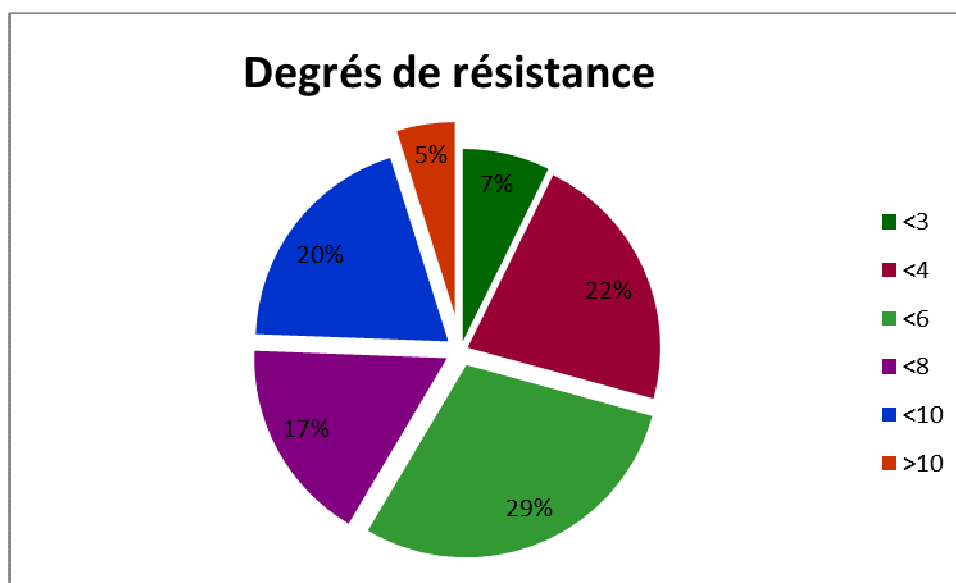


Figure 11 : fréquence de distribution des degrés de résistance.

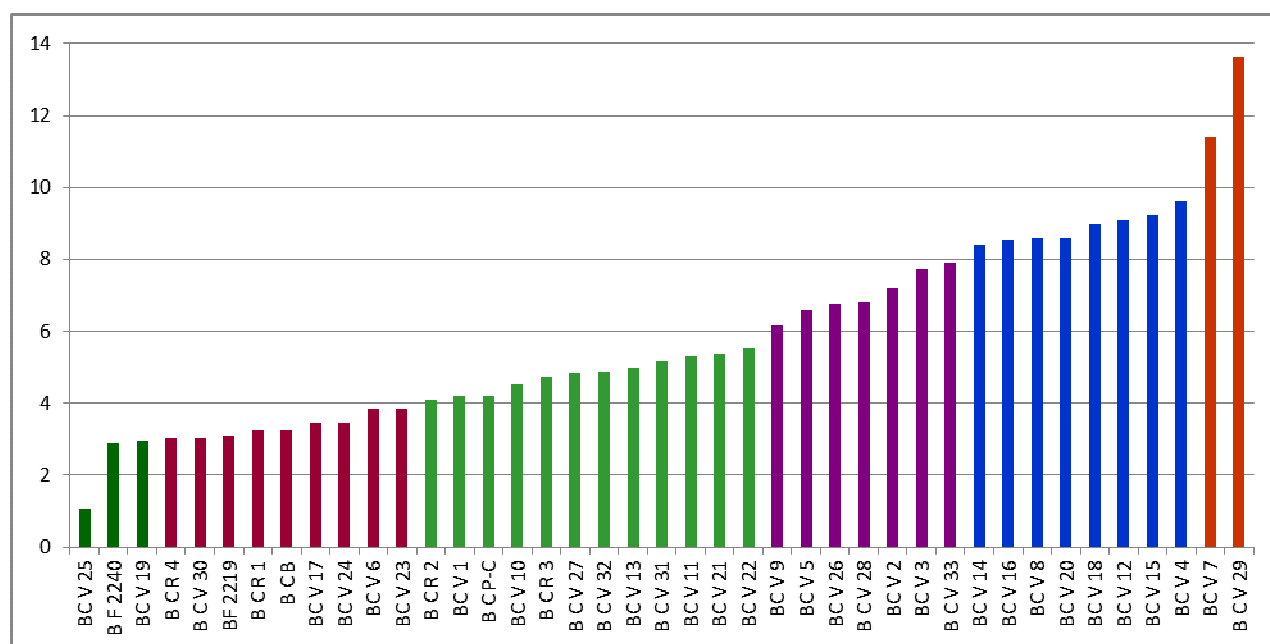


Figure 12 : classement des isolats en fonction des degrés de résistance.

Aux doses élevées D4 et D5, les isolats ont eu des niveaux de croissance relativement faibles. Le graphique de la figure 13 montre la tendance générale de réponse au fongicide. Il met en évidence la relation qui existe entre les doses de fongicide et les pourcentages d'inhibition provoqués ; en effet, ceux-ci augmentent proportionnellement à l'augmentation des doses de fongicide.

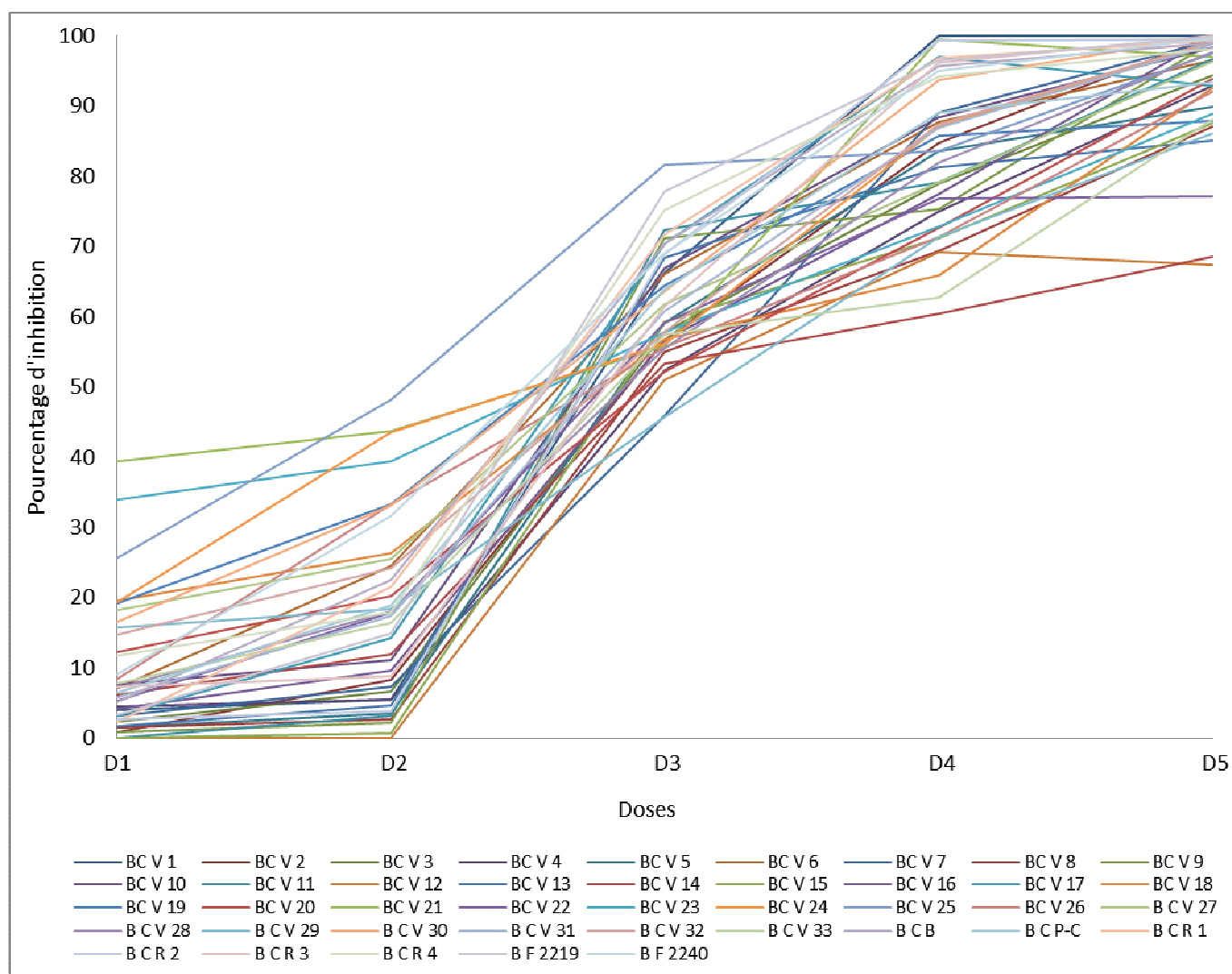


Figure 13 : pourcentages d'inhibition provoqués par les différentes doses de Fenhexamide.

IV.5. DÉTECTION DES ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES

IV.5.1. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES ADN EXTRAITS

La qualité des extrais d'ADN a été contrôlée par mesure de la densité optique par un spectrophotomètre type NanoDrop(ND-2000). Ces extrais ont montré une grande variabilité de pureté et de concentrations comme le montre le tableau 16.

En effet les valeurs de pureté (DO260/DO280) ont varié de -0,78 pour l'isolat BCV12 à 2,4 pour l'isolat BCV17. Ces chiffres laissent suggérer que certains de nos extrais contiennent encore des résidus protéiques. Les concentrations de nos extrais en ADN sont assez faibles, elles varient de 1,9ng/μl pour l'isolat BCV03 et 34,9ng/μl pour l'isolat BCV22.

Tableau 16 : puretés et concentrations des extraits d'ADN.

ISOLATS	DO260	DO280	DO260/DO230	DO260/DO280	C (ng/µl)
BCV01	0,229	0,134	0,20	1,71	11,5
BCV02	0,139	0,069	0,17	2,01	7,0
BCV03	0,038	0,023	0,06	1,65	1,9
BCV04	0,489	0,491	0,14	1,00	24,4
BCV05	0,148	0,072	0,26	2,06	7,4
BCV06	0,382	0,244	0,16	1,57	19,1
BCV07	0,205	0,118	0,11	1,74	10,3
BCV08	0,099	0,083	0,12	1,19	5,0
BCV09	0,136	0,063	0,10	2,16	6,8
BCV10	0,089	0,055	0,17	1,62	4,5
BCV11	0,067	0,033	0,13	2,03	3,4
BCV12	0,043	-0,055	0,09	-0,78	2,1
BCV13	0,144	0,092	0,15	1,57	7,2
BCV14	0,082	0,045	0,11	1,82	4,1
BCV15	0,124	0,065	0,14	1,91	6,2
BCV16	0,191	0,103	0,14	1,85	9,6
BCV17	0,206	0,086	0,18	2,40	10,3
BCV18	0,116	0,050	0,11	2,32	5,8
BCV19	0,394	0,278	0,21	1,42	19,7
BCV20	0,437	0,370	0,19	1,18	21,8
BCV21	0,502	0,459	0,19	1,09	25,1
BCV22	0,699	0,439	0,38	1,59	34,9
BCV23	0,347	0,216	0,31	1,61	17,4
BCV24	0,275	0,164	0,24	1,68	13,8
BCV25	0,173	0,097	0,14	1,78	8,6
BCV26	0,160	0,091	0,20	1,76	8,0
BCV27	0,113	0,063	0,20	1,79	5,7
BCV28	0,274	0,176	0,19	1,56	13,7
BCV29	0,123	0,072	0,17	1,71	6,1
BCV30	0,236	0,139	0,18	1,70	11,8
BCV31	0,104	0,065	0,16	1,60	5,2
BCV32	0,136	0,075	0,22	1,81	6,8
BCV33	0,149	0,097	0,17	1,54	7,5
BCB	0,203	0,126	0,14	1,61	10,1
BCPC	0,340	0,362	0,15	0,94	17,0
BCR1	0,260	0,201	0,18	1,29	13,0
BCR2	0,173	0,126	0,18	1,37	8,6
BCR3	0,316	0,214	0,16	1,48	15,8
BCR4	0,123	0,085	0,14	1,45	6,2
BF2219	0,055	0,027	0,11	2,04	2,8
BF2240	0,073	0,054	0,12	1,35	3,6

IV.5.2. DÉTECTION DES ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES

De nombreuses études ont montré que la paire d'amorces F300/F1550 était fiable pour la détection de Flipper (Fekete *et al.*, 2011 ; Ma et Michailides, 2005 ; Levis *et al.*, 1997). Dans notre cas, le fragment de 1250pb attendu n'a été observé dans aucun de nos extraits et donc l'élément transposable Flipper n'a été détecté chez aucun de nos isolats.

La paire d'amorce BotyF4/BotyR4 amplifie un fragment de 510pb et est suffisamment fiable pour la détection de l'élément transposable Boty (Fekete *et al.*, 2011 ; Ma et Michailides, 2005). Dans notre cas, la paire d'amorces a effectivement généré le fragment attendu chez 16 isolats à savoir : BCV17, BCV18, BCV19, BCV20, BCV25, BCV26, BCV27, BCV29, BCV31, BCV32, BCV33, BCB, BCPC, BCR2, BCR3, BCR4.

Les figures 14 à 21 montrent les profils électrophorétiques obtenus avec les deux paires d'amorces BotyF4/BotyR4 et F300/F1550.

Sur les 41 isolats de notre collection, nous pouvons dire que 16 sont du type transposable *Boty* et 25 du type *vacuma*.

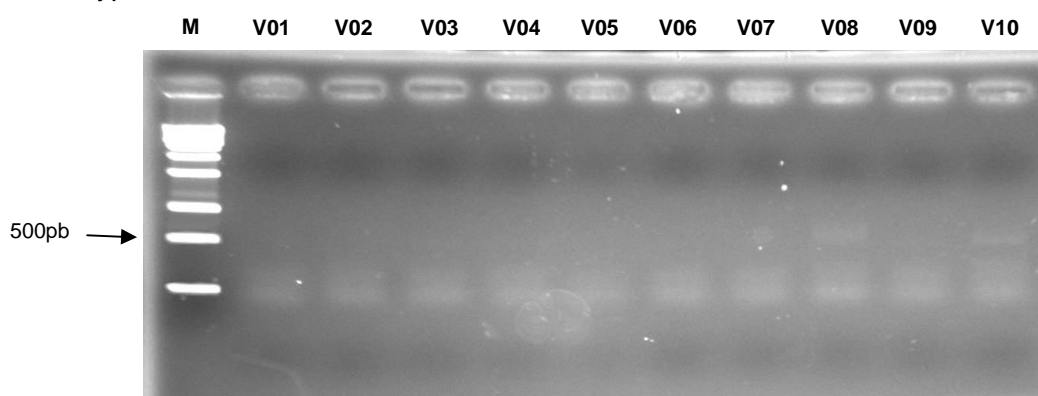


Figure 14 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces Boty F4/Boty R4 (isolats BCV01 à BCV10). M : ADN marqueur.

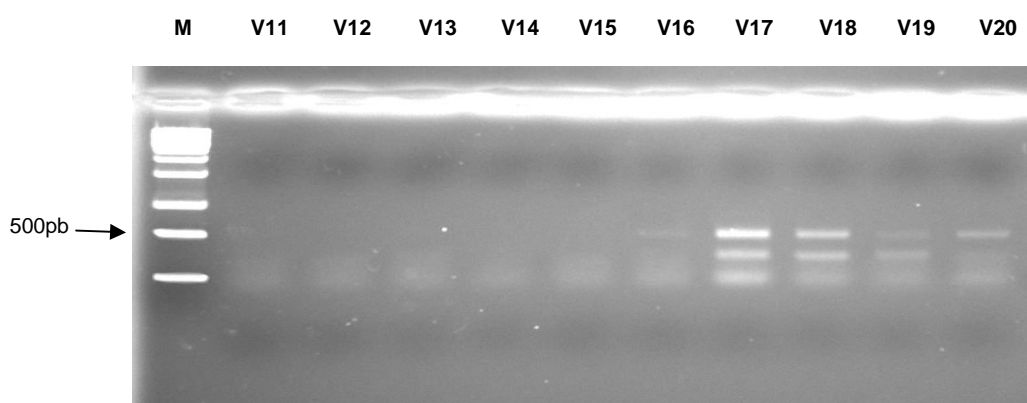


Figure 15 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces Boty F4/Boty R4 (isolats BCV11 à BCV20). M : ADN marqueur.

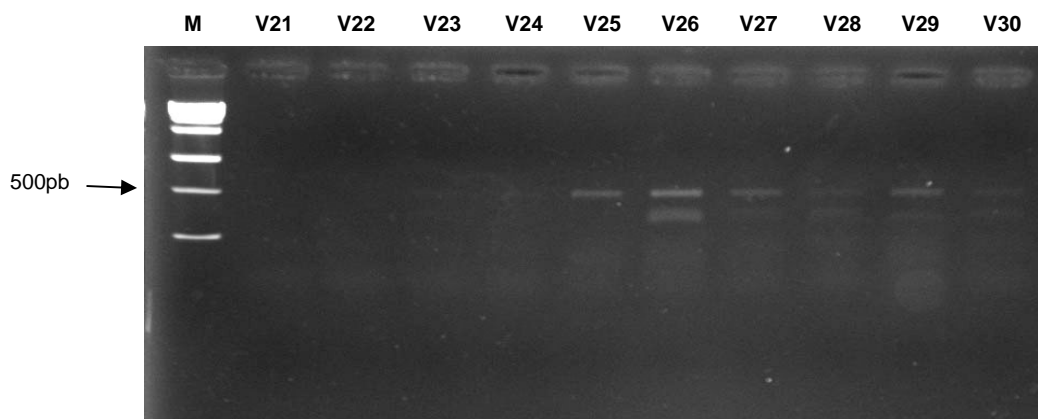


Figure 16 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces Boty F4/Boty R4 (isolats BCV20 à BCV30). M : ADN marqueur.

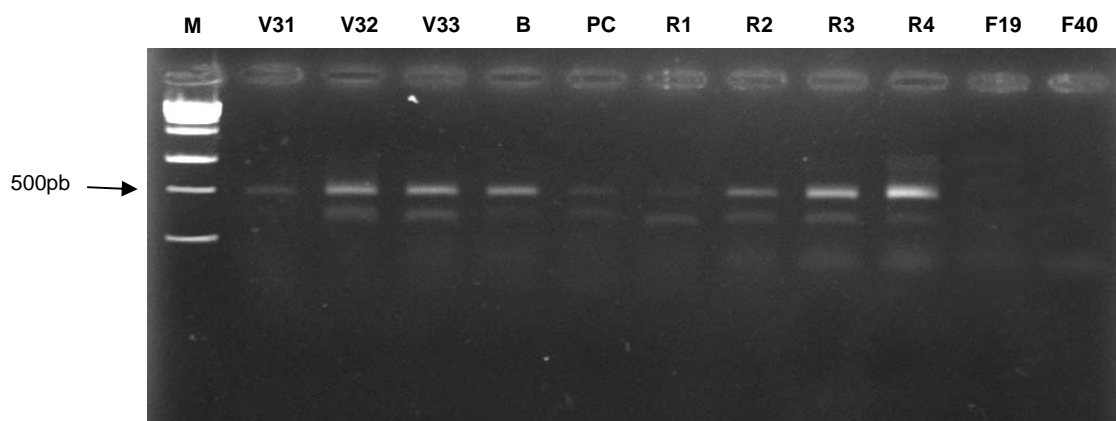


Figure 17 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces Boty F4/Boty R4 (isolats BCV31 à BF2240). M : ADN marqueur.

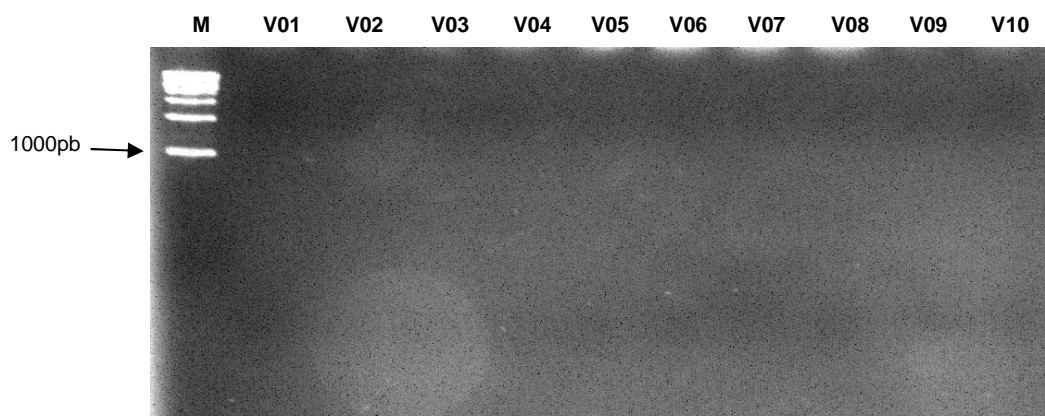


Figure 18 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces F300/F1550 (isolats BCV01 à BCV10). M : ADN marqueur.

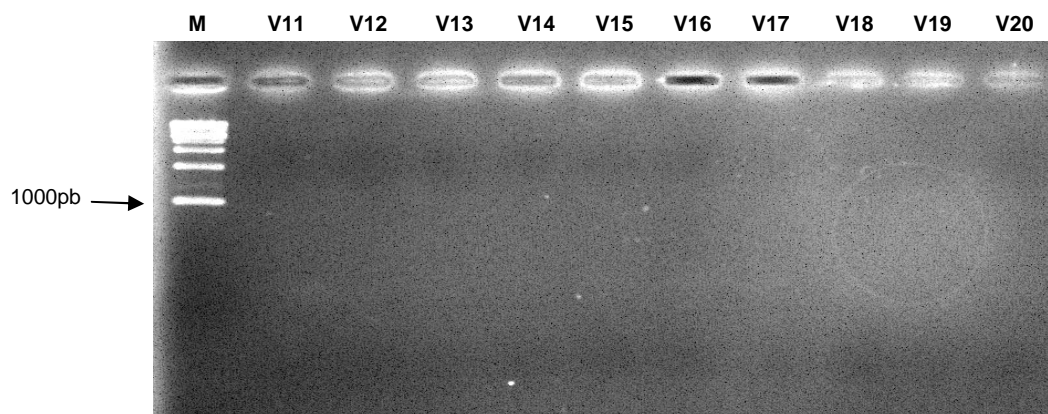


Figure 19 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces F300/F1550 (isolats BCV11 à BCV20). M : ADN marqueur.

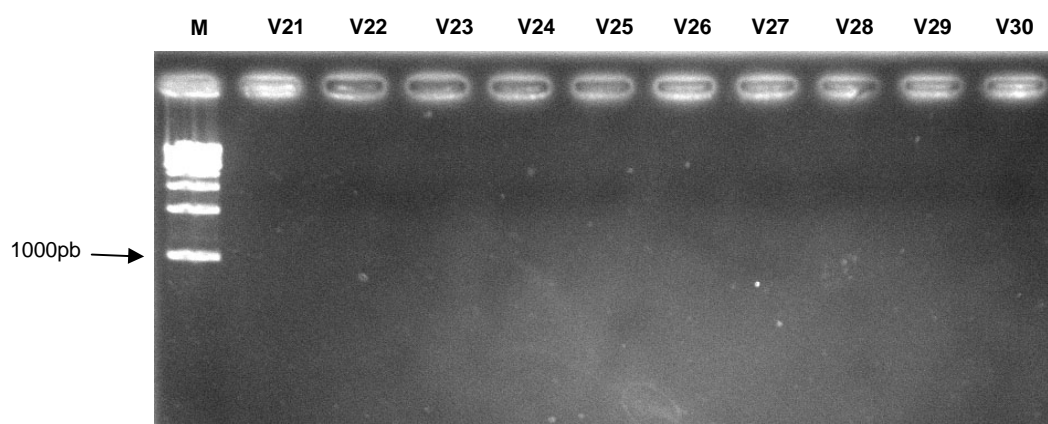


Figure 20 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces F300/F1550 (isolats BCV21 à BCV30). M : ADN marqueur.

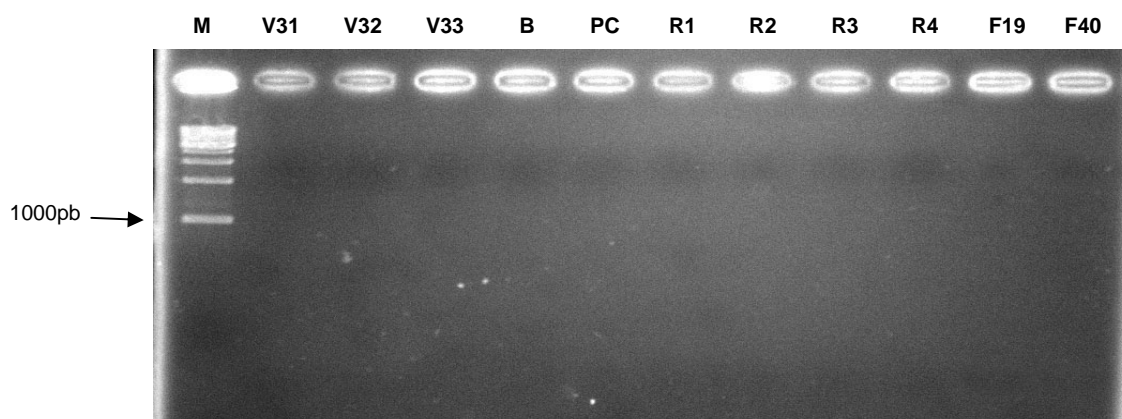


Figure 21 : Profils électrophorétiques obtenus avec la paire d'amorces F300/F1550 (isolats BCV31 à BF2240). M : ADN marqueur.

IV.6. DISCUSSION

Morphotypes : Dans cette observation morphologique deux principaux groupes ont été décrits : un Mycélien caractérisé par l'absence de sclérote, et un Sclérotien caractérisé par la production de nombreux sclérotés. Sous nos conditions d'expérience, nous avons obtenu une majorité d'isolats du type sclérotien, soit 36/41. Ce même constat a été reporté par de nombreux auteurs (Tanović *et al.*, 2009 ; Martinez *et al.*, 2003 ; Goto, 1980).

Croissance mycélienne : la vitesse de croissance mycélienne de nos isolats a été comparée à la température optimale de 20°C. L'analyse de la variance a révélé une différence statistiquement significative entre les moyennes des vitesses de croissance des isolats au niveau de confiance de 95%. Le test des différences significatives minimales (LSD) de Fisher au seuil de 5% nous a permis de distinguer huit(8) groupes homogènes à l'intérieur desquels il n'y a pas de différence statistiquement significative. L'annexe 7 regroupe l'ensemble des résultats de l'analyse statistique.

La figure 9 représente le classement des vitesses de croissance moyennes des isolats testés. Les résultats obtenus vont dans le sens de ceux obtenus par Pande *et al.*, 2010 ; Tanović *et al.*, 2009 et Martinez *et al.*, 2003 qui ont montré d'importantes variabilités de vitesse de croissance au sein des populations de *Botrytis cinerea*.

Pouvoir pathogène : la majorité des isolats testés a causé des lésions sur les disques foliaires de vigne. L'analyse de la variance des indices d'attaque révèle une différence hautement significative entre les isolats au niveau de confiance de 95%. Le test des différences significatives minimales (LSD) de Fisher au seuil de 5% classe nos isolats en dix (10) groupes homogènes. Ces groupes sont représentés au niveau du graphique de la figure 10 par des colonnes de couleurs différentes. L'ensemble des résultats de l'analyse statistique est présenté dans l'annexe 8.

La différence de virulence entre les isolats résulterait de la capacité variable des isolats à coloniser les espaces intercellulaires et à provoquer la macération des tissus foliaires (Martinez *et al.*, 2003). De plus, les conditions expérimentales auraient favorisé les isolats à tendance saprophytes (humidité relative importante et nutriments présents dans les explants mycéliens) mais pas le déclenchement des réponses de défense de la plante. Toutefois, l'envahissement des tissus privés de défense pourrait être représentatif du développement des symptômes de pourriture grise sur les baies qui perdent progressivement leur potentiel de synthèse des stilbènes avec la maturité (Keller *et al.*, 2000).

Sensibilité au Fenhexamide : l'hydroxyanilide Fenhexamide est un Botryticide inhibiteur de la déméthylation des stérols. *In-vitro*, *Botrytis cinerea* présente une sensibilité variable aux traitements par le Fenhexamide en fonction de ses stades de développement (Leroux, 2007). Dans notre étude, les CI50 de la croissance mycélienne de nos isolats ont varié de 0,011 à 0,136 mg/l ce qui va dans le même sens des nombreuses enquêtes réalisées (Korolev *et al.*, 2011 ; Esterio *et al.*, 2007 ; Förster *et al.*, 2007 ; Myresiotis *et al.*, 2007 ; Ma and Michailides, 2005 ; Leroux *et al.*, 1999).

Une dose discriminante de 0,1mg/l a été décrite et utilisée pour séparer les isolats en : sensibles (CI50<0,1mg/l) et résistants (CI50≥0,1mg/l) (Esterio *et al.*, 2007, 2011 ; Baroffio *et al.*, 2003). Cette même dose (D3) a été utilisée lors de notre essai pour classer nos isolats. 39/41 se sont montrés sensibles (soit 95%) et seulement 2/41 résistants. La réponse de nos isolats au traitement par le Fenhexamide était graduelle entre la sensibilité et la résistance. En effet, certains isolats (11/41) ont montré une sensibilité réduite (CI50 comprise entre 0,07 et 0,1). Des isolats avec une sensibilité similaire ont été décrits au Chili (Esterio *et al.*, 2007) et en Israël (Korolev *et al.*, 2011). Néanmoins, la ségrégation des isolats en sensibles et résistants sur la base des CI50 et des pourcentages d'inhibition ne correspond pas toujours à la description des phénotypes résistants mais est plutôt utile dans les programmes de monitoring.

L'analyse de la variance des résultats de cet essai (Annexe 9) révèle un effet hautement significatif du traitement fongicide sur la croissance de nos isolats, une différence hautement significative entre les réponses des différents isolats au fongicide ainsi qu'une interaction significative des effets combinés doses-isolats.

A ce jour trois phénotypes résistants au Fenhexamide sont décrits : HydR1 (isolats naturellement résistants, reconnus récemment comme *Botrytis pseudocinerea*, Groupe I) ; HydR2 (dont la résistance est due à la détoxification par le cytochrome p450) et HydR3 (présentant une sensibilité réduite du site ciblé) (Kretschmer *et al.*, 2009 ; Fillinger *et al.*, 2008). Dans nos tests, 2 isolats sur 41 se sont montrés résistants au Fenhexamide avec des degrés de résistance de 11,4 (BCV07) et 13,6 (BCV29). Ces isolats seraient probablement du phénotype HydR3 modéré (Fillinger *et al.*, 2008). Aucun isolat fortement résistant au Fenhexamide n'a été retrouvé dans notre étude.

Des isolats HydR3 ont été retrouvés à une fréquence supérieure à 50% dans une étude Française, mais les traitements par ce fongicide semblaient toujours efficaces, ceci suggère que le fitness de ces résistants serait réduit (Fillinger *et al.*, 2008). Des isolats similairement résistants ont également été retrouvés en Californie (Ma & Michailides, 2005), au Chili (Esterio *et al.*, 2011), en Grèce (Myresiotis *et al.*, 2007), en Suisse (Baroffio *et al.*, 2003), en Israël (Korolev *et al.*, 2011), en Allemagne (Weber, 2010) et dans d'autres régions (Leroux, 2007).

Dans de nombreux travaux, ainsi que dans le nôtre, la fréquence d'isolats résistants reste faible, confirmant que les populations naturelles de *Botrytis cinerea* contiennent souvent une petite proportion d'isolats ayant une sensibilité réduite au Fenhexamide ainsi qu'une compétitivité faible (Sutty *et al.*, 1999).

Détection des éléments transposables : les isolats de *Botrytis cinerea* peuvent se présenter en quatre types : type *vacuma* (ne possédant aucun élément transposable), type *transposa* (possédant les deux éléments transposables Boty et Flipper), type *Boty* (possédant uniquement l'élément transposable Boty), ou type *Flipper* (ne possédant que l'élément transposable Flipper). Dans notre essai, sur les 41 isolats analysés, 16 se sont avérés du type Boty (BCV17, BCV18, BCV19, BCV20, BCV25, BCV26, BCV27, BCV29, BCV31, BCV32, BCV33, BCB, BCPC, BCR2, BCR3, BCR4) ; les 25 autres sont donc probablement du type *vacuma*. La présence de l'élément transposable Boty seul a été reporté par de nombreuses recherches (fekete *et al.*, 2011 ; Tanovic *et al.*, 2009 ; Kretschmer et Hahn, 2008 ; Fournier *et al.*, 2005 ; Ma et Michailides, 2005 ; Muñoz *et al.*, 2002 ; Giraud *et al.*, 1999). Aussi la résistance au Fenhexamide a été reportée chez les populations de *Botrytis cinerea* du type *vacuma*, *transposa* et *flipper*, mais pas chez le type *Boty* (Albertini *et al.*, 2003 ; Giraud *et al.*, 1999). Dans notre étude, l'un des isolats trouvés résistant au fongicide Fenhexamide (BCV29, phénotype HydR3 modéré) s'avère être du type *Boty*. Des résultats similaires ont été obtenus par Ma et Michailides (2005) qui ont trouvé que les 4 isolats résistants étaient du type *Boty*, ce qui indique qu'il n'y a pas encore de relation établie entre le type transposable et la résistance au fongicide.

Les résultats obtenus lors de cet essai de détection des éléments transposables doivent évidemment être sujets à discussion car d'abord le protocole d'extraction d'ADN utilisé a donné des extraits de moyenne qualité avec de faibles concentrations en acides nucléiques, ce qui pourrait entraver le bon déroulement d'une réaction d'amplification. De plus les PCR ont été réalisées sans la présence d'ADN témoin positif, et ce pour les deux paires d'amorces, ce qui pourrait nous donner de faux négatifs.

Le tableau 17 regroupe l'ensemble des résultats obtenus lors des différents essais.

Tableau 17 : Ensemble des résultats obtenus lors des différents essais.

ISOLAT	MORPHOTYPE	VITESSE DE CROISSANCE	IAM PROVOQUE	DEGRE DE RESISTANCE	TYPE TRANSPOSABLE
BCV01	S3	18,00	1,75	4,19	<i>Vacuma</i>
BCV02	S3	18,33	2,5	7,20	<i>Vacuma</i>
BCV03	S3	19,50	0	7,72	<i>Vacuma</i>
BCV04	S4	22,44	2,5	9,60	<i>Vacuma</i>
BCV05	S2	22,67	3	6,58	<i>Vacuma</i>
BCV06	S4	18,39	1,5	3,84	<i>Vacuma</i>
BCV07	S1	18,39	0,75	11,40	<i>Vacuma</i>
BCV08	S3	19,44	1,5	8,60	<i>Vacuma</i>
BCV09	S3	20,89	1,75	6,15	<i>Vacuma</i>
BCV10	S3	20,44	0,75	4,54	<i>Vacuma</i>
BCV11	S2	22,39	0,5	5,31	<i>Vacuma</i>
BCV12	S3	22,17	2	9,10	<i>Vacuma</i>
BCV13	S3	22,83	0,75	5,00	<i>Vacuma</i>
BCV14	S3	19,50	1,75	8,40	<i>Vacuma</i>
BCV15	M4	22,11	1,75	9,21	<i>Vacuma</i>
BCV16	S2	23,11	0,25	8,55	<i>Vacuma</i>
BCV17	S2	19,44	0,25	3,45	<i>Boty</i>
BCV18	S1	19,44	0,5	8,98	<i>Boty</i>
BCV19	S2	18,17	3,5	2,95	<i>Boty</i>
BCV20	S4	18,67	1,75	8,60	<i>Boty</i>
BCV21	S2	15,39	1,5	5,37	<i>Vacuma</i>
BCV22	S3	19,33	2	5,51	<i>Vacuma</i>
BCV23	S2	15,00	1,75	3,86	<i>Vacuma</i>
BCV24	S3	19,39	1,5	3,45	<i>Vacuma</i>
BCV25	S2	18,33	2,75	1,07	<i>Boty</i>
BCV26	M4	21,78	0	6,78	<i>Boty</i>
BCV27	S3	17,39	0,75	4,83	<i>Boty</i>
BCV28	S2	19,06	0,75	6,80	<i>Vacuma</i>
BCV29	S4	17,33	1	13,64	<i>Boty</i>
BCV30	S2	18,33	1,5	3,03	<i>Vacuma</i>
BCV31	M3	18,33	3,75	5,18	<i>Boty</i>
BCV32	M2	18,06	1	4,87	<i>Boty</i>
BCV33	M1	19,06	1,75	7,90	<i>Boty</i>
BCB	S2	19,17	0,75	3,25	<i>Boty</i>
BCPC	S4	18,44	1	4,20	<i>Boty</i>
BCR1	S4	18,06	0,5	3,24	<i>Vacuma</i>
BCR2	S3	17,39	2,5	4,09	<i>Boty</i>
BCR3	S3	15,28	2	4,74	<i>Boty</i>
BCR4	S4	18,39	3	3,01	<i>Boty</i>
BF2219	S4	18,94	0	3,12	<i>Vacuma</i>
BF2240	S4	15,06	1,75	2,89	<i>Vacuma</i>

Il en ressort que les isolats du type *vacuma* sont majoritairement sclérotien et ils présentent les plus grandes vitesses de croissance mycélienne. Pour les autres paramètres, à savoir la virulence et la réponse au fongicide, il n'y a pas eu de différence marquée entre les types d'isolats.

L'analyse des corrélations entre les différents paramètres (Annexe 10) révèle une faible corrélation positive entre la croissance mycélienne et la résistance au fongicide avec un coefficient de corrélation de 0,3316 et une probabilité de 0,0342. Il n'existe pas de corrélation statistiquement significative entre les couples de variables suivants : croissance mycélienne et pouvoir pathogène ; résistance au fongicide et pouvoir pathogène.

CONCLUSION

V. CONCLUSION

De nombreux problèmes sanitaires peuvent affecter la vigne. Les parasites, les pathogènes et les conditions climatiques provoquent des pertes considérables au cours des saisons. Les champignons phytopathogènes causent les maladies les plus redoutées par les vignerons car ils s'attaquent à toutes les parties de la plante en occasionnant des diminutions sensibles du volume et de la qualité des produits.

Botrytis cinerea Pers. :Fr. (téléomorphe *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) que nous avons désigné comme modèle d'étude dans le cadre de notre projet de recherche sur les bio-agresseurs de la vigne, est un champignon très répandu dans les cultures. Il cause la pourriture grise de la vigne et de centaines d'autres espèces.

Botrytis cinerea peut causer d'importants dégâts car il a la capacité de se développer aussi bien en parasite qu'en saprophyte sur les débris végétaux. Il est doté d'une grande variabilité génétique et phénotypique qui s'expriment notamment par sa morphologie sur les milieux de culture, son agressivité sur plante et sa sensibilité aux fongicides.

La caractérisation biologique, basée sur l'étude des critères morphologiques, cultureux et pathologiques permet de mettre en évidence la diversité phénotypique intra-spécifique qui caractérise cette espèce fongique. L'étude morphologique et culturelle de la collection nous a permis de classer nos isolats en 2 principaux morphotypes : Sclérotien (36 individus/41) et Mycélien (5 individus/41), et en 4 groupes dont la croissance mycélienne est plus ou moins rapide. L'étude du pouvoir pathogène, par la technique de l'inoculation artificielle de disques foliaires, a mis en évidence une grande variabilité d'agressivité au sein de notre collection et nous a permis de distinguer 3 isolats/41 qui sont avirulents (BCV03, BCV26 et BF2219) et 2 isolats/41 qui sont les plus virulents (BCV19 et BCV31 avec des IAM respectifs de 3,5 et 3,75).

L'étude de la réponse des isolats au traitement par le fongicide Fenhexamide a également révélé une importante variabilité de sensibilité. La majorité des isolats s'est montré sensible au traitement (avec des CI50 comprises entre 0,01 et 0,07mg/l), 11 isolats/41 ont présenté une sensibilité réduite (CI50 comprises entre 0,07 et 0,1mg/l) et seulement 2 isolats/41 se sont montrés résistants (BCV07 avec une CI50 de 0,114 mg/l et BCV29 avec une CI50 de 0,136 mg/l). Ces deux derniers seraient donc probablement du phénotype HydR3 modéré. Toutefois nos analyses n'ont détecté aucun isolat fortement résistant au Fenhexamide.

L'étude des caractères biologiques est une étape cruciale en phytopathologie car elle permet l'observation et la mise en évidence de la diversité phénotypique des champignons mais elle présente certaines limites quant à l'identification des espèces et à leur classification ; ce qui nécessite le recours à des techniques plus fiables et précises. L'analyse moléculaire constitue alors un outil précieux car elle permet l'identification de chaque souche grâce à des séquences nucléiques spécifiques et de mettre en évidence la diversité génétique au sein d'une population donnée.

La première étape de toute analyse génétique est l'extraction et la purification des acides nucléiques. Divers protocoles sont décrits à cet effet mais en fonction du champignon étudié et des conditions de travail, tous ne donnent pas des extraits dont les caractéristiques permettent l'exploitation. Dans notre étude nous avons opté pour un protocole d'extraction à base de CTAB. C'est un protocole qui donne des résultats assez intéressants pour *Botrytis cinerea*. Dans notre cas il a donné des extraits de qualité variable mais qui ont toutefois permis d'obtenir des résultats.

La variabilité génétique de notre population a été étudiée par la détection des éléments transposables par PCR. Lors de cette analyse, 16 isolats se sont avérés du type *Boty* et 25 du type *Vacuma* ; mais aucun isolat du type *Transposa* ou *Flipper* n'a été détecté.

Notre étude nous a permis de recueillir une quantité importante de données concernant la variabilité phénotypique et génétique de notre collection. Elle ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude des structures des populations de *Botrytis cinerea* dans les vignobles Algériens : Un échantillonnage à plus grande échelle, une caractérisation phénotypique plus détaillée (à savoir la description des morphotypes et des aspects culturels dans des conditions plus rigoureuses, l'étude du pouvoir pathogène sur une plus large gamme d'hôtes et de variétés et l'étude du fitness et des résistances croisées aux fongicides) ainsi que l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires tels que les CAPS, les AFLP, les RFLP et les SSRs pour la caractérisation génétique apporterait des données plus précises sur la situation dans nos vignobles et nous permettraient de lutter plus efficacement contre cette espèce tant redoutée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrous M., 1993.** Programme National Algérien de production de plants saints de vigne. Compte rendu de la première réunion de coordination. Tunis 18 – 24 Avril 1993.
- Agrios, G.N., 2005.** Plant Pathology, 5^{ème} édition. Ed. Academic Press, London, UK. 922p
- Agulhon R., Bassino J.P., Boniface J.C., Bruchbuhler Ch., Milaire H.G., Mouchart A. et Roussel C., 1980.** Protection intégrée au vignoble, contrôles, seuils et indications pour la lutte. Ed. ACTAITV. 48p.
- Ajouz S., 2009.** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thes.; Doc. Univ. d'Avignon et des pays de Vaucluse. 198p.
- Albertini C. et Leroux P., 2004.** A *Botrytis cinerea* putative 3-keto reductase gene that is homologous to mammalian 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene. European Journal of Plant Pathology n°110. Pp. 723-733
- Albertini C. Thebaud G., Fournier E. et Leroux P., 2002.** Euburicol 14 α -demethylase gene (CVP51) polymorphism and specialisation in *Botrytis cinerea*. Mycological Research n°106. Pp. 1171–1178.
- Anonyme, 2007.** Note nationale Botrytis, INRA, SDQPV, CIVC, ITV, Chambres d'agriculture.
- Baroffio C.A., Siegfried W. et Hilber V.W., 2003.** Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole and hydroxyanilide fungicides in Switzerland. Plant Disease n°87. Pp. 662-666.
- Beever R.E. et Weeds P.L., 2007.** Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press. Pp. 29-52.
- Beever R.E. et Weeds P.L., 2004.** *Botrytis* taxonomy and genetic variation. In Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. Pp. 29-52.
- Birchmore R.J. et Forster B., 1996.** FRAC methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides. EPPO Bulletin n°26. Pp. 181-197.
- Blakeman J.P., 1993.** Pathogens in the foliar environment. Plant Pathology n°42. Pp. 479-493.
- Blakeman J.P. et Fokkema N.J., 1982.** Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology n°20. Pp. 167-192.
- Bollen G.J. et Scholten G., 1971.** Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. Netherlands Journal of Plant Pathology n°77. Pp. 83-90.
- Boudon-Padieu E., Ridé M. et Waler B., 2000.** Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne. Ed. Feret, Bordeaux, France.
- Bourahala A., 2010.** Contribution à l'étude de l'effet antagoniste de *Trichoderma* sp. Et à l'efficacité d'un fongicide sur des isolats de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne. Mém. Ing. ENSA. 61p.

- Büttner P., Koch F., Voigt K., Quidde T., Risch S., Blaich R., Brückner B. et Tudzynski P., 1994.** Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* n°25. Pp. 445-450.
- Centre National De Séquençage. Genoscope, 2008.** www.genoscope.cns.fr [en ligne] consulté le 04-01-2009. Mise à jour du 16 janvier 2008.
- Corbett J.R., Wright K. et Baillie A.C., 1984.** The Biochemical Mode of Action of Pesticides – 2nd Edition. Academic Press, London, UK.
- Couteux A. et Lejeune V., 2003.** Index phytosanitaire Acta 2003 – 38^{ème} édition. ACTA, Paris, France.
- Debieu D., Bach J., Hugon M., Malosse C. et Leroux P., 2001.** The hydroxylanilidefenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pesticide Management Science* n°57. Pp. 1060-1067.
- 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* n°99. Pp. 185-193.
- Diguta F.C., 2010.** Ecologies des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse doctorat. Univ. Bourgogne
- Dik A.J. et Wubben J.P., 2004.** Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses; *In Botrytis: biology, pathology and control*. Springer. Pp.319-334.
- Diolez A., Marches F., Fortini D., Brygoo Y., 1995.** Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* n°61. Pp. 103-108.
- Du Preez J., Macartney K. et Joshua F., 2011.** The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Arch. Virol.* n°156. Pp. 1495-1503.
- Dubos B., 2002.** Maladies Cryptogamiques de la Vigne, Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Ed Faret, Bordeaux. 207p.
- Dubos B., 1999.** Maladies Cryptogamiques de la Vigne, Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Ed Faret, Bordeaux. 174p.
- Dubos B., 1992.** Biological control of *Botrytis*, State-of-the-art. In: Verhoeff K, Malathrakis NE and Williamson B (eds) *Recent Advances in Botrytis Research*. Pu doc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands. Pp. 169-178.
- Elad Y. et Stewart A., 2007.** Microbial Control of *Botrytis spp.* In : Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. et Delen N. (eds) *Botrytis : Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 223-242.
- Elad Y. et Freeman S., 2002.** Biological control of fungal plant pathogens. In: Kempken F (ed.) *The Mycota, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Vol. XI. Agricultural Applications. Springer, Heidelberg, Germany. Pp. 93-109.
- Elmer P.A.G. et Michailides T.J., 2007.** Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In : Elad Y., Williamson B., Tudzynski P et Delen N. (eds) *Botrytis : Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 243-272.

- Esterio M., Munoz G., Ramos C., Cofré G., Estévez R. et Salinas A., 2011.** Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the Central Valley of Chile. *Plant Dis* n°95. Pp. 683–90.
- Esterio M., Auger J., Ramos C. et García H., 2007.** First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. *Plant Diseases* n°91. 768p.
- FAOstat, 2013.** Food and Agriculture Organisation. Statistics database, 2013.
- FAOstat, 2009.** Food and Agriculture Organisation. Statistics database, 2009.
- Faretra F. et Pollastro S., 1991.** Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* n°95. Pp. 943-951.
- Faretra F. et Antonacci E., 1987.** Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* n°26. Pp. 29-35.
- Fekete Ev., Fekete Er., Irinyi L., Karaffa L., Árnayasi M., Asadollahi M. et Sándor E., 2011.** Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiological Research*. Elsevier. 9p.
- Fillinger S., Leroux P., Auclair C., Barreau C., Al Hajj C. et Debieu D., 2008.** Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* n°52. Pp. 3933–3940.
- Forster B. et Staub T., 1996.** Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* n°15. Pp. 529-537.
- Förster H., Driever G.F., Thompson D.C., Adaskaveg J.E., 2007.** Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease* n°91. Pp. 209-215.
- Fournier E., Giraud T., Albertini C., Brygoo Y., 2005.** Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*. n°97. Pp. 1251-1267.
- Fournier E., Levis C., Fortini D., Leroux P., Giraud T. et Brygoo Y., 2003.** Characterization of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus and its use as a population marker. *Mycologia* n°95. Pp. 251-261.
- Galet P., 1977.** *Les maladies et les parasites de la vigne*. Tome I : Les maladies dues à des végétaux : champignons, bactéries, viroses et phanérogame. Ed. *Paysans du midi*. Montpellier, France. 872pp.
- Girard G., 2001.** Bases scientifiques et technologiques de la viticulture. Edition tec et doc, Paris. 334p.
- Giraud T., Fortini D, Levis C., Lamarque C., Leroux P., Lobuglio K. et Brygoo Y., 1999.** Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology*. n°89. Pp. 967-973. In : *Epidémiologie moléculaire des populations du champignon phytopathogène Botrytis cinerea soumis à des pressions de sélection anthropiques*. NEEMA. C. PR., 2008. Thèse Ecole Doctorale « Science du végétal du gène à l'écosystème SDV 145 ». Université Paris Sud 11-Institut de Biotechnologie des plantes.

- Giraud T., Levis C., Fortini D., Leroux P. et Brygoo Y., 1997.** RFLP Markers Show Genetic Recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and Transposable Elements Reveal Two Sympatric Species. *Mol. Biol. Evol.* n°14. Pp. 1177-1185.
- Goto S., 1980.** Changes in the wild yeast flora of sulfited grape musts. *J. Inst. Enol. Vitic.* n°15. Pp. 29-32.
- Gullino M.L., et Kuijpers L.A.M., 1994.** Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology* n°32. Pp. 559-579.
- Hamada W., Soulié M.C., Malfatti P., Bompeix G. et Boccara M., 1997.** Stability and modulated expression of a hygromycin resistance gene integrated in *Botrytis cinerea* transformants. *FEMS Microbiology Letters* n°154. Pp. 187-193.
- Holz G., Coertze S., et Williamson B., 2007.** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In : Elad Y., Williamson B., Tedzynski P and Delen N. (eds) *Botrytis : Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 9-24.
- Isenegger DA, 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* n°29. Pp. 17-26.
- Karchani-Balma S., Gautier A., Raies A. et Fournier E., 2008.** Geography, plants and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* n°98. Pp. 1271-1279.
- Keller M., Steel C. et Creasy, G. L., 2000.** Stilbene accumulation in grapevine tissues: Developmental and environmental effects. *Acta Hort* n°514. Pp. 275-286.
- Korolev N., Mamiev M., Zahavi T. et Elad Y., 2011.** Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *European Journal of Plant Pathology*. n°129. Pp. 591-608.
- Kretschmer M., Leroch M., Mosbach A., Walker A.S., Fillinger S., et al., 2009.** Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens Journal*.
- Kretschmer M. et Hahn M., 2008.** Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* n°115(5). Pp. 214-219.
- Larnaude M., 1948.** La vigne en Algérie (D'après H. Isnard). *Annales de Géographie*. 57 (308) : 356-359.
- Latorre B.A., Spadaro I. et Rioja M.E., 2002.** Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to aminopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* n°21. Pp. 957-961.
- Lehad A., Soltani I., Louanchi M., Ait Ouada M. et Mahfoudhi N., 2013.** Comparaison du test immunoenzymatique ELISA et des RT-PCR pour la détection des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne. Séminaire international sur la protection des cultures stratégiques en Algérie : situation et perspectives d'avenir. Chlef les 28, 29 et 30 Mai 2013.
- Lehad A., 2008.** Détection de virus de l'enroulement de la vigne dans la région de Boumerdès et mise au point d'un sérum anti GLRaV. *Mem. Ing. ENSA*. 36p.

Leroux P., 2007. Chemical Control of *Botrytis* and its Resistance to Chemical Fungicides ; In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. Pp.195-222.

Leroux P., 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, p. 195-222, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Leroux P., Walker A.S. et Senechal Y., 2003. Etude de la sensibilité de *Botrytis cinerea* au boscalid. In: 7th International Conference on Plant Diseases (cdROM; www.afpp.net). AFPP, Paris, France.

Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M. et Chapeland F., 2002a. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Management Science n°58. Pp. 876-888.

Leroux P., Fournier E., Brygoo Y. et Panon M.L., 2002b. Biodiversité et variabilité chez *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise. Phytoma n°554. Pp. 38-42.

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

Leroux P., Chapeland F., Arnold A. et Gredt M., 1998. Résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides : Du laboratoire au vignoble et vice versa. Phytoma – La Défense des Végétaux n°504. Pp. 62-67.

Leroux P., Gredt M., Arnold A. et Bernard T., 1997. Etude de la sensibilité de *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise, vis à vis du fluazinam. In: 5th International Conference on Plant Diseases ANPP, Paris, France. Pp. 501-507.

Leroux P. et Moncomble D., 1993a. Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne : Passé, présent et Futur (1^{re} partie). Phytoma – La Défense des Végétaux n°450. Pp. 27-30.

Leroux P. et Moncomble D., 1993b. Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne : Passé, présent et Futur (2^{ème} partie). Phytoma – La Défense des Végétaux n°451. Pp. 23-27.

Leroux P. et Clerjeau M., 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticolata* fungicides in French vineyards. *Crop Protection* n°4. Pp. 137-160.

Levis C., Fortini D. et Brygoo Y., 1997. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics* n°32. Pp 157-162.

Leyronas C., 2005. Avancées dans la compréhension des *Neotyphodium* et *Epichloe*, clavicipitacées endophytes des graminées fourragères et à gazon. Méthodes de lutte. Thèse Doctorat. Spécialité Phytopathologie. Institut National Agronomique, Paris-Grignon, 160p.

Lorbeer J.W., 1980. Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Coley-Smith J.R., Verhoeff K. and Jarvis W.R. (eds) *The biology of Botrytis* (pp.19-40). Academic press, London, UK.

Ma Z.H. et Michailides T.J., 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Dis.* n°89. Pp. 1083-9.

- MacFarlane H.H., 1968.** Plant Host – Pathogene Index to Volumes 1 – 40 (1922 – 1961), Review of Applied Mycology. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 820p.
- Malathrakis N.E., 1989.** Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. Plant Disease n°73. Pp. 138-141.
- Martinez F., Dubos B. et Fermaud M., 2005.** The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. Phytopathology n°95. Pp. 692-700.
- Martinez J.P., Blancard D., Lecomte P. et Levis C., 2003.** Phenotypic differences between *vacuina* and *transpose* subpopulations of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology n°109. Pp. 479-488.
- Meamiche-Neddaf H., 2010.** Etude de la spécialisation parasitaire et de la diversité génétique d'une collection d'isolats de *Botrytis spp.* Mémoire de Magistère. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger. 82p.
- Mirzaei S., Mohammadi-Goltapeh E., Shams-Bakhsh M., Safaie N. et Chaichi M., 2009.** Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. Journal of Phytopathology n°157. Pp. 474-482.
- Moyano C., Alfonso G., Gallego J., Raposo R. et Melgarejo P., 2003.** Comparison of RAPD and AFLP markers analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* Populations. European Journal of Plant Pathology. n°109. Pp. 515-522.
- Muñoz G., Hinrichsen P., Brygoo Y. et Giraud T., 2002.** Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* n°106(5). Pp. 594-601.
- Murray M.G. et Thompson W.F., 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* n°8. Pp. 4321 - 4325.
- Myresiotis C.K., Bardas G.A. et Karaoglanidis G.S., 2007.** Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Diseases* n°92. pp.1427-1431.
- Najimi B.S., El Jaafari M., Jlibène J.M., Jacquemin, 2003.** Application des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agro. Soc. Environ.* n°7(1). Pp. 17-35.
- Nakazawa Y. et Yamada M., 1997.** Chemical control of grey mould in Japan. A history of combating resistance. *Agrochemicals Japan* n°71. Pp. 2-6.
- Nielsen K., Yohalem D.S. et Jensen D.F., 2002.** PCR detection and RFLP differentiation of *Botrytis* species associated with neck rot of onion. *Plant disease* n°86. Pp. 682-686.
- Panagopoulos C.G., 1998.** Bacterial blight, diseases caused by bacteria and bacteria like organisms. Pp. 41-42. In *Compendium of Grape Diseases*. 4th edition. Eds. Pearson, R. and Goheen, A. APS Press, St. Paul, MN.
- Pande S., Sharma M., Kishore G.K., Shivram L. et Mangala U.N., 2010.** Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from chickpea: DNA polymorphisms, cultural, morphological and virulence characteristics. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(46). Pp. 7961-7967.

- Perret C., 2001.** Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Thèse Doctorat, Univ. Neuchatel, Suisse.
http://www.unige.ch/cyberdocuments/unine/theses2001/PerretC/these_body.html>
- Petsikos-Panayotarou N., Markellou E. et Kalamarakis A.E., 2003.** *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* resistant to other botryticides and selection of resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European Journal of Plant Pathology* n°109. Pp. 173-182.
- Pollastro S., Faretra F., Di Canio V. et De Guido A., 1996.** Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology* n°102. Pp. 607-613.
- Raski D.J., 1998.** Nematodes Parasites Of Grapes. Pp. 55-59. In *Compendium of Grape Diseases*. 4th edition. Eds. Pearson, R. and Goheen, A. APS Press, St. Paul, MN.
- Rewal N., Coley-Smith J.R. et Sealy-Lewis H.M., 1991.** Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* n°40. Pp. 554-560.
- Reynier A., 2007.** Manuel de viticulture. 10^{ème} édition. Tec & Doc Lavoisier. 515p.
- Reynier A., 2000.** Manuel de viticulture, 8^{ème} édition. Ed. Tec et Doc.515p.
- Rigotti S., Viret O. et Gindro K., 2006.** Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathol. Mediterr.*n°45. Pp. 253–260.
- Robert M., 2007.** Protection de la vigne contre *Botrytis cinerea* et stimulation des mécanismes de défense à l'aide de bacteria issues du vignoble Champenois. ThèseDoct. Univ. de Reims Champagne – Ardenne, France, 188p.
- Rosslenbroich H.J. et Stuebler D., 2000.** *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* n°19. Pp. 557-561.
- Smith C.M., 1988.** History of benzimidazole use and resistance. In: Delp CJ (ed.) *Fungicide Resistance in North America*. (pp. 23-24) American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Soler J., 2003.** http://algerroi.fr/Alger/agriculture_algerienne/texte/vigne_ofalac.htm.
- Sutty A., Pontzen R. et Stenzel K., 1999.** Fenhexamid-sensitivity of *Botrytis cinerea*: determination of baseline sensitivity and assessment of the risk of resistance. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* n°52. 145-157.
- Tanović B., Delibašić G., Milivojević J. et Nikolić M., 2009.** Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* N°61 (3). Pp. 419-429.
- Tiedemann A., 1997.** Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* n°50. Pp. 151-166.
- Tronsmo A., 1992.** Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological control agents. In: Tjamos ES, Papavizas GC and Cook RJ (eds), *Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for the Future*. Plenum Press, New York, USA. Pp. 43-54.

Valiuskaite A., Surviliene E. et Baniulis D., 2010. Genetic diversity and pathogenicity traits of *Botrytis* spp. isolated from horticultural hosts. *Agriculture* n°97 (4). Pp. 85-90.

Varela, L., Smith, R., and Phillips, P. 2001. Pierce's Disease. University of California, Agricultural and Natural Resources Publication 21600, Oakland. CA. 20 pages.

Viret O. et Siegfried W., 1995. Pourriture grise et pourriture acétique. Fiche technique n°41. Station de recherche Agroscope Changings-Wädenswil. Département EVD, Suisse.

Wagner D.B., Furnier G.R., Saghai-Marooof M.A., Williams S.M., Dancik B.P. et Allard R.W., 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in Lodgepole and Jack pines and their hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* N°84. Pp. 2097-2100.

Weber R.W.S., 2010. Occurrence of Hyd R3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in Northern German soft fruit production. *Journal of Plant Diseases and Protection*, n°117 (4). Pp. 177–179.

Whetzel H.H., 1945. A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate Discomycetes. *Mycologia* n°37. Pp 648-714.

Yarden O. and Katan T., 1993. Mutations leading to substitutions at amino-acids 198 and 200 of beta tubulin that correlates with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* n°83. Pp. 1478-1483.

ANNEXES

Annexe 1 : liste des porte-greffes et cépages de vigne autorisés à la production et à la commercialisation

Selon le Journal officiel de la république algérienne n°07 du 28 janvier 2009.

A. Liste des porte-greffes viticoles

01- Chasselas X Berlandieri	41 B (A Millardet et de Grasset)
02- Rupestris X Berlandieri	110 Richter
03- Rupestris X Berlandieri	140 Ruggeri
04- Riparia X Berlandieri	So4
05- Rupestris X Berlandieri	1103 Paulsen
06- Rupestris X Berlandieri	99 Richter
07- Riparia X Rupestris	3309 Couderc
08- Rupestris Du Lot	
09- Berlandieri X Rupestris Martin	1447 Paulsen
10- Riparia X Berlandieri	420 (A Millardet et de Grasset)

B. Liste des variétés de vigne

1. Cépage de table

01- Adari	21- Reine des vignes
02- Ahmeur Bou Ameur	22- Servant blanc
03- Alphonse Lavallee	23- Valensi (= Mokrani = panse de provence)
04- Bezoul El Khadem	24- Farana
05- Cardinal	25- Black Pearl
06- Chaouch Blanc	26- Centennial
07- Chaouch Rose	27- Argentina
08- Chasselas	28- King.s Ruby
09- Dabouki	29- Aledo
10- Dattier de Beyrouth	30- Nerona
11- Gros noir des Beni Abbes	31- Bronx
12- Guerbez (= gros vert = Saint Jeannet)	32- Emerald
13- Italia	33- Christmas rose
14- Madeleine du Sahel	34- Pasiga
15- Muscat d'Alexandrie	35- Alvina
16- Muscat de Hambourg	36- Dona Maria
17- Ohanes (= Uva de Almeria)	37- Matilde
18- Panse precoce (= Sicilien)	38- Datal
19- Perle de Ksaba	39- Danam
20- Perlette	40- Red globe

2. Cépage à raisins secs

1- Sultanine	4- King.s Ruby
2- Muscat d.Alexandrie	5- Centennial
3- Corinthe noire	

3. Cépage de cuve

Raisins noirs ou roses

- 1- Alicante Bouschet
- 2- Aramon gris
- 3- Aramon noir
- 4- Cabernet Franc
- 5- Cabernet Sauvignon
- 6- Carignan
- 7- Cinsault
- 8- Grenache Franc
- 9- Grenache rose
- 10- Grenache Velu
- 11- Merlot
- 12- Morastel (= gros Matterou)
- 13- Mourvedre (= matterou fin)
- 14- Pinot noir
- 15- Syrah
- 16- Tipasi (= toustrain = plant Romain)
- 17- Grenache gris
- 18- Grenache noir

Raisins blancs

- 1- Chardonnay
- 2- Chenin blanc
- 3- Clairette
- 4- Farana
- 5- Grenache blanc
- 6- Macabeu (= Macabeo)
- 7- Merseguerra (=listan=palomino)
- 8- Muscat d.Alexandrie
- 9- Sauvignon
- 10- Tizourine Bou Afrara (= S. d.Algérie)
- 11- Ugni blanc (= El Maoui)
- 12 Valenci blanc
- 13- Pinot blanc

Annexe 2 : composition des milieux de culture utilisés

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

- Pomme de terre 200g (cuites dans 200ml d'eau distillée, puis filtrées)
 - Au filtrat sont ajoutés :
- Glucose 20g
- Agar 20g
- Eau distillée qsp 1000ml

Milieu Malt-Agar

- Extrait de malt 20g
- Agar 20g
- Eau distillée qsp 1000ml

Annexe 3 : Fiche technique du Fenhexamide (Teldor ®)

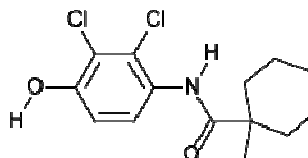
Le Fenhexamide est un fongicide à action loco-systémique et d'usage préventif. Il appartient à la nouvelle famille chimique des Hydroxyanilides. Il a une excellente efficacité et une action de longue durée vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et de *Monilinia spp.* Le Fenhexamide est un inhibiteur de la biosynthèse des stérols agissant à de faibles concentrations sur la croissance mycélienne et l'élongation des tubes germinatifs.

INFORMATIONS GENERALES :

- ✗ Nom commercial : TELDOR ® (FENHEXAMID WG 50 W U-DE).
- ✗ Code du produit : (UVP) 05419441.
- ✗ Formulation : Granulés dispersibles dans l'eau.
- ✗ Détenteur d'homologation : Bayer S.A.S - Bayer CropScience 16, rue Jean-Marie Leclair - CS 90106 - F-69266 Lyon Cedex 09
- ✗ Substance active : Fenhexamid 50%
- ✗ Famille chimique : Hydroxyanilides
- ✗ Utilisation : Fongicide

PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES :

- ✗ Formule brute : $C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$
- ✗ Formule semi étalée :



- ✗ Nom chimique : N-(2,3-dichloro-4-hydroxyphényl)-1-méthylcyclohexanecarboxamide
- ✗ Masse molaire : 302,196g/mol
- ✗ pH : 8,5 - 9,5 à 10 g/l (20 °C)
- ✗ Point/ intervalle de fusion : 140 °C
- ✗ Indice de combustion : IC3 Combustion localisée, sans extension à 20 °C
- ✗ Autres informations : Les poussières du produit sont explosibles

INFORMATIONS TOXICOLOGIQUES

- ✗ Toxicité aiguë par voie orale : DL50 (rat) > 2.000 mg/kg
- ✗ Toxicité aiguë par pénétration cutanée : DL50 (rat) > 2.000 mg/kg
- ✗ Irritation de la peau : Faiblement irritant (lapin)
- ✗ Irritation des yeux : Faiblement irritant (lapin)

Usage

CULTURE	CIBLE	DOSES	SPECIFICATIO NSD'USAGE	DAR (EN JOURS)
Vigne raisin de table	Botrytis cinerea (Pourriture grise)	1.5kg/ha	1 trait. /an maximum	7
Vigne raisin de cuve	Botrytis cinerea (Pourriture grise)	1.5kg/ha	1 trait. /an maximum	14
Fraisier	Botrytis cinerea (Pourriture grise)	1.5kg/ha	2 trait. /an maximum	3
Tomate	Botrytis cinerea (Pourriture grise)	1.5kg/ha	2 trait. /an maximum	3
Cultures porte- graine mineures	Maladies diverses	1.5kg/ha	2 trait. /an	Non concernées
Framboisier et autres rubus	Botrytis	1.5kg/ha	2 trait. /an	7
Myrtilier	Botrytis	1.5kg/ha	2 trait. /an	28
Cassissier	Botrytis	1.5kg/ha	2 trait. /an	28

Annexe 4 : composition des différentes solutions utilisées pour l'extraction d'ADN

1. CTAB (Cetyltrimethyl-Amonium Bromide)

NaCl	20,45g
Tris base	3,025g
EDTA	1,86g
CTAB	10g
Eau distillée	qsp 250ml

Ajuster le pH à 8 avant de compléter le volume.

Autoclaver.

0,2% de β -mercaptoéthanol sont ajoutés à la solution au moment de l'utilisation.

Conserver à température ambiante quelques semaines

2. Mélange Chloroforme/Acide isoamilique 24/1 V/V

Chloroforme	240ml
Alcool isoamilique	10ml

Conserver à température ambiante

3. Tampon de lavage

Acetate d'Amonium	0,195g
Ethanol absolu	190ml
Eau distillée qsp	250ml

Conserver au congélateur à -20°C

4. Tampon TE (Tris EDTA)

Tris base	0,303g
EDTA	0,093g
Eau distillée	qsp 250ml

Ajuster le pH à 8 avant de compléter le volume.

Autoclaver.

Conserver au réfrigérateur à 4°C.

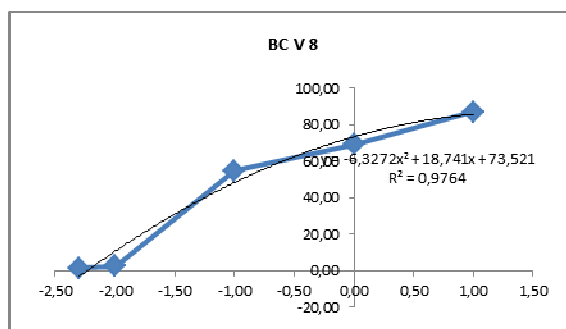
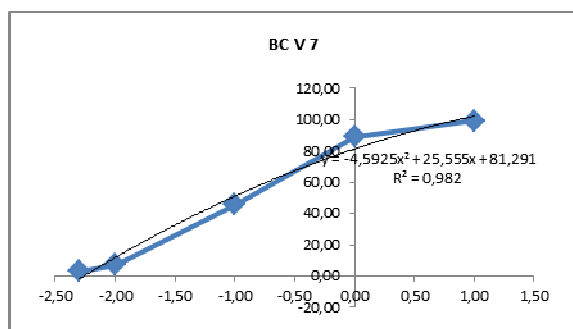
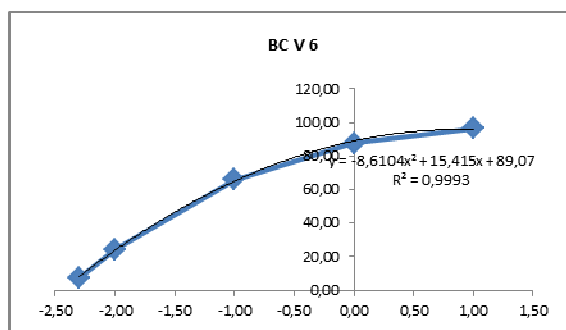
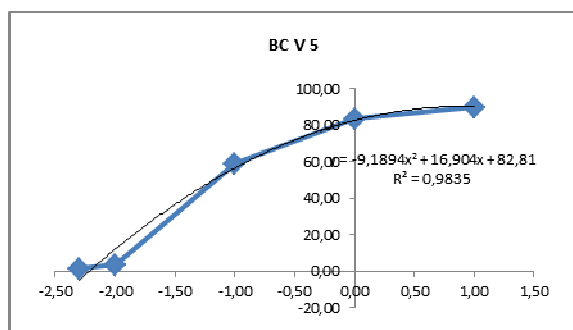
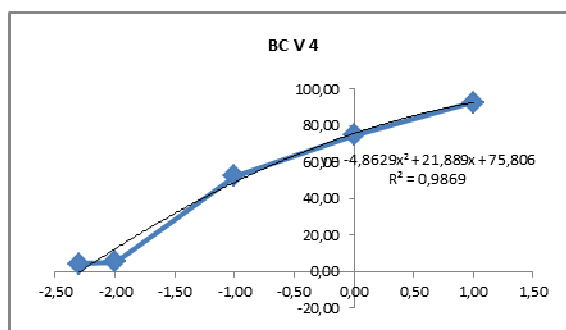
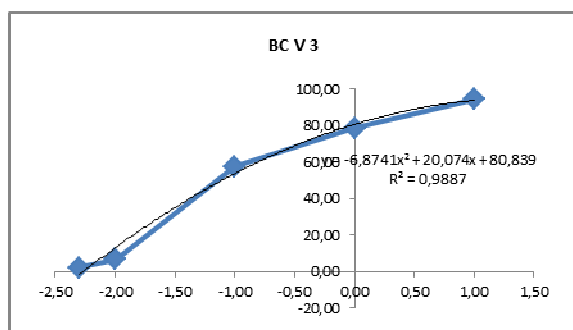
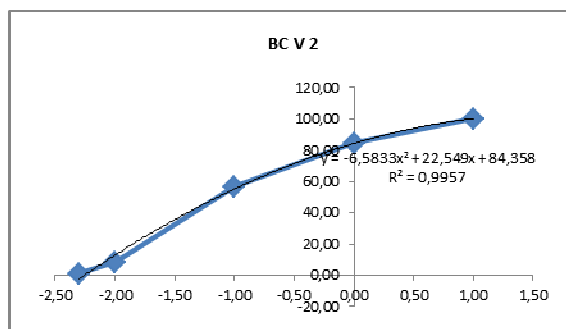
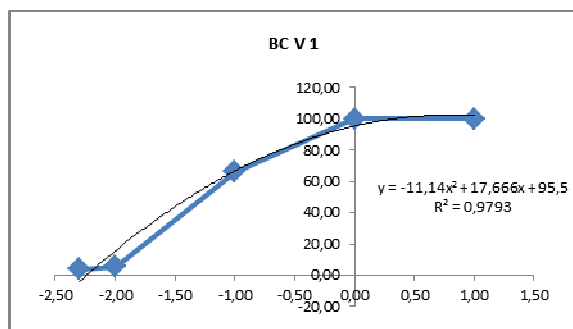
Annexe 5 : composition du tampon de migration TAE 10x

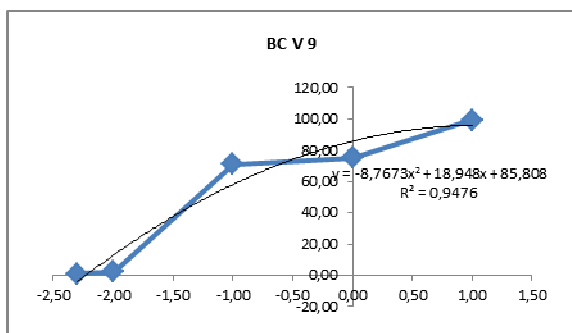
EDTA	3,72g
Tris base	48,2g
Acide acétique	11,4ml
Eau distillée	qsp 1000ml

Ajuster le pH à 8 avec l'acide acétique (l'ajouter au fur et à mesure jusqu'au pH 8)

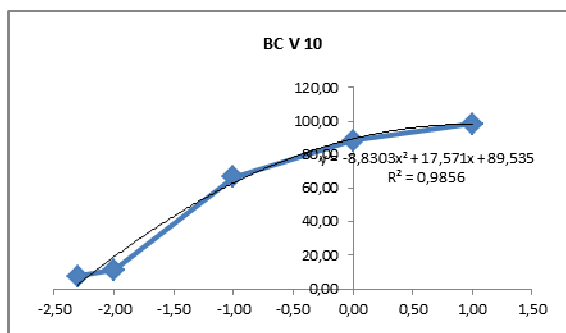
Pour la préparation du gel d'électrophorèse, préparer du TAE1x en diluant le TAE 10x (100ml dans 900ml d'eau distillée).

Annexe 6 : courbes Dose/Réponse du Fongicide Fenhexamide

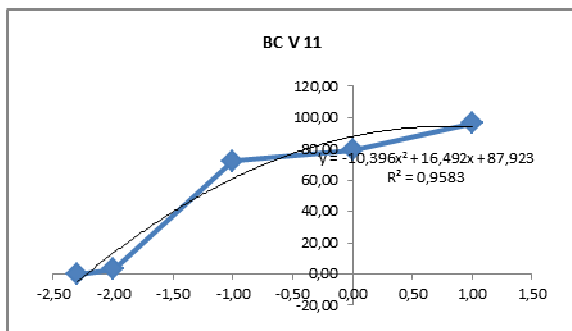




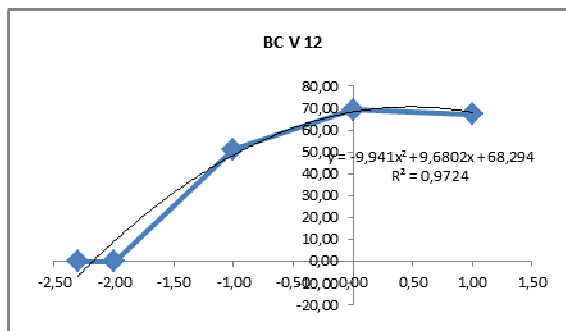
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV09 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



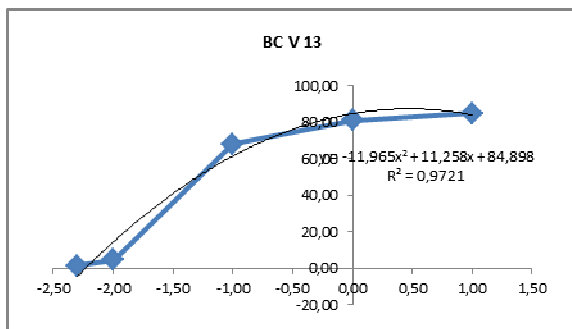
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV10 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



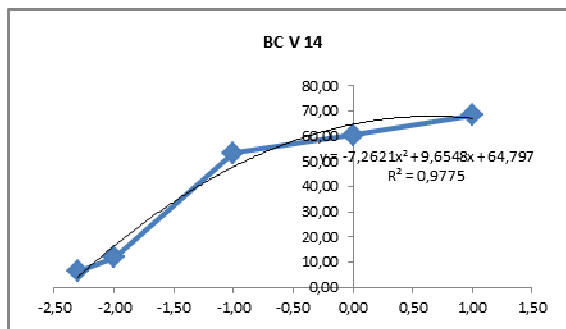
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV11 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



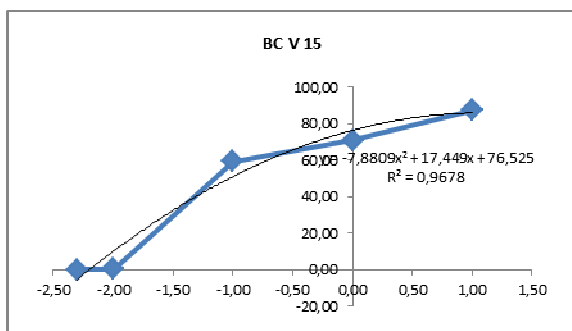
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV12 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



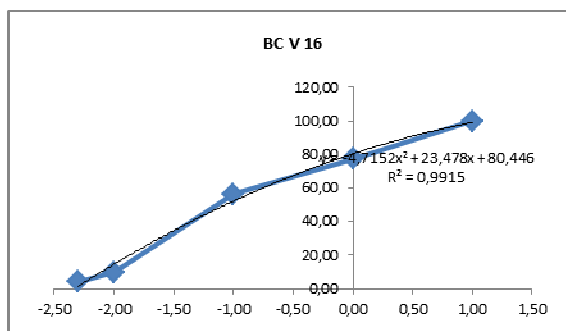
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV13 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



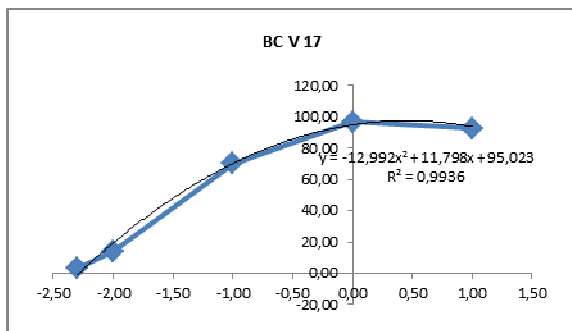
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV14 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



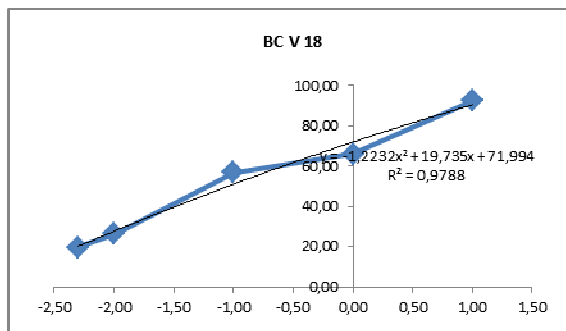
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV15 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



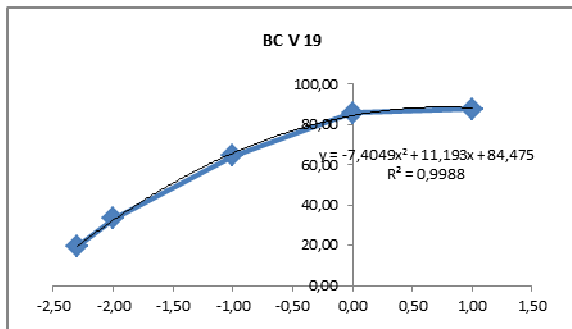
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV16 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



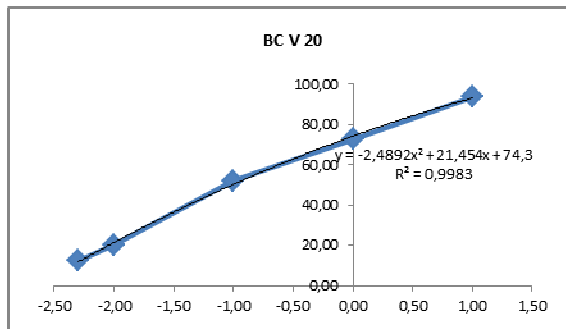
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV17 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



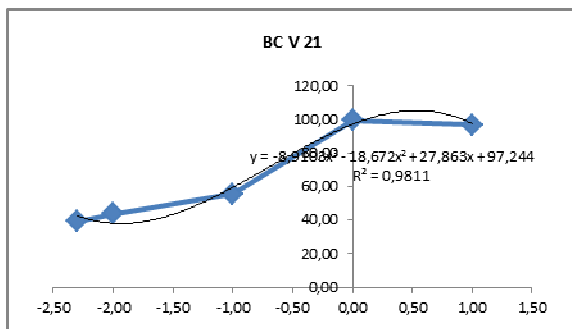
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV18 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



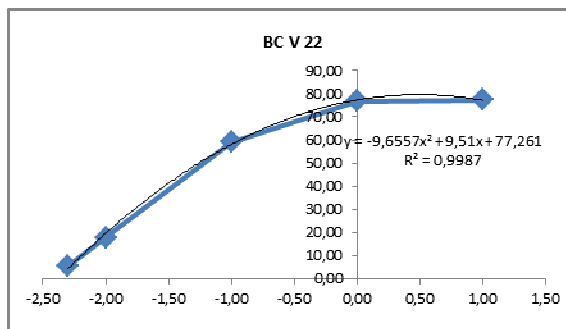
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV19 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



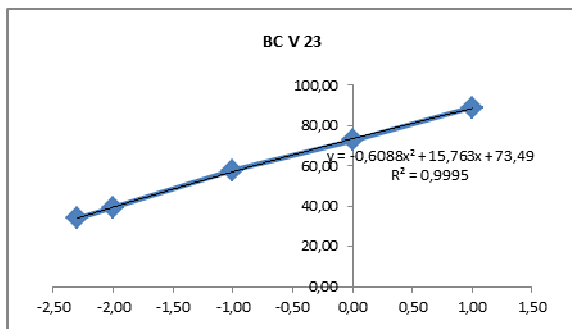
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV20 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



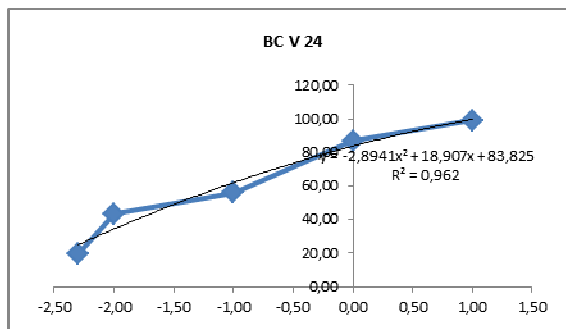
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV21 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



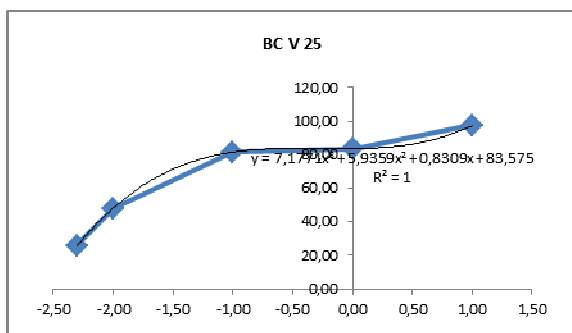
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV22 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



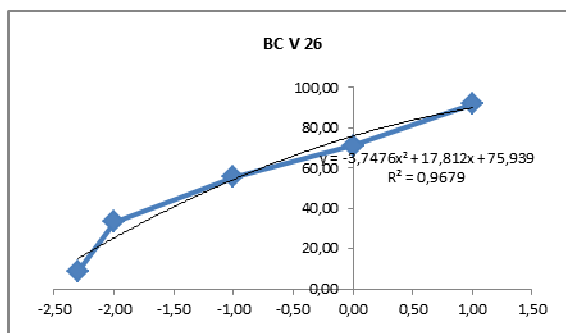
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV23 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



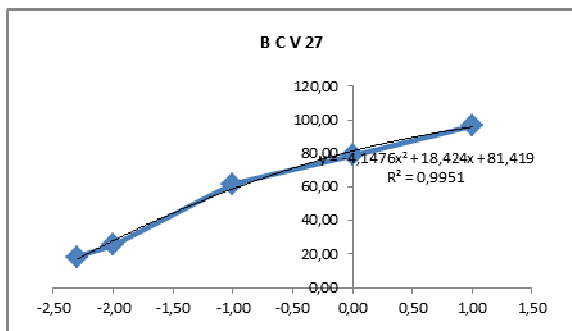
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV24 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



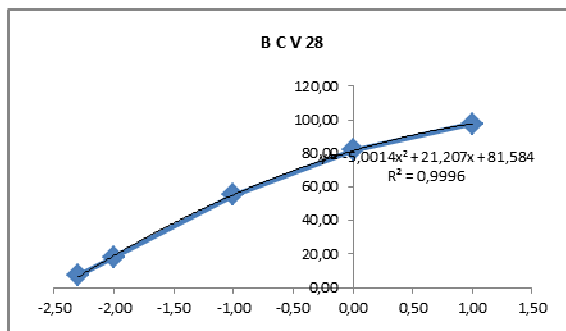
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV25 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



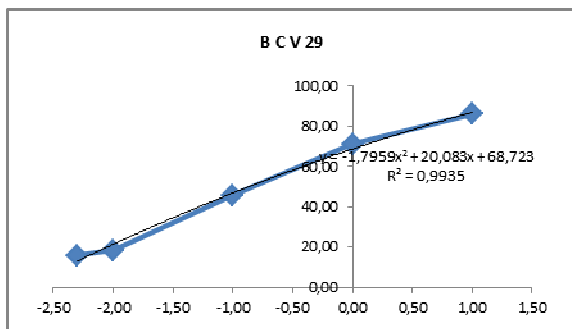
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV26 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



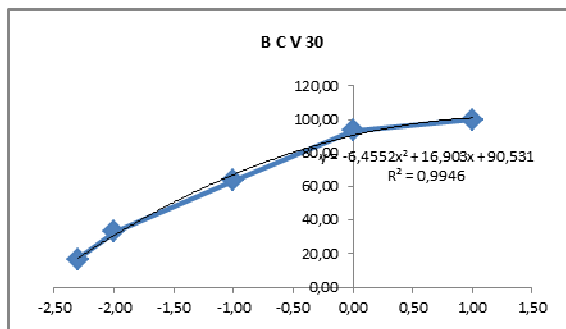
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV27 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



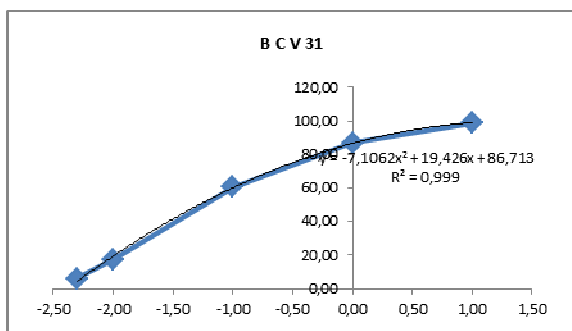
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV28 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



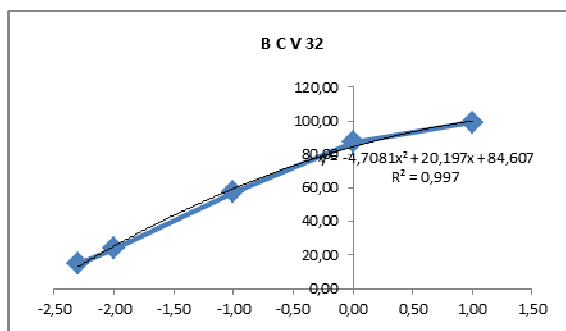
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV29 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



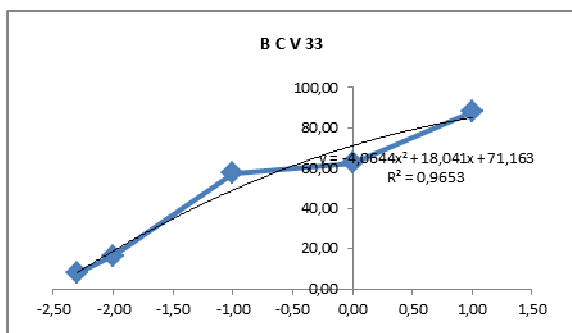
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV30 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



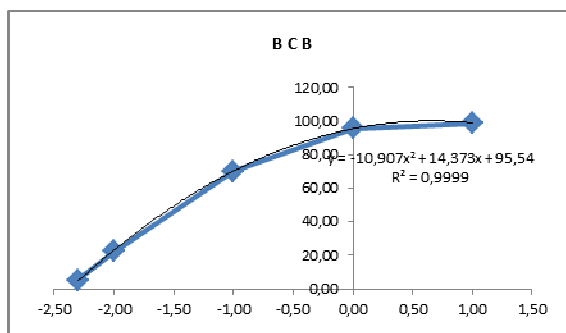
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV31 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



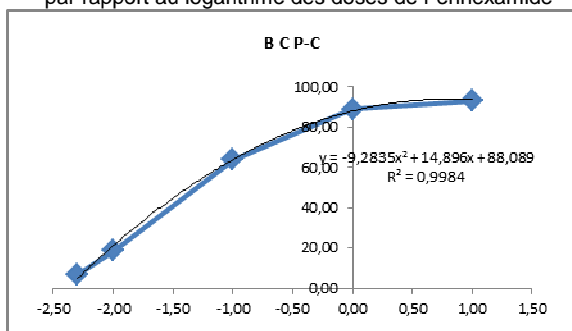
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV32 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



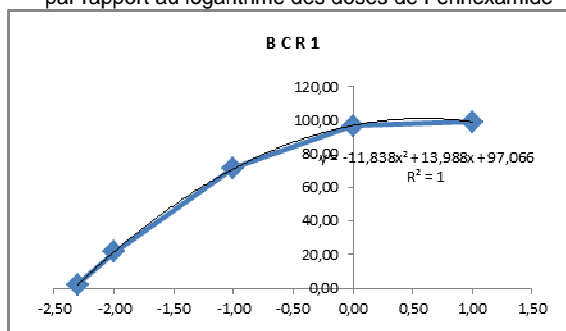
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCV33 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



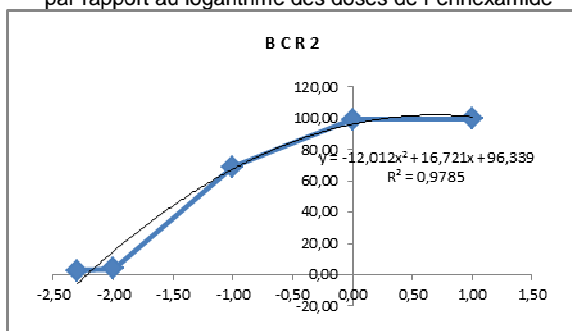
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCB par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



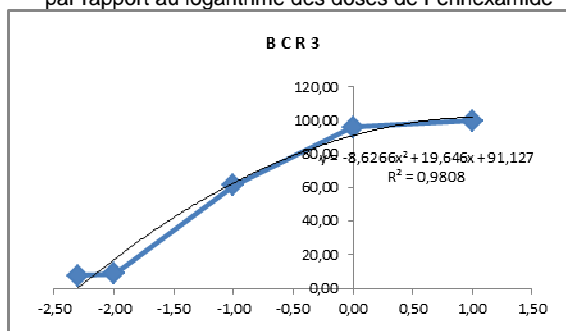
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCP-C par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



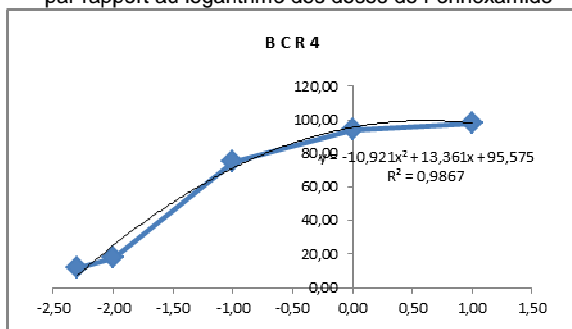
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCR1 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



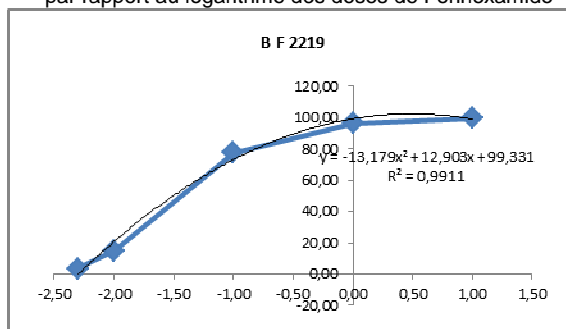
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCR2 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



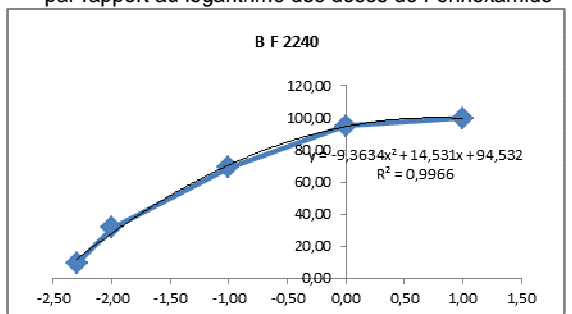
Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCR3 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BCR4 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BF2219 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide



Evolution des pourcentages d'inhibition de l'isolat BF2240 par rapport au logarithme des doses de Fenhexamide

Annexe 7 : analyse statistique des résultats du test de la vitesse de croissance mycélienne

Tableau I : Analyse de la variance (ANOVA) à 1 facteur (isolats) / Croissance mycélienne.

Source	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	4738,7	40	118,467	9,56	0,0000
Intra-groupes	1016,67	82	12,3984		
Total (Corr.)	5755,37	122			

Tableau II : Tests des étendues multiples pour Croissance par Isolats (Méthode: 95,0 % LSD)

<i>Isolats</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
BCV23	3	51,0	X
BF2240	3	51,1667	X
BCR3	3	51,8333	X
BCV21	3	52,1667	X
BCV29	3	58,0	X
BCV27	3	58,1667	X
BCR2	3	58,1667	X
BCV1	3	60,0	XX
BCR1	3	60,1667	XX
BCV32	3	60,1667	XX
BCV19	3	60,5	XX
BCV31	3	61,0	XX
BCV25	3	61,0	XX
BCV30	3	61,0	XX
BCV2	3	61,0	XX
BCR4	3	61,1667	XX
BCV6	3	61,1667	XX
BCV7	3	61,1667	XX
BC P-C	3	61,3333	XX
BCV20	3	62,0	XXX
BF2219	3	62,8333	XXX
BCV28	3	63,1667	XXXX
BCV33	3	63,1667	XXXX
BCB	3	63,5	XXXX
BCV22	3	64,0	XXX
BCV24	3	64,1667	XXX
BCV17	3	64,3333	XXX
BCV8	3	64,3333	XXX
BCV18	3	64,3333	XXX
BCV3	3	64,5	XXX
BCV14	3	64,5	XXX
BCV10	3	67,3333	XXX
BCV9	3	68,6667	XXX
BCV26	3	71,3333	XXX
BCV15	3	72,3333	XXX
BCV12	3	72,5	XXX
BCV11	3	73,1667	XX
BCV4	3	73,3333	XX
BCV5	3	74,0	XX
BCV13	3	74,5	X
BCV16	3	75,3333	X

Annexe 8 : analyse statistique des résultats du test de pathogénicité

Tableau III : Analyse de la variance (ANOVA) à 1 facteur (isolats) / indice d'attaque.

Source	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	145,402	40	3,63506	8,06	0,0000
Intra-groupes	55,5	123	0,45122		
Total (Corr.)	200,902	163			

Tableau IV : Tests des étendues multiples pour indice d'attaque par Isolats (Méthode: 95,0 % LSD)

Isolats	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
BCV3	4	0,0	X
BF2219	4	0,0	X
BCV26	4	0,0	X
BCV17	4	0,25	XX
BCV16	4	0,25	XX
BCR1	4	0,5	XX
BCV11	4	0,5	XX
BCV18	4	0,5	XX
BCV28	4	0,75	XXX
BCV27	4	0,75	XXX
BCV13	4	0,75	XXX
BCV10	4	0,75	XXX
BCV7	4	0,75	XXX
BCB	4	0,75	XXX
BCV29	4	1,0	XXX
BC P-C	4	1,0	XXX
BCV32	4	1,0	XXX
BCV30	4	1,5	XXX
BCV8	4	1,5	XXX
BCV24	4	1,5	XXX
BCV6	4	1,5	XXX
BCV21	4	1,5	XXX
BCV1	4	1,75	XXX
BCV15	4	1,75	XXX
BCV14	4	1,75	XXX
BCV9	4	1,75	XXX
BCV23	4	1,75	XXX
BF2240	4	1,75	XXX
BCV20	4	1,75	XXX
BCV33	4	1,75	XXX
BCV22	4	2,0	XXX
BCV12	4	2,0	XXX
BCR3	4	2,0	XXX
BCV2	4	2,5	XXX
BCV4	4	2,5	XXX
BCR2	4	2,5	XXX
BCV25	4	2,75	XXX
BCR4	4	3,0	XXX
BCV5	4	3,0	XXX
BCV19	4	3,5	XX
BCV31	4	3,75	X

Annexe 9 : Analyse statistique des résultats du test d'efficacité du fongicide Fenhexamide

Tableau V : Analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs (doses – isolats) / diamètre des colonies.

Source	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Probabilité
EFFETS PRINCIPAUX					
A:Doses	554977	5	110995	5569,68	0,0000
B:Isolat	27179,9	40	679,498	34,10	0,0000
INTERACTION AxB	23466	200	117	5,89	0,0000
RESIDU	9805	492	20		
TOTAL	615428	737			

Tableau VI : Tests des étendues multiples pour Diamètres par Doses (Méthode: 95,0 % LSD)

Doses	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
Dose 5	123	10,8984	0,402518	X
Dose 4	123	18,7602	0,402518	X
Dose 3	123	34,5081	0,402518	X
Dose 2	123	67,5447	0,402518	X
Dose 1	123	73,9431	0,402518	X
Témoin	123	80,313	0,402518	X

Tableau VII: Résumé statistiques des diamètres des colonies en fonction des différentes doses

Doses	Effectif	Moyenne	Ecart type	Limite inf.	Limite sup.
Témoin	123	80,313	6,0792	79,5221	81,1039
Dose 1	123	73,9431	10,2398	73,1522	74,734
Dose 2	123	67,5447	12,4943	66,7538	68,3356
Dose 3	123	34,5081	7,5177	33,7173	35,299
Dose 4	123	18,7602	9,7416	17,9693	19,551
Dose 5	123	10,8984	6,7944	10,1075	11,6892

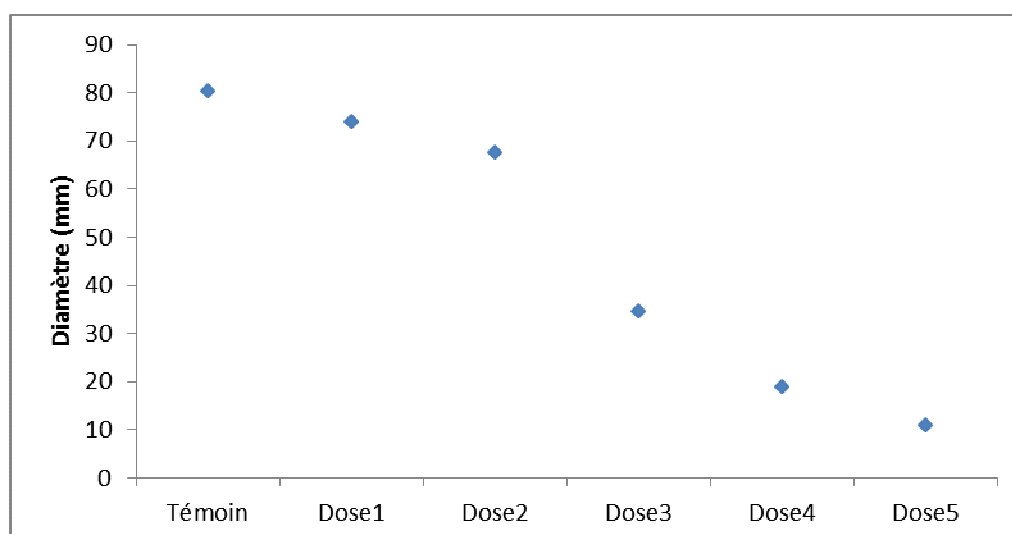


Figure I : Moyenne des diamètres des colonies en fonction des différentes doses

Annexe 10 : analyse des corrélations entre les différents paramètres étudiés

Tableau VIII : Les corrélations entre les différents paramètres étudiés.

	Croissance	Résistance	Virulence
Croissance	1		
Résistance	0,3316	1	
	P→0,0342		
Virulence	-0,1685	-0,1430	1
	P→0,2922	P→0,3725	

Des valeurs des probabilités (P) au-dessous de 0,05 indiquent des coefficients de corrélation significativement différents de 0 au niveau de confiance de 95,0%. La seule paire de variables qui a une valeur de probabilité au-dessous de 0,05 est : Croissance et Résistance ; Donc il existe une corrélation positive entre « croissance » et « résistance » mais relativement faible (seulement 0.3316).

Le graphique suivant présente la seule corrélation existante qui est entre « degré de résistance » et « croissance ».

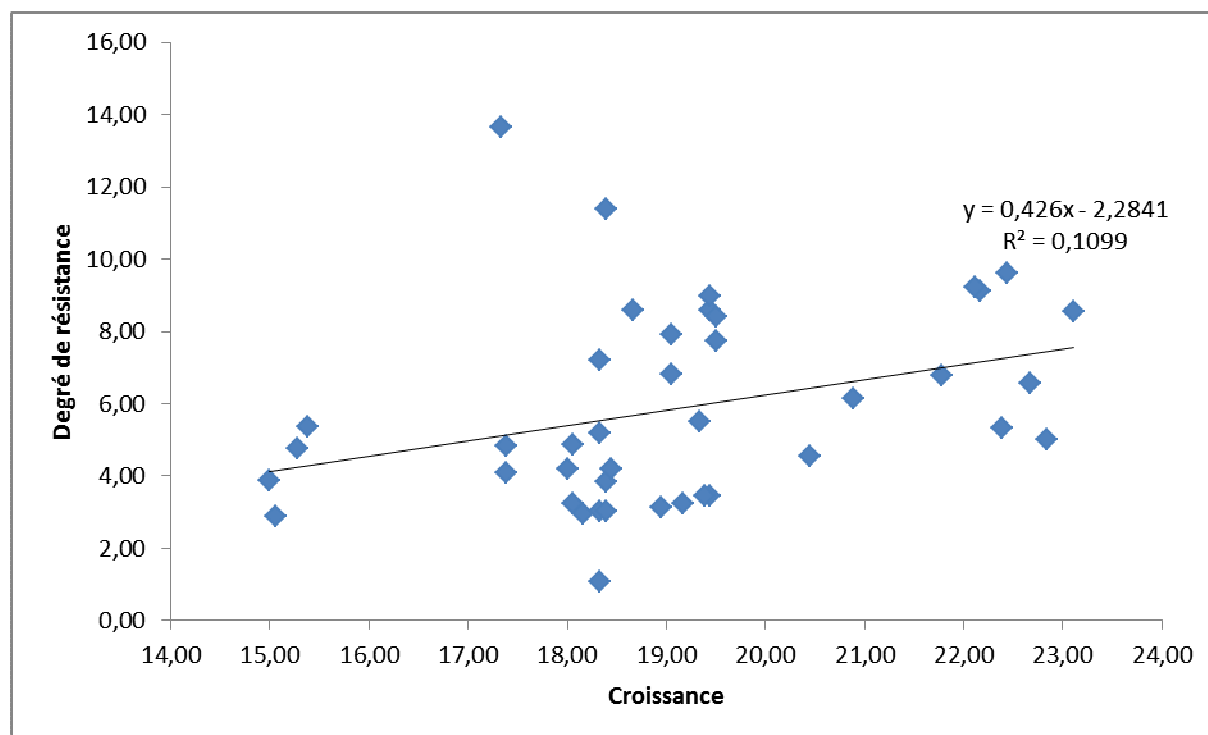


Figure b : Graphique de corrélation du degré de résistance avec la croissance mycélienne.

Résumé

Botrytis cinerea dont le téléomorphe est *Botryotinia fuckeliana* est un champignon des plus polyphages et ubiquistes, il est l'agent de la pourriture grise de la vigne et de centaines d'autres espèces végétales. Il provoque des pertes correspondant à 20% des récoltes mondiales des cultures sensibles et dont le coût a été estimé à plus de 100 milliards d'euros par an.

Botrytis cinerea est doté d'une importante variabilité génétique et phénotypique qui s'expriment notamment par sa morphologie sur milieu de culture, son agressivité et sa réponse aux fongicides.

La première partie de ce travail, qui constituait une caractérisation phénotypique de nos isolats a révélé une grande variabilité au sein de la collection. La description des morphotypes a permis de distinguer 36 individus du type sclérotiens alors que seulement 5 étaient du type mycélien. Le test de pathogénicité a montré une majorité d'isolats virulents (38/41) avec des degrés de virulences très variables (compris entre 0,25 et 3,75). Quant à la réponse de nos isolats au traitement par le Fenhexamide, elle était graduelle entre la sensibilité et la résistance, certains isolats (11/41) ont montré une sensibilité réduite (CI50 comprise entre 0,07 et 0,1) et 2 isolats/41 se sont montrés résistants avec des degrés de résistance de 11,4 (BCV07) et 13,6 (BCV29). Ces isolats seraient probablement du phénotype Hydr3 modéré. Mais aucun isolat fortement résistant au Fenhexamide n'a été retrouvé.

La seconde partie est une caractérisation génétique de la collection par la détection des éléments transposables par PCR. Celle-ci a révélé la présence de 16 isolats du type *Boty* et de 25 isolats type *Vacuma*. Aucun isolat du type *Transposa* ou *Flipper* n'a été retrouvé.

Mots clés : *Botrytis cinerea* – Pourriture grise – Diversité génétique – diversité phénotypique – Vigne.

Summary

Botrytis cinerea whose teleomorph is *Botryotinia fuckeliana* is a fungus of the most ubiquitous and polyphagous. It is the agent of gray mold of vine and hundreds of other plant species. It causes losses equal to 20% of global crop susceptible cultures whose cost was estimated at over 100 billion euros a year.

Botrytis cinerea has a strong genetic and phenotypic variability as expressed in particular by its morphology on cultural media, its aggressiveness and its response to fungicides.

The first part of this work, which was a phenotypic characterization of our isolates revealed considerable variability in the collection. The description of morphotypes allowed to distinguish 36 isolates of sclerotial type, while only 5 isolates were mycelial type. The pathogenicity test showed a majority of virulent isolates (38/41) with virulence greatly varied (between 0.25 and 3.75). The response of our isolates to treatment with Fenhexamid was gradual between sensitivity and resistance, some isolates (11/41) showed reduced susceptibility (IC50 between 0.07 and 0.1) and 2 isolates / 41 were resistant with varying degrees of resistance 11.4 (BCV07) and 13.6 (BCV29). These isolates were likely of the phenotype moderate Hydr3. But no highly resistant isolate has been found.

The second part is a genetic characterization of the collection by the detection of transposable elements by PCR. This revealed the presence of 16 isolates *Boty* type and 25 isolates *Vacuma* type. No isolate *Transposa* type or *Flipper* type was found.

Key words : *Botrytis cinerea* – Grey mold - Genetic diversity - phenotypic diversity – Grapevine.

ملخص

يعتبر *Botrytis cinerea* فطر ممرض لعدة محاصيل في جميع أنحاء العالم، فهو عامل التعفن الرمادي لكروم العنب ومئات من الأنواع النباتية الأخرى. يتسبب في خسائر تعادل 20% من المحاصيل العالمية الحساسة المقدرة تكلفتها بـ 100 مليار يورو سنويا.

يتمتع *Botrytis cinerea* بتقلب جيني ومظهري كبير. تظهر هذه التقلبات في شكله فوق خليط الاستنبات، في خاصيته الممرضة وتجاوبه مع العلاج بالمبيدات الفطرية.

الجزء الأول من هذا العمل المتمثل في التوصيف المظهري من العزلات كشف تنوعا كبيرا في المجموعة. الوصف الشكلي ميز 36 فرد من النوع *Sclerotien* مقابل 5 فقط من النوع *Mycélien*.

أظهر اختبار الأمراض غالبة العزلات الخبيثة مع درجات خيثة متفاوتة (بين 0.25 و 3.75). أما بالنسبة لاستجابة العزلات للعلاج بـ *Fenhexmid* كانت تدريجية، بين الحساسية والمقاومة. فقد بينت بعض العزلات (41/11) انخفاض في الحساسية (CI50 بين 0.07 و 0.1)، عزلتين من أصل 41 كانت مقاومة مع درجات المقاومة المقدرة بـ 11.4 (BCV07) و 13.6 (BCV29). هذه العزلات قد تكون من النوع *HYDR3* المعتدل ولكن لم يتم العثور على أية عزلة ذات مقاومة عالية.

الجزء الثاني من هذا العمل المتمثل في توصيف وراثي للمجموعة عبر الكشف عن العنصر القابلة للنقل بواسطة *PCR*. كشف هذا عن وجود 16 عزلة من نوع *Boty*، و 25 عزلة من نوع *Vacuma*. لم يتم العثور على أي عزلة من النوع *Transposa* أو *Flipper*.

الكلمات المفتاح :

Botrytis cinerea – التعفن الرمادي – التنوع الجيني – التنوع المظهري – كروم العنب.