

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH-ALGER

Thèse de Doctorat

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD en Sciences
Agronomiques**

Option : Agroécosystèmes et stress biologiques

THEME :

**Etude des populations de *Botrytis cinerea* agent de la
pourriture grise et contribution à l'amélioration des méthodes
de lutte alternatives**

Préparée par : M. HAMMAD Massinissa

Soutenue le : 30/06/2022

Devant le jury :

Président :	M. BOUZNAD Z.	Professeur (ENSA).
Directrice de thèse :	M ^{me} . LOUANCHI M.	Professeure (ENSA).
Co-Directeur de thèse :	M. LEHAD A.	M.C.A (ENSA).
Examineurs :	M ^{me} . BOUREGHDA H.	Professeure (ENSA).
	M ^{me} . MESSGO-MOUMENE S.	M.C.A (Université de Blida1).
	M. ROUAG N.	Professeur (UFAS Sétif 1).

Année universitaire : 2021/2022

Hommage

Lundi 19/04/2021, une journée pas comme les autres, une journée si triste, j'apprends la nouvelle, mais quelle nouvelle, une lumière, une étoile, un pilier, une Grande femme s'éteint à un âge prématuré.

Ma directrice de thèse, Madame LOUANCHI Meriem, Professeure à l'école nationale supérieure agronomique (ENSA), nous a laissés très tôt, emportant avec elle un savoir-faire, une intelligence, une compétence, un amour de la nature, une agriculture des montagnes, un combat contre les OGM, une agriculture biologique, une banque de semences et tant d'autres projets.

Son décès brutal, inattendu m'a bouleversé, je garderai de vous Madame, vos conseils, vos orientations en tant que directrice de thèse, mais aussi en tant qu'une maman et une amie, j'ai beaucoup appris de vous à l'ENSA et à L'AREA-Ed.

J'eus le plaisir de travailler avec Madame LOUANCHI Meriem pendant presque 7 années, je l'ai eu comme Promotrice en Master et comme Directrice de thèse, mes remerciements s'adressent particulièrement pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, son dévouement, sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience et son soutien. J'ai toujours été impressionnée par sa clairvoyance, son implication, et sa mise en valeur de l'intelligence humaine.

Elle mettait en œuvre un véritable esprit de travail en commun, de collaboration, ouverte à toutes les perspectives scientifiques, qui communiquait son enthousiasme à ses étudiants.

Son dynamisme, son professionnalisme, son engagement, sa compétence resteront gravés éternellement dans l'âme de l'école nationale supérieure agronomique (ENSA) aussi bien qu'au cœur de chacun de nous.

J'adresse toutes mes condoléances à la famille de Madame LOUANCHI Meriem ainsi qu'à la communauté universitaire, que nos pensées accompagnent sa famille, ses amis et ses collègues.

*Vos derniers mots résonneront toujours dans ma tête, votre courage m'avait impressionné « **Massi, c'est très dur, mais ne t'inquiète pas, je vais m'en sortir, je vais combattre... je vous aime** ».*

*JE NE VOUS OUBLIERAI JAMAIS
Reposez en Paix Madame*



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le bon **Dieu**, le tout puissant qui m'a donné la force et le courage pour réaliser ce travail.

J'éprouve une profonde gratitude envers **M^{me} LOUANCHI M.**, Professeure à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail de thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour m'avoir guidé, aidé et avoir cru en moi. Je suis également reconnaissant pour tout le savoir qu'elle m'avait transmis.

Je voudrais vivement remercier **M. LEHAD A.**, Maître de Conférences à l'ENSA pour son assistance technique et scientifique lors de la préparation de cette thèse, et l'intérêt qu'il a porté à mon travail ainsi que pour ses précieuses et valeureuses remarques, qu'il trouve ici ma très grande considération.

Je tiens à remercier particulièrement **M. BOUZNAD Z.**, Professeur à l'ENSA pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon jury, qu'il trouve dans ce travail l'expression de mon respect et de mes sincères remerciements.

J'adresse également mes remerciements à :

M^{me} BOUREGHDA H., Professeure à l'ENSA de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury, qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

M. ROUAG N. Professeur à l'Université de UFAS Sétif 1 pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de participer au jury, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

M^{me}. MESSGO-MOUMENE S., Maître de Conférences à Université de Blida1 de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury, qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

M. GUILLEMETTE T., Professeur à l'Université d'Angers d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire pour un stage, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Ma sincère gratitude s'adresse à toute l'équipe du laboratoire **FungiSem** qui m'ont accueilli durant trois mois, ainsi l'ensemble du personnel pour leurs orientations techniques et scientifique lors de la réalisation de mes expérimentations tout au long de mon stage.

Je remercie particulièrement **M. TRAIKIA A. & M. ABDELKRIM H.**, enseignants à l'école nationale supérieure agronomique, pour leurs orientations précieuses, conseils et leurs soutiens.

Également je remercie tous les enseignants du département de Botanique pour leur aide et leurs conseils précieux. Ainsi que, tout le personnel du Laboratoire de Phytopathologie et biologie moléculaire de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

Que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de recherche, trouvent ici mes sincères reconnaissances et remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce travail...

A mes chers parents

Quoique je dise, quoique je fasse, je ne saurai pas traduire mon infinie reconnaissance pour ce que vous avez consenti pour mon instruction, mon bonheur et ma réussite. Merci que vous soyez patients avec moi, de m'encourager à chaque fois que j'aie envie d'abandonner. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et le fruit de vos innombrables sacrifices. Je vous aime profondément. Ssaramey-awen talwit, tumert akked Teyzi n tudert.

A mes adorables sœurs

A mes deux petites sœurs, Sara & Lydia, recevez ici mes remerciements les plus profonds d'être présentes à mes côtés tout au long de ce long chemin d'étude et pour vos encouragements, conseils et orientations. Ssaramey-awent afud igerrzen , teyzi n lemer d wayen akk ziden di Tudert.

A ma chère Imene

Je te remercie pour ton soutien moral et technique, pour ta patience, tes encouragements incessants et d'être présente pour moi dans les moments difficiles. Ssaramey-am akk ayen yelhan di Tudert.

A mes amis et collègues

Je vous remercie d'être là pour moi quand j'avais besoin de vous : Mimo, Dihia, Said, Hakim, Yacine & Imene, Juba, Nesma, Nawel, Lotfi, Yacine, Meriem A., Nesrine, Meriem Z., Fériel, Brahim, Chafik, Moh, Abdellah, Islam, Amine & à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Massi

Limer i sent y saḥseb ofellaḥ ur tent yezreε ara (Proverbe kabyle)

*Science sans conscience n'est que ruine de
l'âme (RABELAIS)*



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	I
LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VIII
LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS	X
1 Introduction.....	1
2 Données générales sur la pourriture grise.....	3
2.1 L'agent causal de la maladie, <i>Botrytis cinerea</i>	3
2.1.1 Position taxonomique	3
2.1.2 Description du pathogène.....	3
2.2 Symptomatologie	5
2.2.1 Sur vigne.....	5
2.2.2 Sur tomate.....	5
2.2.3 Sur fraisier	6
2.2.4 Sur courgette.....	6
2.2.5 Sur fève.....	6
2.3 Importance économique de la maladie.....	7
2.4 Gamme d'hôte.....	9
2.5 Cycle de développement de la pourriture grise.....	9
2.6 Epidémiologie et l'aérobiologie de <i>B. cinerea</i>	10
2.7 Facteurs influençant le développement du champignon	11
2.7.1 Facteurs climatiques (températures, lumières et humidité).....	11
2.7.2 Exigences nutritives	12
2.7.3 Etat physiologique de la plante.....	12
2.8 Diversité des populations de <i>Botrytis cinerea</i> :.....	13
2.8.1 Diversité phénotypique des populations de <i>B. cinerea</i>	13
2.8.2 Diversité génétique des populations de <i>B. cinerea</i>	16
2.9 Méthodes de contrôle de la maladie de la pourriture grise	18
2.9.1 Les mesures prophylactiques.....	18
2.9.2 Lutte chimique.....	19
2.9.3 Lutte biologique	23
3 Données générales sur le genre <i>Trichoderma</i>	26

3.1	Taxonomie	26
3.2	Description et morphologie du genre <i>Trichoderma</i>	27
3.2.1	La section <i>Trichoderma</i> décrite par Bissett 1991a	28
3.2.2	La section <i>Pachybasium</i> décrite par Bissett 1991a	28
3.2.3	La section <i>Hypocreanum</i> décrite par Bissett 1991a	28
3.2.4	La section <i>Longibrachiatum</i> décrite par Bissett (1984)	28
3.2.5	La section <i>Saturnisporum</i> décrite par Doi et <i>al.</i> (1987)	29
3.3	Identification moléculaire	31
3.4	Mécanisme d'action du genre <i>Trichoderma</i>	31
3.4.1	Compétition	31
3.4.2	Le mycoparasitisme	32
3.4.3	L'antibiose	33
3.4.4	Induction de la résistance chez les plantes	34
3.4.5	Stimulation de la croissance des plantes	35
3.5	La pathogénicité du genre <i>Trichoderma</i>	36
3.5.1	Pathogénicité sur les champignons cultivés (ex : <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>)	36
3.5.2	Pathogénicité sur l'Homme	37
3.6	Les espèces de <i>Trichoderma</i> utilisées contre <i>Botrytis cinerea</i>	37
4	Matériel et Méthodes	38
4.1	Matériel Biologique	38
4.1.1	Prospection et échantillonnage (<i>B. cinerea</i>)	38
4.1.2	Isolement de l'agent phytopathogène (<i>B. cinerea</i>)	39
4.1.3	<i>Trichoderma</i> spp.	39
4.1.4	Matériel végétal	40
4.1.5	Milieux de cultures utilisés	40
4.1.6	Purification et conservation des cultures fongiques	40
4.2	Etudes des isolats de <i>Botrytis cinerea</i>	41
4.2.1	Identification morphologique et culturale des isolats du genre <i>Botrytis</i>	41
4.2.2	La vitesse de la croissance mycélienne	42
4.2.3	Etude du pouvoir pathogène	43
4.2.4	Sensibilité au Fenhexamide	43
4.3	Etudes des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	45
4.3.1	Identification morphologique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	45
4.3.2	Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	45

4.3.3	Identification moléculaire des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	45
4.4	Etude <i>in vitro</i> de l'effet antagoniste de <i>Trichoderma</i> spp. vis-à-vis de <i>B. cinerea</i>	47
4.4.1	Confrontation directe.....	47
4.4.2	Confrontation indirecte.....	48
4.4.3	Etude de l'effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp. sur <i>Botrytis cinerea</i>	49
4.5	Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> sur la germination des graines et le développement des plantules de tomate	51
4.5.1	Etude de l'effet des suspensions de spores de <i>Trichoderma</i> spp.....	51
4.5.2	Etudes de l'effet des filtrats de culture des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	52
4.5.3	Etudes de l'effet des composés volatils (VOCs) des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	53
4.6	Analyses statistiques	54
4.7	Essai de biocontrôle <i>in vivo</i> sur plants de tomates (<i>in planta</i>).....	54
5	Résultats.....	58
5.1	Identification morphologique et culturale des colonies du <i>Botrytis</i>	58
5.1.1	Aspect des colonies	58
5.1.2	Forme et mensurations des conidies.....	59
5.1.3	Analyse des sclérotés.....	60
5.1.4	Détermination des morphotypes	61
5.1.5	Vitesse de la croissance mycélienne.....	63
5.1.6	Pouvoir pathogène des isolats de <i>B. cinerea</i>	65
5.1.7	Sensibilité au fenhexamide.....	68
5.2	Identification morphologique et culturale des colonies de <i>Trichoderma</i> spp.	72
5.3	Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	76
5.4	Identification moléculaire des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	78
5.4.1	Résultats de la PCR	78
5.4.2	Comparaison nucléotidique	81
5.4.3	Analyse phylogénétique	83
5.5	L'effet antagoniste de <i>Trichoderma</i> spp. vis-à-vis des isolats de <i>Botrytis cinerea</i>	86
5.5.1	Effet antagoniste <i>in vitro</i>	86
5.5.2	Filtrat de cultures.....	90
5.6	Effet des isolats de <i>Trichoderma</i> sur la germination des graines et plantules de tomate.....	91
5.6.1	Effet des suspensions de spore de <i>Trichoderma</i> spp.....	91
5.6.2	Effet des composés volatils des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	92
5.6.3	Effet des filtrats de culture des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	93
5.7	Essai de biocontrôle <i>in vivo</i> sur des plants entiers de tomates (<i>in planta</i>).....	95

6	Discussion	99
7	Conclusion générale.....	107
8	Références bibliographiques.....	110
9	Annexes	129

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Aspects et morphologie de <i>B. cinerea</i>	4
Fig. 2 : Symptomatologie de <i>Botrytis cinerea</i>	8
Fig. 3 : Cycle de développement de la pourriture grise causée par <i>B. cinerea</i> et les symptômes associés sur différentes plantes hôtes.....	10
Fig. 4 : Aspect microscopique des cinq sections décrites par Bissett 1991a	29
Fig. 5 : Aspect Macroscopique et microscopiques des colonies de <i>Trichoderma</i>	30
Fig. 6 : Mécanisme du mycoparasitisme des <i>Trichoderma</i> (Druzhinina et al., 2011).....	33
Fig. 7 : Induction de la résistance et stimulation de la croissance des plantes par <i>Trichoderma</i> spp.....	36
Fig. 8 : Symptômes typiques de la maladie due à <i>Botrytis cinerea</i>	38
Fig. 9 : Etude du pouvoir pathogène des isolats de <i>B. cinerea</i> sur des demi-pommes.	43
Fig. 10 : Schéma de la confrontation directe entre <i>Trichoderma</i> spp. et <i>B. cinerea in vitro</i> sur milieu PDA.	47
Fig. 11 : Test de la confrontation indirecte entre <i>Trichoderma</i> spp. et <i>Botrytis cinerea in vitro</i>	48
Fig. 12 : Préparation des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp.	50
Fig. 13 : Etude de l'effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp. sur <i>B. cinerea</i> en utilisant la technique de la néphélométrie.	51
Fig. 14 : Filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp. sur les semences de tomate.	52
Fig. 15 : Effet des composés volatils sur la germination des semences de tomate.....	53
Fig. 16 : Schéma de l'essai de biocontrôle de la maladie de la pourriture grise in situ.	55
Fig. 17 : Les types morphologiques (morphotypes) obtenus.	62
Fig. 18 : Répartition des isolats selon leurs types morphologiques	63
Fig. 19 : Pouvoir pathogène des isolats de <i>B. cinerea</i>	66
Fig. 20 : Diamètres moyens des lésions nécrotiques causés par les isolats de <i>B. cinerea</i> sur des demi-pommes.....	67
Fig. 21 : Effet des différentes doses de fenhexamide sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Botrytis cinerea</i>	69
Fig. 22 : Répartition de 73 isolats de <i>B. cinerea</i> en fonction des degrés de résistance.....	71
Fig. 23 : Aspect des colonies de <i>Trichoderma</i> spp. et la pigmentation sur le milieu de culture PDA.....	73
Fig. 24 : L'aspect des structures de fructification sous microscopie électronique à balayage et sous microscopie optique des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	74
Fig. 25 : L'effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Trichoderma</i>	78

Fig. 26 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (ITS1 et ITS4).	79
Fig. 27 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (EF1-728F et TEF1LLerev).	79
Fig. 28 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (fRPB2-5f et fRPB2-7cr)	80
Fig. 29 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (acl1-230up et acl1-1220low).	80
Fig. 30 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de <i>Trichoderma</i> spp. construit sur la base de l'analyse des séquences <i>tefl</i>	84
Fig. 31 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de <i>Trichoderma</i> spp. construit sur la base de l'analyse des séquences <i>rpb2</i>	85
Fig. 32 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de <i>Trichoderma</i> spp. construit sur la base de l'analyse des séquences <i>Acl1</i>	85
Fig. 33 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de <i>Trichoderma</i> spp. construit sur la base de l'analyse des séquences ITS.	86
Fig. 34 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois isolats de <i>B. cinerea</i> causée par quinze souches de <i>Trichoderma</i> spp. en confrontation directe.	87
Fig. 35 : Effets des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>B. cinerea</i> (BCFr11, BCT04 et BCV02) en confrontation directe <i>in vitro</i>	88
Fig. 36 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois isolats de <i>B. cinerea</i> causée par quinze souches de <i>Trichoderma</i> spp. en confrontation indirecte.	89
Fig. 37 : Effets des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>B. cinerea</i> (BCFr11, BCT04 et BCV02) en confrontation indirecte <i>in vitro</i>	90
Fig. 38 : Effet des filtrats de cultures de quinze isolats de <i>Trichoderma</i> spp sur la germination des spores et de croissance mycélienne des jeunes hyphes des isolats de <i>B. cinerea</i>	91
Fig. 39 : Effet des filtrats de culture des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur l'indice de vigueur des graines de tomates	95
Fig. 40 : Indice de sévérité de la maladie causée par l'isolat <i>B. cinerea</i> (BCT04) sur les plantes de la tomate (Variété de Kawa).	96
Fig. 41 : Résultat de l'effet du contrôle biologique des plants de tomate contre la maladie de la pourriture grise causée par <i>Botrytis cinerea</i> (BCT04).	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification morphologique de <i>Botrytis cinerea</i> sur milieu Malt-Agar.....	15
Tableau 2 : Caractéristiques du type sclérotien S5 identifié par Kuzmanovska et al., (2012)....	15
Tableau 3 : Marqueurs moléculaires utilisées pour l'identification de <i>B. cinerea</i>	18
Tableau 4 : Principales matières utilisées contre la moisissure grise	22
Tableau 5 : Les principaux extraits de plantes et microorganismes antagonistes utilisés pour la lutte contre la pourriture grise et leur mode d'action.....	25
Tableau 6 : Origine des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	39
Tableau 7 : Doses de fenhexamide utilisées pour l'étude de la sensibilité des isolats de <i>B. cinerea</i>	44
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées.....	46
Tableau 9 : Aspect des colonies des isolats de <i>Botrytis</i> sur milieu PDA.....	58
Tableau 10 : Formes et Intervalle des dimensions des conidies des isolats de <i>Botrytis</i> isolés à partir des cultures de fèves.....	60
Tableau 11 : Densité des sclérotés et premier jour de l'apparition du 1er sclérote des isolats du type Sclérotien.	60
Tableau 12 : Classification morphologique des isolats de <i>B. cinerea</i> et leurs vitesses de croissance mycélienne.	64
Tableau 13 : Les CI50 et degrés de résistance des isolats de <i>B. cinerea</i> étudiés.....	70
Tableau 14 : Les caractéristiques morphologiques des structures de fructification des isolats étudiés.	75
Tableau 15 : Origine, identification et code accession GenBank des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. étudiés.	82
Tableau 16 : Effet des suspensions de spore des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la germination et l'indice de vigueur des graines de tomates	92
Tableau 17 : Effet des composés volatils des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la germination et l'indice de vigueur des graines de tomates	93
Tableau 18 : Effet des filtrats de culture des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la germination et l'indice de vigueur des graines de tomates	94

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>acl1</i> :	Larger subunit of ATP citrate lyase ;
<i>act</i> :	Actine ;
ADN :	Acides désoxyribonucléique ;
AFLP :	Amplified Fragment Length Polymorphism ;
ARN :	Acide ribonucléique ;
ATP :	Adénosine triphosphate ;
<i>B.</i> :	<i>Botrytis</i> ;
Ben :	benzimidazoles ;
Ca²⁺ :	Calcium ;
<i>cal</i> :	Calmoduline ;
<i>chi18-5</i> :	Endochitinase ;
CI50 :	Concentration inhibitrice médiane ;
DSI :	Indice de sévérité de la maladie ;
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique ;
ET :	Eléments transposables ;
Ex. :	Exemple ;
Fig. :	Figure ;
G% :	Pourcentage de Germination ;
HR :	Hautement Résistant ;
HR :	Réponse hypersensible ;
ICN :	International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants ;
ISR :	Résistance systémique induite ;
ISTH :	International Subcommittee on <i>Trichoderma</i> et <i>Hypocrea</i> Taxonomy ;
ITS :	Internal Transcribed Spacer ;
IV :	Indice de vigueur ;
K :	Potassium ;
Kb :	Kilo base ;
LR :	légèrement résistant ;
Mg²⁺ :	Magnésium ;
Milieu MS :	Milieu de Murashige et Skoog ;
MR :	Moyennement résistant ;
NCBI :	National Center for Biotechnology Information
NPC :	N-phényl-carbamates ;
P :	test de normalité de Shapiro – Wilks ;
PA :	Proanthocyanines ;
Pb :	Paire de base ;
PCR :	Polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérisation) ;
PDA :	Potato Dextrose Agar ;
PDB :	Potato Dextrose Broth ;
PG :	Polygalacturonases ;
PR :	Protéines liées à la pathogénèse ;
R :	Résistant ;
rADN :	ADN ribosomique ;

RAPD :	Random amplified polymorphic DNA ;
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism ;
<i>rpb2</i> :	RNA polymerase II subunit ;
S :	Sensible ;
SA :	Acide salicylique ;
SAR :	Résistance systémique acquise ;
SDS :	Sodium dodecyl sulfate ;
SE :	Ecart Type ;
SNA :	Special Nutrient Agar ;
Sp. :	Species ;
Spp. :	Species plurimae ;
SSR :	Les marqueurs microsatellites ;
<i>T.</i> :	<i>Trichoderma</i> ;
TC :	Traitement curatif ;
<i>tef1</i> :	Translation elongation factor $\alpha 1$;
TP :	Traitement Préventif ;
Tris-HCl :	Trisaminométhane Hydrochloride
UV :	Ultraviolet ;
V :	Volume ;
VOCs :	Composés organiques volatils.

LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

➤ **Publication internationale :**

1. **HAMMAD, M., GUILLEMETTE, T., ALEM, M., BASTIDE, F., & LOUANCHI, M., 2021.** First report of three species of *Trichoderma* isolated from the rhizosphere in Algeria and the high antagonistic effect of *Trichoderma brevicompactum* to control grey mould disease of tomato. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31(1), 1-11.

➤ **Communications internationales :**

1. **HAMMAD M., ALEM-ETSOURI M., TRAIKIA A. BOUREGHDA H. et LOUANCHI M., 2017.** Etude de l'effet antagoniste d'isolats de *Trichoderma* spp. sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise. CIBSDD - Boumerdes- Algérie.
2. **HAMMAD M., ALEM-ETSOURI M., BASTIDE F., GUILLEMETTE T., BOUREGHDA H. & LOUANCHI M. 2019.** Effect of *Trichoderma* spp. and its culture filtrate against *Botrytis cinerea* causal agent of gray mold. In RECUEIL DES RESUMES du Congrès International sur la Valorisation des Bio ressources : Application et Impact sur le Développement Durable (CIVBAIDD). 26-27 novembre 2019, Boumerdes, Algérie. P156.

➤ **Communications nationales :**

1. **HAMMAD M., ALEM-ETSOURI M., TRAIKIA A. BOUREGHDA H. et LOUANCHI M., 2016.** Etude de l'effet antagoniste *in vitro* de *Trichoderma atroviride* et *T. longibrachiatum* vis-à-vis de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la vigne. In : Recueil des résumés des 2e Journées de biologie des systèmes microbiens. Organisé par le laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens, 26-27 novembre 2016, ENSTP, Kouba, Alger, Algérie. P 59.
2. **HAMMAD M., ALEM-ETSOURI M., BOUREGHDA H. et LOUANCHI M., 2019.** Etude de l'effet des filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp. sur *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise. Recueil des résumés du Second National Symposium : plant Protection in Arid Regions. 12 novembre, Université de Biskra, Algérie. P 61.

➤ **Journées d'études ENSA :**

1. **HAMMAD M., GANA N., ALEM-ETSOURI M., BOUREGHDA H., TRAIKIA A. et LOUANCHI M., 2017.** Caractérisation morphologique d'isolats de *Trichoderma* spp. et étude de leur effet antagoniste *In vitro* vis-à-vis de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise. In : Recueil des résumés des Journées scientifiques de Youm El Ilm, 17-18 mai 2017, ENSA El Harrach, Alger, Algérie.
2. **HAMMAD M., ALEM M. et LOUANCHI M., 2017.** Variabilité phénotypique des isolats de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise : Morphotypes et pouvoir pathogène. In : Recueil des résumés des Premières Journées scientifiques de Phytopathologie et Biologie Moléculaire. LPBM 2017, 19 décembre 2017, ENSA, Alger. (Communication) pp 21.

Introduction

1 Introduction

Botrytis cinerea Pers est un ascomycète nécrotrophe et polyphage, responsable de la pourriture grise sur plus de 1400 espèces de plantes dicotylédones et monocotylédones, réparti dans 586 genres de plantes (Elad et al., 2016a). Ce pathogène est capable d'attaquer toutes les parties de la plante, les graines et autres matériels de plantation, les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits aux stades pré-récolte et poste-récolte. Il se montre plus destructeur sur les tissus matures ou sénescents. De graves dommages peuvent survenir aussi après la récolte de cultures d'apparence saine (Williamson et al., 2007).

Selon Dean et al. (2012) *B. cinerea* est classé au deuxième rang dans la liste des 10 principaux agents pathogènes fongiques des plantes. Ceci peut s'expliquer par un certain nombre de facteurs décrit par Williamson et al. (2007) : une gamme d'hôtes exceptionnellement large, la nature épidémiologique de *Botrytis* et l'étendue des pertes de récoltes qu'il provoque, avant et après récolte ; la capacité de *B. cinerea* à provoquer des infections au repos ; l'adaptation remarquable de *B. cinerea* à diverses conditions climatiques ; sa plasticité génétique, y compris l'adaptation aux fongicides ; le manque de facteurs de résistance chez l'hôte et son mode de vie flexible du saprophyte au pathogène.

La complexité et les difficultés associées au contrôle chimique de la pourriture grise, en raison de sa large variabilité génétique et de ses capacités élevées d'adaptation aux fongicides. Une résistance acquise a été observée avec tous les fongicides utilisés contre la moisissure grise, le classant ainsi comme un agent phytopathogène à haut risque (De Miccolis Angelini et al., 2016). Le cout mondial pour le contrôle de *B. cinerea* est estimé environ 1,5 milliard USD par an (Dean et al., 2012). Ceci a incité les chercheurs à développer les moyens de lutttes biologiques, tels que, les agents de contrôle biologiques, les extraits de plantes, les minéraux et les composés organiques (Nicot et al., 2011).

Cependant, les espèces du genre *Trichoderma* Pers. ont attiré une attention particulière des chercheurs et des industries depuis plusieurs décennies. Environ 60 % des bio-fongicides homologués à base de champignon filamenteux ont été développés à partir de souches de *Trichoderma* (Verma et al., 2007). Plusieurs anti-*Botrytis* commercialisés ont été formulés à base d'isolats de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. polysporum* et *T. viride* pour lutter contre *B. cinerea*, tels que, le Sentinel® formulé à base de la souche LC52 de *T. atroviride* et Trichodex® basé sur *T. harzianum* (Elmer et Reglinski, 2006 ; Nicot et al., 2016).

Le genre *Trichoderma* est un agent de lutte biologique intéressant, présentant une capacité antagoniste très élevée contre un large éventail d'agent phytopathogène (Galarza et al., 2015 ; De Medeiros et al., 2017). Et ceci par divers mécanismes d'action, le parasitisme, la compétition

sur les éléments nutritifs, la synthèse des antibiotiques (Harman et *al.*, 2004, Hermosa et *al.*, 2012 ; Ruocco et *al.*, 2015 ; Rubio et *al.*, 2017). Bien que, les espèces du genre *Trichoderma* s'avèrent être potentiellement efficaces dans la lutte contre *B. cinerea*, seule une petite proportion a été exploitée comme agent de lutte biologique contre *B. cinerea*, tels que : *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride* (Verma et *al.*, 2007). Cependant, l'évaluation de l'efficacité d'autre espèces / isolats dans des tests de biocontrôle peut s'avérer utiles, en particulier les espèces / isolats rhizosphériques.

Les principaux objectifs de la présente étude sont :

- a) Etude phénotypique (morphotypes) et pathologique et la résistance au fongicide fenhexamide d'une population de *Botrytis cinerea* isolée à partir des plants de vigne, de tomate, de fraisier, de courgette et de fève ;
- b) Isolement, purification et identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* rhizosphérique, obtenus à partir de la rhizosphère du fraisier, vigne tomate et d'un bio-composte commercialisé en Algérie ;
- c) Evaluation de l'activité antagoniste par les différents modes d'actions des isolats de *Trichoderma* spp. en lutte biologique contre 03 isolats les plus virulents de *B. cinerea* ;
- d) Etude de l'effet des suspensions de spores et des métabolites secondaires solubles et volatils des isolats de *Trichoderma* spp. sur la germination des semences de tomate et l'indice de vigueur des jeunes plantules ;
- e) Evaluation de l'effet de trois isolats de *Trichoderma* spp. en lutte biologique contre la pourriture grise sur des plants entiers de tomates âgés de 28 jours en pot.

*Analyse
bibliographique*

2 *Données générales sur la pourriture grise*

La pourriture grise, dont le nom est dû à Ravaz (1895), est une maladie très ancienne et très redoutable en agriculture, elle est causée par *Botrytis cinerea* qui est un champignon ubiquiste, polyphage, capable d'attaquer plus de 1400 espèces dicotylédones et monocotylédones (Elad et al., 2016a). Selon Dean et al. (2012) *B. cinerea* est classé au deuxième rang dans la liste des 10 principaux agents pathogènes fongiques des plantes, ceci est dû à son importance économique.

2.1 L'agent causal de la maladie, *Botrytis cinerea*

2.1.1 Position taxonomique

Le pléomorphisme rencontré chez un nombre important d'ascomycètes phytopathogènes, tels que les différentes formes morphologiques et les différents stades sexués a fait que *Botrytis cinerea* Pers et beaucoup d'autres champignons ont connu un double système de nomenclature fongique proposé en 1905, il recommande des noms différents pour les formes asexués et sexués des champignons. En ce sens, *Botrytis cinerea* est le nom du stade asexué (anamorphe) et *Botryotinia fuckeliana* est celui du stade sexué (téléomorphe) (Faretra et al., 1988).

- ***Botryotinia fuckeliana*** (de Bary) Whetzel (téléomorphe), c'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae. Cette forme parfaite est rarement observée dans le milieu naturel mais peut être obtenue au laboratoire (**Fig. 1, C**) (Faretra et al., 1988).

- ***Botrytis cinerea* Pers.** (anamorphe) c'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae. C'est la forme asexuée qui est prédominante et associée à la pourriture grise (Faretra et al., 1988).

Cependant, les comparaisons des données de séquences d'ADN ont permis de relier de manière fiable les états asexués des champignons à leurs états sexués. Sur la base de ces résultats, les mycologues ont lancé en 2011 l'initiative qui porte le nom de « un champignon, un nom » afin de simplifier la taxonomie et la nomenclature des champignons. Ainsi, la communauté *Botrytis* a accepté en 2013 lors du *Botrytis*-Symposium à Bari d'utiliser *Botrytis* comme nom générique pour toutes les autres espèces du même genre (Elad et al., 2016b).

2.1.2 Description du pathogène

Le mycélium de *B. cinerea* est brun olivâtre, régulièrement cloisonné, et en forme de ruban de 11 à 23 µm de diamètre (Dubos et al., 1999). Lors de la fructification, le mycélium produit des

touffes de conidiophores grisâtres (1-3 mm de longueur) qui se divisent en plusieurs branches et se terminent par une cellule apicale élargie portant des bouquets de conidies insérées sur un courts stigmate (**Fig. 1, A**). Les conidies (10-12 x 8-10 µm) sont ovoïdes à ellipsoïdales ou globuleuses, lisses, unicellulaires, légèrement colorées en gris cendré (**Fig. 1, B**) (Viret *et al.*, 2010).

Lorsque les conditions climatiques sont défavorables au développement du mycélium et des conidies, des sclérotes se forment (**Fig. 1, D-F**). Ils sont constitués par du mycélium attaché blanchâtre, ils durcissent avec l'âge et deviennent noir. Ils sont composés d'un cortex de cellules épaisses formant une mince barrière de cellules pseudo-parenchymateuses et d'une large medulla centrale composée d'hyphe filamenteux (Coley-Smith, 1980). Ces sclérotes peuvent être à l'origine de la formation d'apothécies (Coley-Smith, 1971).



Fig. 1: Aspects et morphologie de *B. cinerea*.

A : Conidiophores sous microscope électronique à balayage, **B :** Conidies observées à l'aide d'une microscopie électronique à balayage (Ajouz, 2009). **C :** Apothécies de *Botryotinia fuckeliana*, téléomorphe de *Botrytis cinerea* (Dean *et al.*, 2012). **D :** Sclérotes de *B. cinerea* sur milieu PDA (type sclérotien). **E :** Aspect de *B. cinerea* sur milieu PDA (type mycélien) **F :** Sclérotes de *B. cinerea* sur sarment de vigne (Walker, 2013). **G :** aspect du conidiophore et conidie sous loupe binoculaire (http://www.canna.ca/fr-ca/botrytis_cinerea).

2.2 Symptomatologie

2.2.1 Sur vigne

La pourriture grise, est l'un des principaux problèmes pathologiques de la vigne, elle peut altérer complètement la récolte à quelques semaines des vendanges (Viret et *al.*, 2004), les attaques sont très sévères sur les différents organes de la vigne (Sbaghi, 2011). Quand les conditions sont favorables, des fructifications du champignon recouvrent les jeunes rameaux et causent leur dessèchement. On observe aussi, au bord du limbe et des nervures des taches brun-rougeâtre (Sbaghi, 2011) (**Fig. 2 : H, J, K**).

Les baies malades s'agglutinent et forment un amas grisâtre compact jusqu'à l'envahissement de toute la grappe et ils se dessèchent, et si aucune mesure préventive n'est prise, toute la récolte peut être compromise (Sbaghi, 2011). Par contre, dans certaines conditions climatiques, la pourriture noble se manifeste en période de surmaturation et elle est recherchée pour l'élaboration de vins liquoreux (Reynier, 2007).

2.2.2 Sur tomate

B. cinerea est observé sur tomate dans pratiquement toutes les zones de productions dans le monde, où il peut être à l'origine de dégâts très importants. Il est capable d'infecter la tomate à n'importe quel stade de son développement ainsi qu'en période de stockage (Blancard et *al.*, 2009).

B. cinerea peut sévir en pépinière, entraînant des manques à la levée ou des fontes de semis. Les folioles présentent fréquemment des taches plutôt circulaires et humides dans un premier temps entraînant un dessèchement du limbe. Ces altérations peuvent donner lieu à une pourriture qui s'étend ensuite et finit par léser des feuilles entières (Blancard et *al.*, 2009) (**Fig. 2, A**).

Lorsque les tiges et les pétioles sont envahis, le champignon forme un chancre sec, brun pâle qui s'étale et entoure la structure, provoquant ainsi le flétrissement et la mort des parties du plant situées au-dessus du chancre (Blancard et *al.*, 2009) (**Fig. 2, D**).

Les fruits verts, rarement les tomates matures, présentent de minces anneaux blanchâtres, de 2 à 10 mm de diamètre, encerclant une minuscule lésion nécrotique centrale. Ces anneaux, dénommés « taches fantômes » ou « *ghost spots* » en anglais, sont plutôt jaunâtres sur les fruits mûrs. Les lésions sont plutôt circulaires et blanchâtres, brunes pâles à grises : bien souvent, les tissus finissent par s'effondrer et le fruit se momifie (Blancard et *al.*, 2009) (**Fig. 2, F**).

2.2.3 Sur fraisier

La moisissure grise sur fraisier résulte généralement de deux types d'infections : Dans les infections primaires, *B. cinerea* infecte les organes floraux pendant ou juste après la floraison, permettant aux hyphes de se développer dans le réceptacle et les infections secondaires par pénétration directe dans les tissus du réceptacle des fruits (Bristow et *al.*, 1986).

Chez le Fraisier, *B. cinerea* attaque essentiellement les parties aériennes : pédicelles, fleurs et fruits mûres. Cependant, les attaques sur des fruits immatures entraînent généralement des dommages limités et des infections endophytiques asymptomatiques. Lorsque les conditions deviennent favorables, c'est-à-dire, la maturation des fruits ou la senescence des autres organes, la phase nécrotrophique commence et provoque une décomposition rapide du tissu infectés (Elad et *al.*, 2007), entraînant la formation d'une couche uniforme d'un duvet gris qui abrite les spores du champignon. Toutefois, ce pathogène entraîne des pertes considérables à la récolte et au cours de l'entreposage (Washington, 1992 ; Legard, 2001) (**Fig. 2, G**).

2.2.4 Sur courgette

La pourriture grise est présente pratiquement sur tous les organes aériens de la courgette. Les symptômes sur les feuilles se manifestent le plus souvent en taches circulaires, humides, s'initiant généralement en bordure du limbe et se nécrosent progressivement. Elles peuvent présenter des zonations concentriques et être auréolées d'un halo chlorotique (Blancard, 2013).

Des chancres humides peuvent parfois ceinturer progressivement la tige, s'initiant le plus souvent à partir des plaies d'effeuillage ou de cueillette ou à partir de tissus sénescents. Pour les fruits, les ouvertures naturelles peuvent être colonisées par *B. cinerea*. Notamment, au niveau de la cicatrice stylaire où les pétales fanés restent attachés. Ainsi, une pourriture humide, sombre se développe à l'extrémité des fruits (Blancard, 2013) (**Fig. 2 : I, K**).

2.2.5 Sur fève

La pourriture grise sur fève, appelée aussi la maladie des taches chocolat « Chocolate spot », elle est causée par *B. cinerea* et *B. fabae*, la maladie peut être présente sur toute la partie aérienne de la plante. Cependant, les dommages causés par *B. fabae* sont plus grave, c'est-à-dire, la production de lésions étendues. Contrairement aux attaques de *B. cinerea*, qui se manifestent par la production de lésions réduites, faisant référence à une résistance de *Vicia faba* L. vis-à-vis de *B. cinerea* (Hargreaves et *al.*, 1977).

Lorsque les conditions climatiques deviennent favorables, les tâches deviennent nécrotiques sur les organes infectés et plus larges avec des diamètres qui peuvent atteindre 10 à 15 mm. Cette phase est dite la phase agressive de l'infection (Maufras, 1985).

Sur tiges, l'apparition des symptômes commence par la formation de stries longitudinales de couleur chocolat qui évoluent en nécrose brunâtres ressemblant à celles des feuilles. Sur gousse la maladie se manifeste par l'apparition de plusieurs petites taches ponctiformes, suivie d'une pourriture brune qui aboutit à un dessèchement partiel voir total (Maufras, 1985).

Les premiers symptômes apparaissent de l'hiver au printemps, le champignon cause sur les feuilles âgées (celles du bas de la tige) plusieurs petites taches punctiformes de 1 à 2 mm de diamètre et de couleurs brun-rougeâtre, qui évoluent rapidement en taches circulaire de couleur marron et de 3 à 5 mm de diamètre, disposées sur les deux faces de la feuille. Cette infection est dite « non agressive » c'est-à-dire, elle se manifeste en conditions climatiques défavorables (Maufras, 1985) (**Fig. 2, M**).

2.3 Importance économique de la maladie

Botrytis cinerea est plus destructeur sur les tissus matures ou sénescents des hôtes. Ce champignon peut provoquer une infestation depuis le stade semis jusqu'à la maturation du produit. De graves dommages peuvent survenir même après la récolte des cultures d'apparence saine. Il reste parfois au repos pendant un temps considérable avant de causer la pourriture des tissus (Williamson et al., 2007).

Par ailleurs, les pertes économiques dues à *B. cinerea* sont très difficiles à estimer en raison de sa large gamme d'hôtes. Les coûts sont diffus car les dommages causés par *Botrytis* se produisent à différents stades de la chaîne de production et de la chaîne de vente. Aucun chiffre fiable n'est disponible pour les dommages causés par *Botrytis* pendant la culture. Le coût moyen de la lutte chimique contre *Botrytis* (toutes cultures, tous pays) est d'environ 40 € / ha. Les fongicides spécifiquement ciblés contre les *Botrytis* « Botryticides » ont coûté 540 millions d'euros en 2001, représentant 10 % du marché mondial des fongicides (Steiger, 2007).

Le segment des vins et raisins de table représente 50 % de la valeur du marché total des botryticides. Les solanacées, les cucurbitacées, les fraises et les plantes ornementales représentant chacune 5 % à 9 % (Steiger, 2007). Les coûts des fongicides à large spectre également efficaces contre *B. cinerea* sont inconnus. La résistance aux fongicides est un phénomène de plus en plus problématique, chez les *Botrytis* une proportion importante de la population fongique a montré une résistance accrue aux fongicides « botryticides » (Leroch et al., 2011).



Fig. 2 : Symptomatologie de *Botrytis cinerea*.

A : Chancre sec sur tige et collet. **B :** Attaque sur une inflorescence de tomate. **C :** Nécrose sur feuille de tomate. **D :** Attaque sur une plaie d'ébourgeonnage. **E :** Infection sur fruit de tomate. **F :** Taches fantômes sur tomate (Blancard et *al.*, 2009). **G :** Attaque sur fruit de fraise (Iñaki, 2015). **H :** Sclérotés de *B. cinerea* sur les sarments de vigne en hiver. **I :** attaque sur courgette (Blancard, 2013). **J :** nécrose sur feuille de vigne. **K :** pourriture sur fruit de courgette (Blancard, 2013). **L :** Mycélium sporulant sur grappe de raisin. **M :** taches chocolat sur fève. **N :** pourriture de la pomme (Giraud, 2020). **O :** Mycélium sporulant sur fleurs de rosier. **P :** pourriture grise sur courge (Blancard, 2013).

Au total, les dépenses globales de la lutte contre *Botrytis* (mesures culturales, botryticides, fongicides à large spectre, biocontrôle) dépassent facilement 1 milliard d'euros / an. Les impacts de la perte de produits survenant malgré la lutte contre la maladie et la perte de qualité au cours de la chaîne de vente sont probablement beaucoup plus élevés (Dean et *al.*, 2012).

2.4 Gamme d'hôte

Botrytis cinerea est un champignon polyphage capable d'attaquer toutes les parties de la plante, les graines et autres matériels de plantation, les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits aux stades pré-récolte et post-récolte. Le nombre d'espèce hôtes de *B. cinerea* passe de plus de 200 plantes en 1977 (Jarvis, 1977) à plus de **1400** espèces de plantes (Elad et al., 2016a). Environ 596 genres de plantes sont connus pour être affectés par *Botrytis* spp. dont **586** genres sont affectés par *B. cinerea*. La majorité de ces plantes appartient à la division des plantes à graines (Spermatophytes), 15 appartiennent à la division des plantes sans fleurs (Cryptogames) et un seul à la division des plantes vasculaires porteuses de spores (Ptéridophytes) (Elad et al., 2016a).

Les plantes hôtes de *Botrytis* spp. comprennent des espèces qui poussent dans une variété de régions climatiques des zones tropicales et subtropicales aux zones tempérées froides, dans les endroits humides aussi bien que secs, dans les champs ouverts, sous serres, et même les régions où les plantes sont cultivées par temps extrêmement froid ou extrêmement chaud (désert). Par contre, La majorité des signalisations de la maladie proviennent d'hôtes économiques, cultivés dans des zones tempérées fraîches et tempérées chaudes (Elad et al., 2016a).

2.5 Cycle de développement de la pourriture grise

B. cinerea produit de nombreuses conidies asexuées (macroconidies) portées à l'extrémité des conidiophores ramifiés. En général, la durée de vie des conidies est courte, elle dépend essentiellement de la température, de l'exposition au soleil, de l'humidité et de l'activité microbienne environnante (Blanco et al., 2006 ; Carisse et al., 2012 ; Nassr et Bakarati, 2013). Les conidies jouent un rôle important dans la dissémination du champignon, elles sont produites dès le printemps dans le cas de culture en plein champ. En revanche, elles peuvent être produites de façon continue, selon les conditions climatiques, dans le cas de cultures sous abris. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz et al., 2004) (**Fig. 3**).

A l'hivernage, *B. cinerea* produit des structures mélanisées, des sclérotés, qui résistent aux conditions environnementales défavorables (Holz et al., 2004). *B. cinerea*, produit des sclérotés assez gros (~ 4 mm). Dans des conditions favorables, telles que les périodes humides du printemps, les sclérotés germent pour produire du mycélium, des conidies et ils peuvent également être à l'origine de la formation des apothécies (Coley-Smith et Cooke, 1971). Alors les sclérotés sont probablement à l'origine d'infections précoces au début de la saison de croissance (Hsiang et Chastagner, 1992).

B. cinerea peut également produire des structures de résistances temporaires appelées chlamydospores qui ont des parois épaissies et hyalines. Ces structures peuvent résister à des périodes de sécheresse pouvant aller jusqu'à 3 mois (Urbasch, 1983). On les trouve souvent dans les cultures vieillissantes au sein des hyphes ou aux extrémités des hyphes. Dans des conditions favorables, ils germent pour produire des hyphes ou des microconidies.

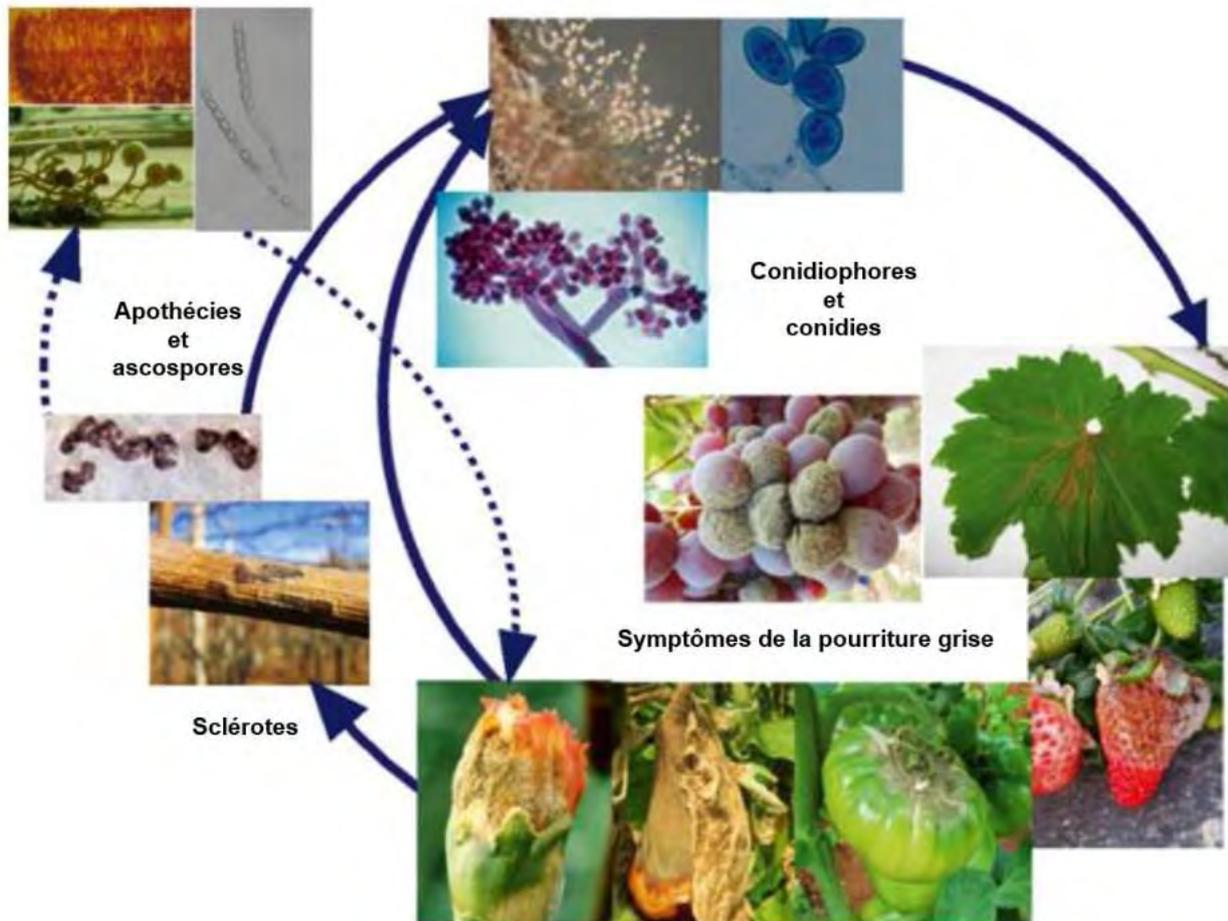


Fig. 3 : Cycle de développement de la pourriture grise causée par *B. cinerea* et les symptômes associés sur différentes plantes hôtes (Angelini et al., 2016).

2.6 Epidémiologie et l'aérobiologie de *B. cinerea*

Une attention particulière est accordée à l'aérobiologie et l'épidémiologie de *Botrytis cinerea*. Ceci est dû à sa production abondante et asexuelle de conidies, qui seront par la suite dispersées dans l'air (Carisse et al., 2016).

Selon les études de Spotts et Holz en 1996, les conidies de *B. cinerea* collent plus fortement lorsqu'elles sont appliquées en suspension dans l'eau ou sur la surface humide d'une baie de

raisin que lorsqu'elles sont sèches et sont appliquées sur une surface sèche. Les résultats de ces études suggèrent que les types d'inoculum (humides ou secs) influencent non seulement la germination et la croissance des conidies à la surface des plantes, mais également le développement des symptômes qui en résulte. Sur les baies de raisin, une période d'humidité de 14 h était nécessaire pour une incidence de 63 % de la maladie à 23 ° C, tandis que les conidies sèches ne produisaient aucun symptôme sur les baies même après 96 h (Coertze et Holz, 1999 ; Coertze et *al.*, 2001).

La compréhension approfondie de l'épidémiologie et de l'aérobiologie de *B. cinerea* est essentielle pour la conception de stratégies de gestion rationnelle. L'épidémie de ce champignon implique une série d'événements, commençant par la production et la dispersion de l'inoculum initial, suivie par l'infection primaire et par la production et la dispersion de l'inoculum secondaire, et elle se termine par la production de structures de survies (de résistances). Chaque phase de ce processus est fortement impactée par la nature de l'hôte et les conditions climatiques environnantes. La survie de *B. cinerea* entre les saisons de culture, la production et la dispersion des conidies vers les plantes non infectées sont des étapes clés du cycle de la maladie, cependant, si l'une ou l'autre phase est empêchée, la maladie sera retardée ou complètement arrêtée (Carisse et *al.*, 2016).

2.7 Facteurs influençant le développement du champignon

Les facteurs climatiques, en particulier l'hygrométrie et la température, ont un rôle important sur le développement de la maladie en favorisant la germination des conidies, la formation d'appressoria et l'élongation de tube germinatif. *Botrytis cinerea* est aussi un pathogène de blessures, toutes les opérations qui provoquent l'affaiblissement de la plante peuvent favoriser les attaques et le développement du champignon. Cependant, la phase agressive du pathogène est généralement précédée par une phase de repos asymptomatique. Les différents types de repos chez *B. cinerea* ont été décrits comme suit : (i) retard de la germination conidienne, arrêt de croissance après la germination (Jarvis, 1992) ; (ii) croissance endophytique asymptomatique dans l'apoplaste (Sowley et *al.*, 2010) ; (iii) colonisation des abcès des organes floraux (par exemple, pétales) suivis d'une croissance en ovaires ou réceptacles où la croissance s'arrête (Bristow et *al.*, 1986) ; (iv) Indépendamment du type d'infection, l'agent pathogène généralement rentre dans une courte phase biotrophe asymptomatique au début du cycle de la maladie (Veloso et Van Kan, 2018).

2.7.1 Facteurs climatiques (températures, lumières et humidité).

Les conditions environnementales, en particulier l'humidité relative et la température, jouent un rôle clef pour l'infection de la plante par *B. cinerea* et le développement de la maladie. Shiraishi

et al. (1970a), ont détaillé l'effet de la température sur la germination des conidies, la formation d'appressoria et l'élongation de tube germinatif. D'après cette étude la température optimale pour la germination des conidies se situe entre 20 et 30 °C. Cependant les températures Inférieures à 5 °C et supérieures à 35 °C ont inhibé complètement la germination des conidies après 48 h d'incubation. La température optimale pour l'élongation du tube germinatif est d'environ 25 °C. Concernant la production des appressoria est généralement assuré à des températures qui se situe entre 10 et 30 °C, avec une température optimale de 15 à 20 °C (Davidson et Krysinska-Kaczmarek, 2007).

L'humidité relative joue aussi un rôle important dans la germination des conidies, à 90 % d'humidité, seulement 85 % des conidies germent à 20 °C, et la germination est complètement arrêtée lorsque les conditions d'humidité relative et de température sont plus faibles (Jarvis, 1977). En revanche, la germination des conidies de *B. cinerea* se produit aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité (Nicot *et al.*, 1996). Par contre, La sporulation de *B. cinerea* dépend de la qualité de la lumière reçue notamment les UV (West *et al.*, 2000).

2.7.2 Exigences nutritives

Les conidies de *B. cinerea* possèdent peu de réserves énergétiques endogènes. La présence de source de nutriments exogènes est primordiale pour le développement de ce pathogène (Yoder & Whalen, 1975). La présence à la fois de carbone et d'azote tels que le glucose et le fructose favorise la germination et l'élongation du filament germinatif (Clark et Lorbeer, 1977) et permettent à des conidies âgées de retrouver leur pouvoir germinatif (Shiraishi *et al.*, 1970b). Dans l'eau, le filament germinatif cesse de croître presque immédiatement après l'émergence du tube germinatif de la conidie (Clark et Lorbeer, 1977).

La présence et la disponibilité des nutriments exogènes influencent le pouvoir pathogène de *Botrytis cinerea*. Ceci a été démontré par Clark et Lorbeer (1977), une pulvérisation de feuilles d'oignon avec des conidies de *B. cinerea* en suspension dans l'eau n'avait pas abouti à des lésions, par contre, l'ajout d'une source d'éléments nutritifs riche en sucres et éléments minéraux dans la suspension pulvérisée a entraîné la formation de lésions.

2.7.3 Etat physiologique de la plante

B. cinerea est connu pour être un pathogène de faiblesse, cependant, toutes les opérations qui peuvent provoquer un affaiblissement chez la plante favorisent l'attaque et le développement de ce champignon nécrotrophe.

Les quantités d'engrais et la composition de la solution nutritive utilisée pour la fertilisation des plantes influencent la sensibilité de la plante hôte à la pourriture grise. Cependant, Un taux

d'azote élevé, augmente la croissance des plantes et la densité du feuillage mais en même temps il rend la plante plus sensible à *B. cinerea* (Pitchay *et al.*, 2007).

B. cinerea pénètre principalement dans l'hôte par des blessures ou des ouvertures naturelles (Holz *et al.*, 2007). L'infection de plantes non sénescentes, de jeunes organes ou des fruits immatures entraînent généralement des dommages limités et des infections au repos asymptomatique. Ceci peut être dû au manque des nutriments tels que les sucres dans l'hôte, la présence de composés antifongiques préformés, ou à un environnement inadapté aux facteurs de virulence fongique (Prusky et Lichter, 2007).

Les proanthocyanines (PA) semblent induire la quiescence de *B. cinerea* dans les fruits non mûrs en limitant l'activité des enzymes fongiques comme les polygalacturonases qui sont nécessaires pour une infection agressive des hôtes (inhibition de 50 % dans les fruits non mûrs contre 8 % dans les fruits mûrs). Même si la teneur en PA dans les fruits reste constante pendant le mûrissement, l'augmentation de la polymérisation des PA conduit à une activité inhibitrice plus faible chez les fruits mûrs (Jersch *et al.*, 1989). De même, les anthocyanes peuvent retarder les infections à *B. cinerea* (Van Baarlen *et al.*, 2007). Par exemple, les fraises éclairées par une lumière fluorescente blanche ont montré une teneur accrue en anthocyanes et un retard de développement de moisissure grise (Saks *et al.*, 1996).

2.8 Diversité des populations de *Botrytis cinerea* :

La diversité des populations de *B. cinerea* a été évaluée au premier temps sur la base des caractéristiques morphologiques (l'absence ou présence de sclérotés, la sporulations et l'aspect du mycélium sur milieu synthétique), les isolats ont été classés en types mycéliens ou sclérotiens (Martinez *et al.*, 2003). La diversité est également évidente si l'on considère les critères métaboliques. La production de métabolites secondaires peut différer entre les souches. En particulier, le pigment rose qui est produit par un petit nombre de souches « gène issu probablement d'un transfert horizontal à partir du *Fusarium* sp. » (Schumacher *et al.*, 2013). Enfin, La diversité des résistances acquises aux fongicides peut également être observée au sein des populations, avec des souches présentant une adaptation à la plupart des fongicides disponibles.

2.8.1 Diversité phénotypique des populations de *B. cinerea*

Plusieurs études ont rapporté que *B. cinerea* est doté d'une grande variabilité phénotypique qui se manifeste par des différences morphologiques des colonies, la vitesse de croissance mycélienne, l'intensité de la sporulation, la virulence, la production d'enzymes et de pigments et la réponse aux fongicides (Martinez *et al.*, 2003 ; Kuzmanovska *et al.*, 2012).

2.8.1.1 Morphotype sur milieu de culture

Une étude de la diversité morphologique de *B. cinerea* a été réalisée sur 111 isolats. Selon l'aspect et la couleur des colonies, la présence ou non de sclérotés et leurs dispositions sur les boîtes. Les colonies fongiques ont été classées en huit types morphologiques distincts : quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre sclérotiens (**Tableau 1**) (Martinez et *al.*, 2003). Un nouveau type Sclérotien a été identifié par Kuzmanovska et *al.* (2012), il a été nommé S5 (**Tableau 2**), il présente les caractéristiques typiques du type mycélien M2 (un mycélium aérien et une sporulation abondante), mais compte tenu de l'aspect sclérotique, il est identique au type Sclérotien S4 (sclérotés nombreux, petits et éparpillés). Selon ces caractéristiques, le phénotype S5 peut être considéré comme un type transitoire entre les types morphologiques mycéliens et sclérotiens.

2.8.1.2 Agressivité sur plante

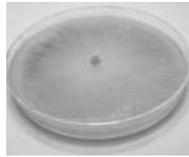
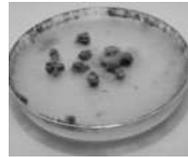
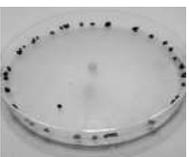
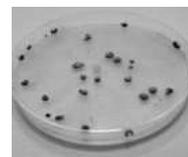
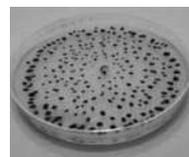
Plusieurs études ont rapporté une différence d'agressivité des isolats de *B. cinerea*, c'est-à-dire, les différents isolats ne possèdent pas le même degré d'agressivité sur une même plante hôte. Decognet et *al.* (2009) ont remarqué une variation d'agressivité de 17 souches de *B. cinerea* sur la tomate. Mirzaei et *al.* (2009) ont constaté que sur les 44 isolats testés sur vigne 9 isolats se sont avérés incapables de provoquer des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de vignes en conditions contrôlées.

Les études réalisées par Leyronas et *al.* (2015) ont montré que la spécialisation de l'hôte de *B. cinerea* sur la tomate et la laitue cultivées dans les mêmes serres n'était pas toujours accompagnée de différences significatives d'agressivité. Cela peut refléter l'arsenal biochimique vaste, diversifié et sophistiqué de *B. cinerea*, avec de nombreuses voies alternatives déployées au cours des différentes étapes des processus de pénétration, de développement et de décomposition.

2.8.1.3 Réponse aux fongicides « Botryticides »

La résistance acquise aux fongicides chez les champignons phytopathogènes est un défi majeur dans la protection moderne des cultures. En raison de sa large variabilité génétique et de ses capacités d'adaptation, *B. cinerea* est reconnu comme un pathogène « à haut risque », une résistance acquise a été observée pratiquement avec tous les fongicides utilisés contre la moisissure grise (Angelini et *al.*, 2016).

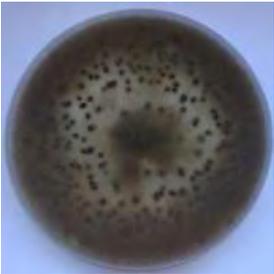
Tableau 1 : Classification morphologique de *Botrytis cinerea* sur milieu Malt-Agar (d'après Martinez et al., 2003).

Type Mycélien "M"				
Représentation				
Phénotype	M1	M2	M3	M4
Mycélium	Rasant	Aérien	Masses mycéliennes	Épais et dense
Sporulation ⁽¹⁾	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés ⁽²⁾	0	0	0	0
Type Sclérotien "S"				
Représentation				
Phénotype	S1	S2	S3	S4
Mycélium	Plutôt rasant	Plutôt rasant	Plutôt rasant	Plutôt rasant
Sporulation ⁽¹⁾	1	1	1	0
Sclérotés ⁽²⁾	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grands tailles, éparpillés	Nombreux, petits et éparpillés

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

Sclérotés ⁽²⁾: 0: absence; 1: rares; 2: très abondantes

Tableau 2 : Caractéristiques du type Sclérotien S5 identifié par Kuzmanovska et al., (2012)

Représentation	Phénotype	Mycélium	Sporulation	Sclérotés
	Sclérotien « S5 »	Aérien	Abondante	Nombreux, petits et éparpillés

Les fongicides peuvent exercer une pression de sélection intense conduisant à une augmentation de la fréquence de résistance au sein des populations. Cependant, les premières études ont examiné si les souches résistantes se regroupaient dans des analyses des Marqueurs. Les souches résistantes collectées dans les vignobles français avaient tendance à être de type transposa (Martinez et al., 2005), bien que les limites de ce marqueur doivent être prises en compte. Yourman et al. (2000) ont constaté que tous les isolats des serres de Caroline du Sud, aux États-Unis, étaient différents, avec un certain regroupement selon leur sensibilité aux fongicides.

Une deuxième série d'étude a examiné si les fongicides pouvaient induire la différenciation des populations soumises à divers programmes de pulvérisation. Dans l'étude de Walker et Fournier (2014), la diversité génétique et le mode de reproduction étaient similaires dans les parcelles traitées et non traitées. Néanmoins, Des différences significatives de la richesse allélique entre les parcelles non traitées et traitées ont été observées. Ceci est cohérent avec une dérive génétique, conduisant à la perte d'allèles, en particulier pour les allèles les plus rares, dans les populations.

Enfin, les fréquences de résistance pourraient donc être utilisées pour modéliser l'évolution de ces traits sur une période de plusieurs années et pour fournir des estimations de l'ampleur des forces évolutives à l'œuvre dans les vignobles (par exemple migration, sélection positive, sélection négative, donc de la résistance). (Walker et Fournier, 2014)

2.8.2 Diversité génétique des populations de *B. cinerea*

La génétique des populations est un outil puissant pour la découverte de nouvelles espèces cryptiques, mais le statut taxonomique de ces entités en tant qu'espèce doit être confirmé par des approches phylogéniques. Grâce à l'importance économique et scientifique de ce pathogène, les données sur la diversité des populations de *B. cinerea* ont été fournies et le génome complet de cette espèce fongique est actuellement disponible (Amselem et al., 2011 ; Staats et van Kan, 2012 ; Van Kan et al., 2017). En plus des gènes phylogénétiques, la diversité génétique des populations de *B. cinerea* a été principalement évaluée avec un certain nombre de marqueurs moléculaires qui se sont avérés utiles pour la confirmation et la reconnaissance des limites des espèces, car certains de ces marqueurs peuvent avoir des allèles spécifiques pour certaines espèces et/ou des fréquences très contrastées d'allèles partagés dans les populations naturelles. Cette propriété a été utilisée pour l'identification de plusieurs espèces du genre *Botrytis*, à identifier les facteurs qui façonnent la structure de la population et à comprendre les relations entre les différents compartiments (Walker et al., 2015).

2.8.2.1 Marqueurs moléculaire utilisés

Plusieurs marqueurs moléculaires ont été utilisés pour l'étude de la diversité génétique au sein des populations de *B. cinerea*, les marqueurs RAPD (random amplified polymorphic DNA) ont été utilisés pour l'étude des populations, cette technique s'est montrée comme un outil puissant pour l'analyse génétique et a été appliquée à un large éventail d'organismes. Cependant, les études menées par Moyano et *al.* (2003) ont montré que ces marqueurs étaient moins polymorphes par rapport aux marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) dans le cas de *B. cinerea*.

En plus de ces techniques multi-locus, plusieurs études ont utilisées les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pour l'analyse de diversité, cette technique est à locus unique, elle est plus reproductible et plus précise avec un niveau élevé de polymorphisme (Giraud et *al.*, 1999 ; Baraldi et *al.*, 2002 ; Kretschmer et Hahn 2008).

Les éléments transposables (ET) Boty et Flipper sont probablement les marqueurs les plus utilisés dans les études des populations de *B. cinerea*. Même si, la subdivision entre *vacuina* et *transposa* a conduit à la découverte de *B. pseudocinerea*, de nouveaux résultats du séquençage du génome ont remis en question l'utilité de ces marqueurs pour les études de population (Amselem et *al.*, 2011). Un même génome peut contenir non seulement plusieurs nombres de copies intégrales d'éléments transposables, mais également des copies tronquées. Par conséquent, les études de diversité sont basées sur la classification et peuvent refléter principalement la dynamique de transposition au sein d'un même génome, plutôt que les processus liés exclusivement à l'étude des populations. Ces amorces partiellement chevauchantes détectent les copies de transposon dans un environnement génomique spécifique. Les résultats obtenus pour une souche donnée peuvent donc différer selon la technique utilisée, rendant les comparaisons de résultats difficiles (Martinez et *al.*, 2008) (**Tableau 3**).

Les marqueurs microsatellites (SSR) sont souvent hautement polymorphes. Cette technique est facile à utiliser et hautement reproductible. Un ensemble de neuf SSR, appelés Bc1 à Bc10 dont Bc9 et Bc10 peuvent être liés, car ils ont été isolés du même clone (Fournier et *al.*, 2002), a été utilisé dans la plupart des études. Cet ensemble SSR s'est révélé très discriminant pour les études de population (Karchani-Balma et *al.*, 2008). Dans une étude basée sur des marqueurs SSR, la diversité allélique s'est avérée plus faible au locus Bc4 et un allèle privé (taille 86 pb) a été identifié au locus Bc6 chez *B. pseudocinerea* par rapport à *B. cinerea* (Walker et *al.*, 2011). Ces différences ont confirmé la délimitation des deux espèces après analyse génétique des populations, avec des indices de différenciation entre les deux espèces

significativement supérieures à ceux habituellement observés entre populations d'une même espèce.

Tableau 3 : Marqueurs moléculaires utilisées pour l'identification de *B. cinerea*.

Nom d'amorce	Amorce	Longueur du fragment généré	Auteurs
Paire d'amorces spécifique à <i>B. cinerea</i>			
C729+	5'-AGC TCG AGA GAG ATC TCT GA-3'	700 pb	Rigotti et <i>al.</i> , 2002
C729-	5'-AAG GTG CGT CTT GTA ACG TC-3'		
Paire d'amorces spécifique à Boty			
BotyF4	5'- CAG CTG CAG TAT ACT GGG GGA -3'	596 pb	Diolez et <i>al.</i> , 1995
BotyR4	5'- GGT GCT CAA AGT GTT ACG GGA G-3'		
Paire d'amorces spécifiques à Flipper			
F300	5'-GCA CAA AAC CTA CAG AAG A-3'	1842 pb	Levis et <i>al.</i> , 1997
F1550	5'-ATT CGT TTC TTG GAC TGT A-3'		

2.8.2.2 Effet de la Plante hôte et de la répartition géographique sur la diversité génétique des populations de *B. cinerea*

L'adaptation à l'hôte est un enjeu clé pour les agents pathogènes généralistes tels que *B. cinerea*. Les études basées sur l'utilisation des SSR reconnaissent l'hôte comme le facteur structurant le plus puissant des populations, devant la géographie (Fournier et Giraud, 2008 ; Walker et *al.*, 2015). Ainsi, les populations collectées à partir du même hôte dans des régions éloignées peuvent être plus similaires génétiquement que les populations collectées à partir d'hôtes différents dans la même région (Walker et *al.*, 2015). A cet effet, les études menées en utilisant comme facteur structurant les plantes hôtes ont révélé une prédominance des souches transposées dans les populations récoltées à partir de raisins, fraisiers et tomates. Alors que, les souches vacuola dominent les populations de *B. cinerea* provenant de kiwis et de pommes (Esterio et *al.*, 2011a ; Samuels et *al.*, 2012).

2.9 Méthodes de contrôle de la maladie de la pourriture grise

2.9.1 Les mesures prophylactiques

L'importance des mesures prophylactiques dans le contrôle de la pourriture grise est admise par les professionnels du milieu agricoles et les scientifiques (Viret et *al.*, 2010 ; Valdés-Gómez et *al.*, 2008). Ces mesures visent, essentiellement, à améliorer la vigueur des plants, à réduire le taux d'inoculum initial et à limiter la dissémination des spores fongiques afin de réduire l'impact de la maladie sur la santé des plantes et la production agricole.

Les mesures prophylactiques :

- 1) Le choix des cultivars peut jouer un rôle important dans les stratégies de gestions de la maladie. Dans certains cultivars de framboises, le liquide stigmatique a inhibé l'infection dû à *B. cinerea*. Ce mécanisme permet à ces plantes d'éviter les infections latentes, qui pourraient évoluer en infections aiguës (Williamson et Jennings, 1992).
- 2) La densité élevée de la plantation, accentue l'impact de la pourriture grise sur les différentes plantes hôtes. L'amélioration de la circulation de l'air au tour des grappes de vignes, la réduction de l'humidité relative et l'exposition des fruits à la lumière ont réduit la pourriture sur les grappes de raisin (Smithyman et al., 1997 ; Elad et al., 2014).
- 3) La fertilisation calcique et potassique réduit la sévérité de la maladie, Le calcium réduit la fuite d'exsudats vers la surface de l'hôte, ce qui réduit la disponibilité de ces exsudats pour le pathogène (Volpin et Elad, 1991). Par contre, la fertilisation azotée doit être contrôlée, car, l'augmentation du niveau d'azote entraînerait une sensibilité accrue à *B. cinerea* (Hoffland et al., 1999).
- 4) Le traitement thermique, l'augmentation de la température à l'intérieur des serres pendant la journée, peut avoir un effet sur la réduction de la maladie. Les résultats de l'étude menée par Elad et al. (2014) ont révélé que la durée des températures supérieures à 30 °C est inversement proportionnelle à l'incidence de la moisissure grise. Dans ce cas, les plantes exposées à un traitement thermique de jour et infectées plus tard par *B. cinerea* présentaient des infections moins graves que les plantes inoculées qui n'avaient pas reçu de traitement thermique (Elad et al., 2014).
- 5) Une combinaison de traitements peut permettre une meilleure suppression de la moisissure grise que les traitements individuels et l'intégration appropriée des mesures de contrôle peuvent fournir un contrôle suffisant des maladies avec une utilisation minimale de fongicides chimiques.

2.9.2 Lutte chimique

Botryticides : mode d'action et résistance

Les fongicides ciblent soit des fonctions cellulaires essentielles, soit une activité sur un seul site ou sur plusieurs sites, interférant avec plus d'une fonction cellulaire. La plupart des fongicides modernes, actifs à faible dose, sont très spécifiques par leur activité sur un seul site. Cependant, parallèlement à cette forte activité, le risque de résistance est également élevé (Tableau 4).

a) Botryticides Multisite

Les fongicides multisites, généralement à activité uniquement préventive, figurent parmi les plus anciens utilisés en agriculture, tels que les sels de soufre et de cuivre inorganiques. Les molécules utilisées contre les maladies dues à *Botrytis* appartiennent aux familles chimiques suivantes : chloronitriles, phthalimides, sulfamides et dithiocarbamates (Russell, 2005). La résistance aux fongicides multisites est rarement observée chez *Botrytis*. Bien qu'ils soient moins exposés au développement de résistance que les fongicides unisites, mais certains produits multisites ont été retirés de la liste des produits phytosanitaires de certains pays en raison de leurs toxicités élevées (Leroux, 2007 ; Fillinger *et al.*, 2016).

b) Botryticides Unisites

➤ Inhibiteurs du cytosquelette :

Ils figurent parmi les premiers fongicides systémiques (à activité curative) utilisés, tels que, Le N-phénylcarbamate diéthofencarbe principalement utilisés contre la moisissure grise avec une action sur la division cellulaire, la mitose et la sécrétion de protéines (Temperli *et al.*, 1991 ; Pedregosa *et al.*, 1995). En raison de leurs applications massives, *B. cinerea* est devenu résistant à ces fongicides. Cependant, deux phénotypes majeurs de résistance aux inhibiteurs du cytosquelette ont été décrits pour *B. cinerea*. Dans un premier temps, une résistance élevée aux benzimidazoles est associée à une sensibilité accrue aux N-phényl-carbamates et au zoxamide (Ben HR, NPC S). Le deuxième phénotype présente une résistance croisée positive envers les trois catégories d'inhibiteurs du cytosquelette (Ben HR /MR, NPC R).

➤ Fongicides affectant la transduction du signal (osmorégulation)

Ce type de botryticides est représenté par deux catégories de familles chimiques (les dicarboximides et les phénylpyrroles), leurs cibles exactes restent encore inconnues. Néanmoins, ces botryticides induisent des changements physiologiques, caractéristiques d'une sur-stimulation de la transduction du signal de réponse au stress, à savoir l'accumulation de glycérol, la peroxydation lipidique (Tanaka et Izumitsu, 2010 ; Hayes *et al.*, 2014). Ils inhibent la germination des conidies et la croissance mycélienne. En raison d'une utilisation intensive, les dicarboximides ont rapidement perdu leur efficacité contre la moisissure grise qui s'est manifestée par l'apparition des résistances spécifiques parmi les populations de *B. cinerea* (Leroux, 2007).

➤ Inhibiteurs de la biosynthèse des acides aminés

Les anilinopyrimidines mépanipyrin, pyrimethanil et cyprodinil sont utilisés pour lutter contre la moisissure grise sur diverses cultures, en solo ou en mélange avec le fludioxonil. Ils inhibent la biosynthèse des acides aminés, en particulier celle de la méthionine (Fritz et *al.*, 1997). Cependant, les dosages enzymatiques n'ont pas pu prouver l'effet du pyriméthanil sur l'activité de la cystathion- β -lyase (Fritz et *al.*, 2003) et aucune mutation spécifique n'a été enregistrée, dans les souches résistantes (Sierotzki et *al.*, 2002 ; De Miccolis Angelini et *al.*, 2012). Par conséquent, la cible directe des anilinopyrimidines reste inconnue. Les isolats présentant une résistance modérée ou élevée aux anilinopyrimidines ont été trouvés quelques années après l'introduction de ces molécules (Leroux et *al.*, 2002). Cette résistance spécifique est conférée par un seul gène et peut être suspectée comme mutation du site cible (Chapeland et *al.*, 1999). Des analyses génétiques supplémentaires menées par De Miccolis Angelini et *al.*, en 2012 ont indiqué une forte instabilité de la résistance à l'anilinopyrimidine pendant la croissance végétative sans pression sélective, ce qui suggère que les isolats les plus résistants sont des hétérocaryons. Cela a été confirmé par la létalité des ascospores homocaryotes résistantes à l'anilinopyrimidine. La résistance à l'anilinopyrimidine est détectée dans la plupart des populations de moisissures grises. Mais une bonne utilisation de ces fongicides, permet de maintenir des fréquences de résistance acceptables (Walker et *al.*, 2013).

➤ Inhibiteurs de biosynthèse de l'ergostérol (SBI)

L'ergostérol, spécifique au règne Fungi est le principal stérol présent dans les membranes de la plupart des champignons, sa biosynthèse constitue une cible importante pour les fongicides. Le contrôle de la moisissure grise repose sur, les inhibiteurs de la déméthylation C4, le fenhexamide et la fenpyrazamine et les inhibiteurs de la 14 α -déméthylation, le tébuconazole et le prochloraz. L'hydroxyanilide fenhexamide et l'amino-pyrazolinone fenpyrazamine inhibent la 3-cétoréductase du complexe de déméthylation C4, arrêtant ainsi, la synthèse de l'ergostérol et entraînant l'accumulation d'intermédiaires toxiques (Debieu et *al.*, 2001).

Cependant, Les inhibiteurs de la déméthylation C4 ont un spectre d'activité limité au *Botrytis* et aux espèces étroitement apparentées (Debieu et *al.*, 2013), mais *Botrytis pseudocinerea* est naturellement résistant au fenhexamide (Leroux et *al.*, 2002 ; Walker et *al.*, 2011). La sélectivité de ces molécules (fenhexamide et fenpyrazamine) peut s'expliquer par des affinités différentielles avec l'enzyme cible 3-cétoréductase (Debieu et *al.*, 2013).

Des études génétiques ont montré que la résistance acquise au fenhexamide et également à la fenpyrazamine chez *B. cinerea* est due à des modifications ciblées dans la plupart des souches (Fillinger et *al.*, 2008 ; Billard et *al.*, 2012). Les principales souches hautement résistantes présentent un remplacement de la phénylalanine en position 412 dans la protéine Erg27 (Grabke et *al.*, 2013 ; Saito et *al.*, 2014a). Ces modifications diminuent l'affinité de fenhexamide

pour les isoenzymes 3-cétoréductase (Debieu et *al.*, 2013), permettant à l'enzyme d'être active même à des concentrations élevées de fenhexamide.

Bien qu'une résistance spécifique soit apparue dans les populations de *B. cinerea* quelques années après l'homologation du fenhexamide, une faible perte d'efficacité est enregistrée pour cette molécule. Ceci est peut-être dû aux restrictions d'utilisation (par exemple, une fois par an sur la vigne), qui permet de maintenir des fréquences de résistance acceptable (Billard et *al.*, 2012).

➤ Fongicides affectant la respiration du champignon

La respiration fongique et la production énergétique sont des fonctions cellulaires essentielles et aussi une cible pour les fongicides. Cinq catégories fonctionnelles de fongicides inhibiteurs de la respiration ont été développées, et trois d'entre eux sont enregistrés comme botryticides ceux qui inhibent le complexe II à savoir la succinate déshydrogénase, complexe III, ou cytochrome C-réductase et les découpleurs de la phosphorylation oxydative.

Tableau 4 : Principales matières utilisées contre la moisissure grise : mode d'action, taux d'application et le degré de résistance de *B. cinerea* vis-à-vis de ces produits (Leroux, 2007 ; Elad et *al.*, 2016b).

Mode d'action	Matière active	Doses d'application	Résistance
Multisite	Dichlofluanid	2000 g/ha	LR
	Folpet	1500 g/ha	-
	Thiram	2000 g/ha	LR
	Chlorothalonil	1000 g/ha	-
Affectant la respiration	Fluazinam	750 g/ha	LR/MR
	Azoxystrobin	200 g/ha	HR
	Pyraclostrobin	100-200 g/ha	HR
	Boscalid	500-600 g/ha	MR/HR
	Fluopyram	300 g/ha	MR
Affectant le cytosquelette	Carbendazim	500 g/ha	S/HR
	Thiophanate-methyl	1120 g/ha	S/HR
	Diethofencarb	500 g/ha	MR/HR
Osmorégulation	Iprodione	750 g/ha	S/LR
	Procymidone	750 g/ha	S/LR

	Fludioxonil	500 g/ha	-
Affectant la synthèse des acides aminés et des protéines	Cyprodinil	375 g/ha	MR-HR
	Mepanipyrim	400-600 g/ha	MR-HR
	Pyrimethanil	400-800 g/ha	MR-HR
Inhibiteurs de la synthèse des stérols	Prochloraz	250 g/ha	-
	Tebuconazole	250 g/ha	-
	Fenhexamide	750 g/ha	HR (HydR3+)
	Fenpyrazamine	600 g/ha	LR/MR

LR : résistance faible ; MR : résistance modérée ; HR : Résistance élevée ; S : sensible.

2.9.3 Lutte biologique

La complexité et les difficultés associées au contrôle chimique de la pourriture grise, ainsi que l'importance économique de cette maladie et la pression croissante de la société pour réduire l'utilisation des pesticides, ont incité les chercheurs à développer des moyens de lutte biologique, tels que, les agents de contrôle biologiques, les extraits de plantes, les minéraux et les composés organiques. Malgré les efforts de recherche, le contrôle biologique a été considéré comme un maillon faible de la stratégie de gestion intégrée et l'utilisation des biopesticides contre la moisissure grise reste faible (Nicot et *al.*, 2011 ; Nicot et Bardin, 2012) (**Tableau 5**).

Une large gamme de différents groupes de plantes et d'agents microbiens ont été signalés comme présentant une activité inhibitrice contre *Botrytis cinerea* dans des essais en laboratoire et en serre, mais seuls quelques-uns ont montré une performance constante sur le terrain et encore moins ont été commercialisés (Nicot et *al.*, 2011).

a) Extraits de plantes

L'utilisation des extraits de plantes dans la lutte contre les bio-agresseurs a commencé depuis longtemps de manière traditionnelle. Actuellement, plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité de certains extraits de plante dans le contrôle de la pourriture grise. Par exemple, un extrait de *Melaleuca alternifolia* a été commercialisé. Il a une activité à large spectre contre divers pathogènes fongiques, y compris *B. cinerea* dans les cultures maraîchères et légumières, les vignes. Dans des essais sur le terrain sur des raisins en Californie, il a permis une suppression de plus de 90 % de l'incidence de la moisissure grise, ce qui est égal aux meilleurs traitements fongicides (Nguyen et *al.*, 2013).

b) Minéraux et composés organiques

Certains composés minéraux et organiques peuvent être utilisés dans la lutte contre les agents pathogènes des plantes (Tripathi et Dubey, 2004). Le chitosan, forme soluble de la chitine possède des propriétés antifongiques contre quelques champignons phytopathogènes (Bautista-Banos *et al.*, 2006). Ce produit déclenche des réactions de défense de la plante hôte contre les attaques d'agents pathogènes, il est surtout utilisé comme agent de lutte contre *B. cinerea* en protection post-récolte (El-Ghaouth *et al.*, 1997).

Nigro *et al.*, (2006) ont mis en évidence l'activité de 19 sels *in vitro* et *in vivo* pour le contrôle *B. cinerea* sur des raisins de table après récolte. Cependant, plusieurs sels ont montré des résultats satisfaisants dans la réduction de la maladie. Parmi ces sels le chlorure de calcium (CaCl_2), le carbonate de potassium (K_2CO_3), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et le carbonate de sodium (Na_2CO_3) réduisent significativement l'incidence de la pourriture grise *in vivo* et *in vitro* (inhibition de la germination des conidies et la croissance du mycélium de *B. cinerea*). En outre, La pulvérisation de 10 à 20 mM de sulfate de calcium sur rosiers, 24 heures avant la récolte, réduit l'incidence de *B. cinerea* sur les fleurs de rose en stockage (De Capdeville *et al.*, 2005).

Un certain nombre de produits à base d'huile sont utilisés dans le contrôle de la pourriture grise. Les deux produits les plus courants sont l'huile de paraffine et l'huile de neem. L'huile de paraffine est utilisée pour contrôler certaines maladies fongiques, notamment la pourriture grise. Il peut étouffer la croissance fongique et réduire la germination des conidies sur les surfaces traitées. Il est principalement fongistatique plutôt que fongicide. Pour lutter contre les agents pathogènes fongiques, l'huile doit généralement être appliquée à titre prophylactique avant l'infection. L'huile de neem est un produit généralement considéré comme étant le plus actif contre les maladies de l'oïdium mais aurait également une activité contre *B. cinerea* (Nicot *et al.*, 2016).

c) Agents antagonistes

Les microorganismes antagonistes ont été utilisés depuis plusieurs décennies dans la lutte contre la pourriture grise, tels que les champignons filamenteux (par exemple *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Chlonostachys*, *Ulocladium*), levures (par exemple *Aureobasidium*, *Candida*), bactéries (par ex. *Bacillus*, *Pseudomonas*) et les actinomycètes (par exemple *Streptomyces*) (Nicot *et al.*, 2016).

Tableau 5 : Les principaux extraits de plantes et microorganismes antagonistes utilisés pour la lutte contre la pourriture grise et leur mode d'action (Nicot et *al.*, 2016).

Espèce utilisée	Groupe	Mode d'action
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Plantes	Antifongique
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Plantes	Induction de la résistance systémique (ISR) des plantes
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Champignons (levures)	Compétition
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bactérie	Antimicrobien
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactérie	Antimicrobien, induction de la résistance des plantes
<i>Chlonostachys rosea</i>	Champignons	Compétition
<i>Gliocladium catenulatum</i>	Champignons	Compétition, mycoparasitisme
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bactéries	Compétition
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Bactéries	Compétition
<i>Trichoderma harzianum</i>	Champignons	Compétition, antibiose, Résistance acquise de manière systémique (SAR)
<i>Trichoderma atroviride</i>	Champignons	Compétition, mycoparasitisme, antibiose
<i>Trichoderma polysporum</i>	Champignons	Antibiose, Résistance acquise de manière systémique (SAR)
<i>Ulocladium novo-zealandiae</i>	Champignons	Compétition

3 Données générales sur le genre *Trichoderma*

Trichoderma Pers. est un genre des ascomycètes filamenteux cosmopolite présent dans les différents habitats écologiques, on peut le trouver dans tous type de sol, il se développe de manière saprophytique sur le bois mort et les débris des végétaux, démontrant ainsi un haut potentiel opportuniste et une grande adaptabilité aux différentes conditions écologiques (Druzhinina et al., 2011 ; Atanasova, 2014 ; Samuels et al., 2012). En raison de sa capacité à parasiter les champignons phytopathogènes et à renforcer les défenses naturelles des plantes contre les agents phytopathogènes envahissants, les espèces du genre *Trichoderma* sont largement utilisées en agriculture comme bio-fongicides et biofertilisant (Mukherjee et al., 2013) et font partie des agents bénéfiques les plus étudiés durant les deux dernières décennies (Lorito et al., 2010 ; Galarza et al., 2015).

3.1 Taxonomie

Depuis près de 200 ans, les genres *Trichoderma* et *Hypocrea* ont été traités comme deux genres séparés, avec de nombreuses espèces liées respectivement, comme des formes asexuées (anamorphes) et sexuées (téleomorphes) d'une même espèce. La taxonomie de *Trichoderma* a considérablement dépassé celle d'*Hypocrea*, pour laquelle plusieurs centaines d'épithètes existaient déjà à la fin du XIXe siècle. À partir de 2013, le Code international de nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes (ICN : International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants) (ICN, 2013) stipulait que les espèces individuelles de champignons pléomorphes, telles que *Trichoderma* / *Hypocrea*, ne porteraient plus qu'un seul nom. Comme *Trichoderma* est le plus âgé et donc priorisé sur *Hypocrea* (Jaklitsch et Voglmayr, 2015).

Le genre *Trichoderma* est connu depuis 1794, décrit pour la première fois par Persoon, cependant sa taxonomie est restée obscure jusqu'à ces dernières décennies, La première tentative sérieuse de distinguer morphologiquement les différentes espèces appartenant à ce genre, ou plutôt des « agrégats d'espèces », a été faite par Rifai (1969), il a mis en œuvre une classification basée sur les caractères microscopiques, décrivant ainsi neuf taxons de *Trichoderma* : *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bainier, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* (Link) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viride* Pers. Les études morphologiques les plus détaillées des anamorphes (*Trichoderma*) ont été réalisées par Bissett (1984, 1991a,b,c, 1992), qui a distingué 21 taxons dans la section *Pachybasium* et sept dans la section *Longibrachiatum*, tandis que les autres sections n'ont pas encore été traitées.

De telles études montrent que la délimitation des espèces biologiques est extrêmement difficile dans ce genre uniquement pour des raisons morphologiques. D'autres méthodes taxonomiques complémentaires à la morphologie comprennent les études des métabolites secondaires, qui montrent une grande diversité dans ce genre (Okuda et *al.*, 1982). Les caractéristiques physiologiques détectables dans les plaques de microtitration peuvent éventuellement fournir un système utile pour l'identification. Les profils des isoenzymes ont été utilisés comme un outil taxonomique efficace (Leuchtman et *al.*, 1996 ; Samuels et *al.*, 1994).

Trichoderma avait été divisé en cinq sections (Gams et Bissett, 2002), mais avec l'analyse phylogénétique moléculaire croissante, la nomenclature sectorielle de *Trichoderma* a été abandonnée au profit de la dénomination de clades phylogénétiques (Samuels, 2006 ; Kubicek et *al.*, 2008).

L'avènement des techniques moléculaires et l'analyse phylogénétique de données de séquences d'ADN ont permis une meilleure résolution des entités taxonomiques (Zimand et *al.*, 1994 ; Kuhls et *al.*, 1997).

3.2 Description et morphologie du genre *Trichoderma*

Rifai (1969) et Bissett (1991a) ont décrit plusieurs caractères morphologiques qu'ils ont utilisés eux même pour caractériser et différencier les différentes espèces appartenant au genre *Trichoderma*. Les deux auteurs ont souligné la difficulté liée à l'identification morphologiques des espèces de *Trichoderma*, ceci est dû à la simplicité et la faible variabilité des caractères morphologiques utilisés (Samuels et *al.*, 1998 ; Kullnig et *al.*, 2001). Néanmoins, des observations morphologiques minutieuses peuvent être suffisantes pour identifier certaines espèces de *Trichoderma*, au moins dans la mesure où les taxons ont été adéquatement différenciés morphologiquement et décrits dans la littérature existante.

En culture, les espèces de *Trichoderma* ont une croissance généralement rapide et forment un mycélium aérien clairsemé avec des pustules vertes ou blanches (Bissett 1991a). Au microscope, les espèces de *Trichoderma* présentent généralement des conidiophores très ramifiés, qui portent des conidies unicellulaires vertes ou hyalines (Rifai, 1969).

Les caractères des colonies peuvent être distinctifs et caractéristiques d'une espèce. Cependant, l'apparence des colonies est difficile à décrire avec une précision suffisante pour être très utile à l'identification. Les taux de croissance en culture peuvent être nécessaires pour distinguer des espèces par ailleurs similaires. La production de conidies à partir de conidiophores épanchés ou de conidiophores agrégés en fascicules ou pustules est généralement caractéristique d'une espèce. Les pigments diffusables peuvent également être caractéristiques, bien que la couleur de ces pigments ne varie pas beaucoup chez *Trichoderma*.

Dans le passé, les espèces de *Trichoderma* étaient classées en cinq sections différentes en fonction de leurs caractères morphologiques (Bissett 1984, 1991a, b). Les approches contemporaines de la classification de *Trichoderma* répartissent les espèces en clades phylogénétiques sur la base d'analyses de données de séquence (Atanasova et al., 2013 ; Chaverri et al., 2015).

Les sections de *Trichoderma* selon Bissett (1991a) (Fig. 4) :

3.2.1 La section *Trichoderma* décrite par Bissett 1991a

Cette section est caractérisée par des conidiophores étroits et flexueux, portant des phialides subulées, ou lagéniformes, elles sont peu nombreuses et branchées en paires, elles peuvent être disposées très rarement en trois phialides par verticille. Quelques espèces appartenant à cette section se caractérisent par des odeurs aromatiques caractéristiques comme, l'odeur de la noix de coco, elle est produite couramment par des souches de *Trichoderma viride*, et parfois aussi par *Trichoderma atroviride*.

Les espèces appartenant à cette section sont *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. viride* et *T. atroviride*.

3.2.2 La section *Pachybasium* décrite par Bissett 1991a

Elle est caractérisée par des conidiophores fortement ramifiés, ou en pustules compactes, portant des branches très courtes avec des phialides typiques courtes, gonflées et disposées en verticilles très denses. Le sommet du conidiophore chez certaines espèces de la section *Pachybasium* se termine de manière caractéristique par un allongement stérile qui peut être droit, ondulé ou enroulé. Elle renferme les espèces suivantes : *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. virens*

3.2.3 La section *Hypocreanum* décrite par Bissett 1991a

Cette section renferme les formes anamorphes d'*Hyporea*, caractérisée par des conidiophores faiblement branchés, et des phialides cylindriques à subulées.

3.2.4 La section *Longibrachiatum* décrite par Bissett (1984)

Elle est caractérisée par des conidiophores peu ramifiés, et des phialides allongées en forme d'ampoules à lagéniforme, qui se trouvent en grand nombre et sont disposées irrégulièrement. Les espèces appartenant à cette section ont généralement des pigments jaune verdâtre brillant bien visibles, au moins lors du premier isolement. Les cellules subterminales du conidiophore peuvent produire des conidies à travers un cou latéral court, donc des phialides intercalaires ou

ce que Gams (1971) a appelé phanophialides. Cette section renferme les espèces *T. longibrachiatum* et *T. pseudokoningii*, *T. saturnisporum* Hamill et *T. ghanense*.

3.2.5 La section *Saturnisporum* décrite par Doi et al. (1987)

Cette section présente des espèces caractérisées par des conidiophores peu ramifiés, et des phialides peu nombreuses de forme gonflées et génèrent des pustules conidiennes. Les conidies peuvent avoir des projections en forme d'ailes ou bullées de la paroi externe chez les espèces *T. saturnisporum* et *T. ghanense*. (Gams et bissett, 2002).

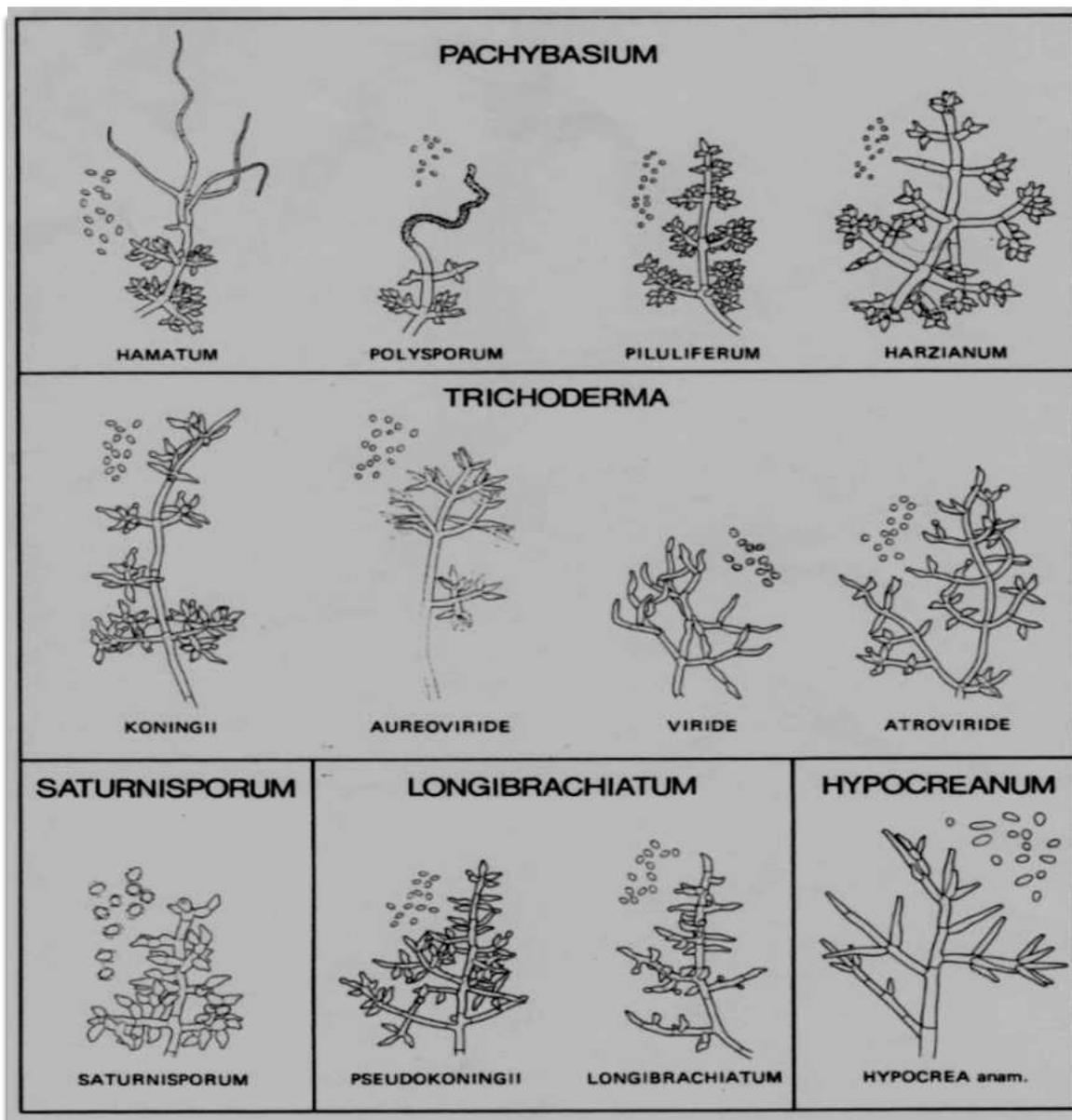


Fig. 4 : Aspect microscopique des cinq sections décrites par Bissett 1991a

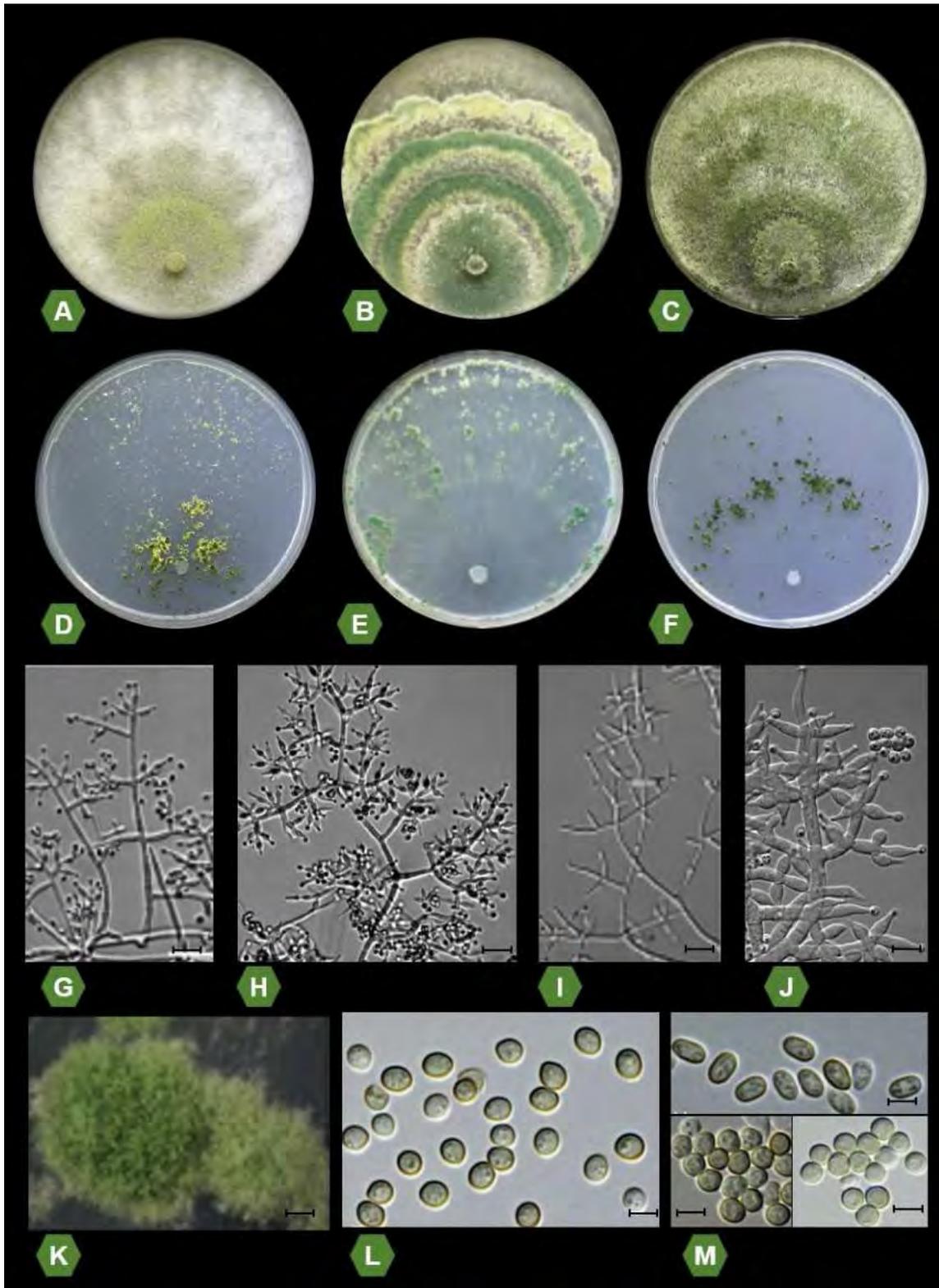


Fig. 5 : Aspect Macroscopique et microscopiques des colonies de *Trichoderma*.

A, B, C : Aspect des cultures sur milieu PDA à 25° C. **D, E, F :** Aspect des cultures sur milieu SNA à 25° C. **G, H, I, J :** Conidiophores et phialides. **K :** Pustule mycélienne sur milieu SNA (sous loupe binoculaire). **L, M :** Conidies. Barre d'échelle : **G, H, I** = 20 μ m ; **J** = 15 μ m ; **K**= 1.0 mm ; **L, M** = 5 μ m (Jaklitsch et Voglmayr, 2015).

3.3 Identification moléculaire

Plusieurs études ont conclu que l'utilisation uniquement des caractères morphologiques n'est pas suffisante pour une identification précise des espèces du genre *Trichoderma*, cependant, l'avènement des techniques moléculaires et l'analyse des données de séquences d'ADN ont permis la description de la grande majorité des espèces connues aujourd'hui (Chaverri et al., 2015 ; Samuels et Hebbar 2015).

➤ Différents gènes étudiés pour l'identification des espèces de *Trichoderma*

Plusieurs régions génomiques ont été séquencées pour l'identification des différentes espèces de *Trichoderma*, La région ITS (internal transcribed spacer) rDNA est la plus étudiée dans le cas des champignons et reconnu comme étant le code-barres pour les champignons (Schoch et al., 2012). Mais plusieurs études révèlent que l'utilisation uniquement des ITS dans l'identification des espèces est peu utile et se montre imprécis, notamment dans le cas du genre *Trichoderma* (Hirooka et al., 2011, Salgado-Salazar et al., 2012).

Au niveau du genre *Trichoderma*, le gène *tef1* (Translation elongation factor $\alpha 1$) est considéré comme étant le principal marqueur actuellement utilisé pour étudier la diversité des *Trichoderma* et le gène le plus efficace pour l'identification des espèces du genre *Trichoderma*. Le second gène utilisé dans les études de diversité est le gène *rpb2*, qui montre aussi un potentiel de résolution élevé (un peu moins par rapport au gène *tef1*). D'autres gènes sont utilisés dans la reconstruction phylogénétique tel que *ac1* (larger subunit of ATP citrate lyase), *act* (actine), *chi18-5* (endochitinase) et *cal* (calmoduline) afin d'assurer une meilleure identification des espèces (Samuels et Hebbar, 2015 ; Jaklitsch et al., 2015).

3.4 Mécanisme d'action du genre *Trichoderma*

Les espèces du genre *Trichoderma* sont connus depuis au moins 1930 pour leurs capacités à agir comme agents de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes. Les principaux mécanismes d'action sont : le mycoparasitisme, l'antibiose, et la compétition (Kubicek et al., 2001). Ils peuvent également induire une résistance chez la plante et stimuler la croissance en favorisant l'absorption des différents nutriments (Shoresh et al., 2010).

3.4.1 Compétition

Le terme Compétition rhizosphérique a été inventé pour la première fois pour les souches de *Trichoderma* par Ahmad et Baker (1987), et a été défini comme la capacité du champignon à croître et à rivaliser avec d'autres microorganismes pour coloniser la surface racinaire et concurrencer avec eux pour mobiliser et saisir les nutriments sécrétés par les racines dans le sol

rhizosphérique (Monfil et Casas-Flores, 2014). Cependant, *Trichoderma* a montré une forte capacité à coloniser le sol rhizosphérique, le rendant plus compétitifs que beaucoup d'autres microbes du sol (Benitez et al., 2004).

3.4.2 Le mycoparasitisme

Le mycoparasitisme est une interaction antagoniste établie entre deux espèces fongiques, où l'une d'entre elles attaque directement l'autre. Cette caractéristique est naturelle chez *Trichoderma* et elle a été exploitée avec succès pour contrôler divers phytopathogènes fongiques (Monfil et Casas-Flores, 2014).

Les relations antagonistes fongiques sont classées, en fonction de l'agressivité du pathogène envers son hôte, en deux groupes principaux :

Les interactions biotrophes, dans la plupart des cas, ces mycoparasitismes ne peuvent pas être utilisés avec succès comme agents de lutte biologique.

Les interactions nécrotrophes constituent la deuxième classe. Les mycoparasitismes fongiques inclus dans ce groupe, ont une capacité antagoniste contre une large gamme de champignons phytopathogènes et sont plus agressifs envers leurs proies. *Trichoderma* appartient à cette classe et considéré comme un agent de lutte biologique très efficace (Monfil et Casas-Flores, 2014).

Le mycoparasitisme utilisé par *Trichoderma* est un processus complexe (**Fig. 6**), qui implique des événements séquentiels et coopératifs, y compris une croissance chimiotrophique positive vers son hôte, le contact direct avec la proie fongique et l'enroulement autour des hyphes de l'hôte. De plus, des changements morphologiques ont également lieu dans les hyphes de *Trichoderma*, en formant des structures de pénétration de type appressorium et en sécrétant des enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire, permettant à l'hyphe hôte d'être pénétré par *Trichoderma*, se terminant par la mort et la dégradation de l'hôte (Mendoza-Mendoza et al., 2003 ; Woo et al., 2006).

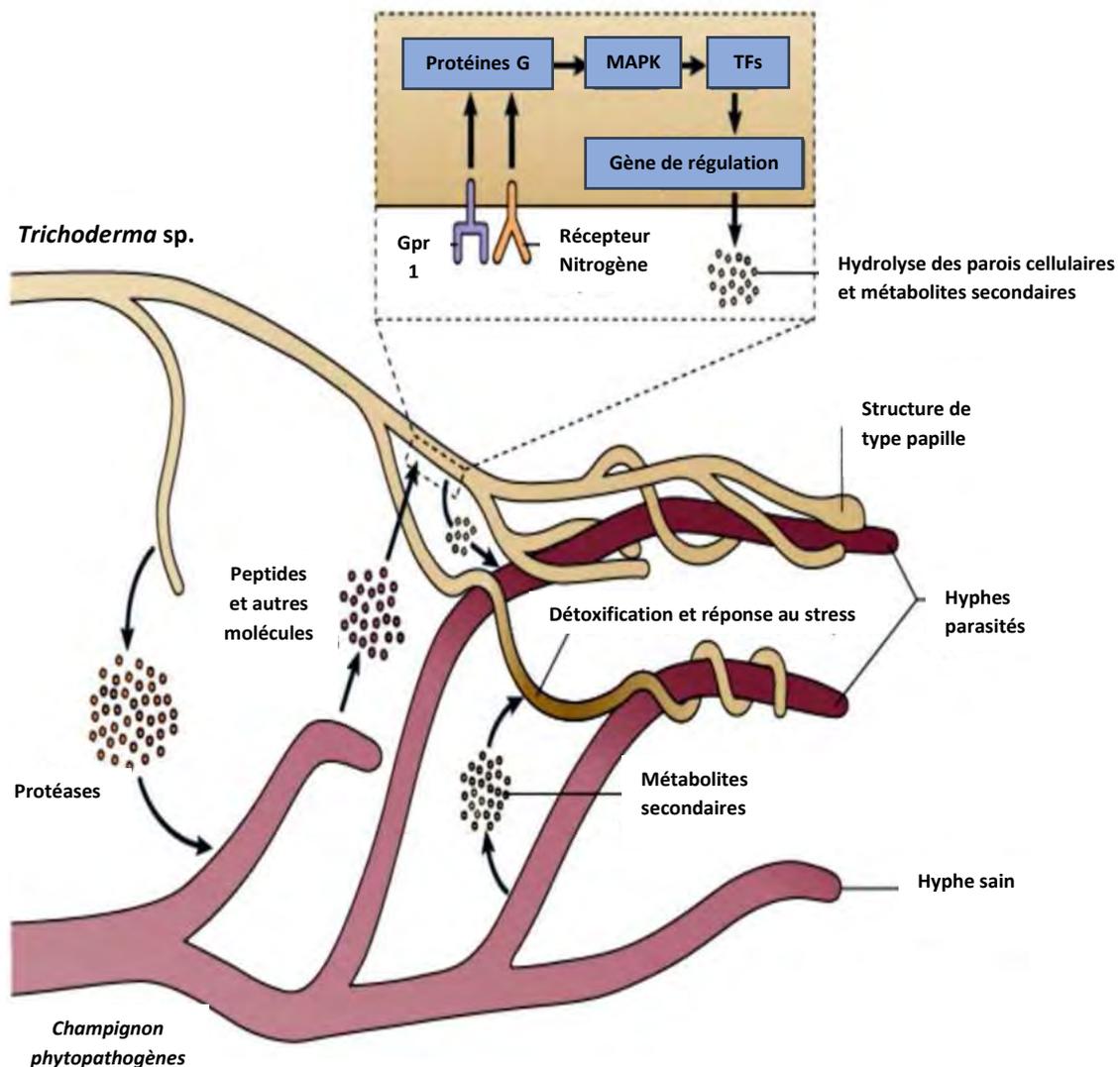


Fig. 6: Mécanisme du mycoparasitisme des *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011).

3.4.3 L'antibiose

Le genre *Trichoderma* est connu pour son effet inhibiteur voire létal sur une large gamme de champignons phytopathogènes en produisant plusieurs types de métabolites secondaires. Plus de 1000 composés peuvent être produits par ce genre de champignon (Vinale et al., 2008, Hermosa et al., 2014). Ces composés peuvent être classés en trois catégories : les composés organiques volatils (VOCs), des composés diffusibles (enzymes et des antibiotiques extracellulaires) et des peptaïboles (polypeptides) (Gupta et al., 2014).

Il faut noter que la synthèse de ces substances dépend essentiellement de l'espèce et des fois même de la souche, c'est-à-dire tout le répertoire ne sera pas biosynthétisé par une même espèce et/ou souche. La présence du pathogène ou de ces métabolites secondaires conduit à la

synthèse de certains métabolites et à l'inhibition de la synthèse d'autres métabolites. Les facteurs environnementaux et le type de plante jouent un rôle important dans le type de composés à synthétiser par *Trichoderma* (Stoppacher et al., 2010).

3.4.4 Induction de la résistance chez les plantes

Dans leurs milieux naturels, *Trichoderma* spp. et d'autres microorganismes bénéfiques entourent les chevelures racinaires des plantes. L'induction d'une résistance systémique par *Trichoderma* a été signalée à la fois pour les monocotylédones et les dicotylédones (Harman et al., 2004). Les systèmes par lesquels les plantes perçoivent et détectent ces microorganismes pourraient impliquer un ensemble de processus hautement coordonnés, par le biais des mécanismes cellulaires qui déterminent la réponse correcte pour distinguer les différentes relations plante-microbe, c'est-à-dire : parasitisme, mutualismes et symbiose (Pozo et al., 2005) (**Fig. 7**).

Pour contrer un pathogène, les plantes activent un large éventail de défenses biochimiques et moléculaires : Les réponses des plantes à un microorganisme comprennent la production de ROS, la mort cellulaire programmée lors de la réponse hypersensible (HR), la synthèse de métabolites secondaires à activité antimicrobienne (phytoalexines), l'épaississement de la paroi cellulaire par dépôt de lignine et l'activation de protéines liées à la pathogenèse (Van Loon, 2007).

Le déclenchement de la résistance systémique chez les plantes n'est pas exclusif aux agents pathogènes. L'interaction des plantes avec des microorganismes non pathogènes peut également induire une résistance systémique. La colonisation de la rhizosphère par des microorganismes favorise la croissance des plantes, et également l'induction d'une résistance systémique (Van Loon, 2007) (**Fig. 7**).

La résistance systémique induite (ISR) déclenchée par les *Trichoderma* spp. reste très peu connue (Luo et al., 2010). Cependant, plusieurs études ont démontré que, lorsque les plants ont été traités avec des souches de *Trichoderma*, une large gamme de contraintes biotiques et abiotiques a été atténuée (Mastouri et al., 2010 ; Vadassery et al., 2009). En revanche, le sol inoculé avec *T. harzianum* T39 a permis aux feuilles des plants de l'haricots d'être plus résistantes contre *B. cinerea* et *Colletotrichum lindemuthianum*, même si T39 était localisé uniquement dans les racines (Bigirimana et al., 1997).

De plus, *Trichoderma* induit également l'expression de gènes liés à la pathogenèse (PR) dont la réponse est médiée par l'acide salicylique (SA). Cette réponse est connue sous le nom de résistance systémique acquise (SAR), qui est également déclenchée par des agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes (Shoresh et al., 2010 ; Harman et al., 2012).

3.4.5 Stimulation de la croissance des plantes

La présence de *Trichoderma* au niveau de la rhizosphère des plantes peut être bénéfique. Les mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par *Trichoderma* comprennent des interactions avec les racines des plantes similaires aux mycorhizes, dans lesquelles *Trichoderma* pénètre et colonise les tissus racinaires sans susciter de réponses de défense spécifiques contre la souche colonisatrice (Yedidia et al., 1999 ; Harman et al., 2004). La stimulation de la croissance des plantes par *Trichoderma* est mise en évidence par l'augmentation de la biomasse, de la productivité, de la résistance au stress et de l'absorption accrue des nutriments et aussi l'amélioration de l'efficacité photosynthétique et activité respiratoire en reprogrammant l'expression des plantes (Shoresh et al., 2010) (**Fig. 7**).

Plusieurs études ont rapporté que le traitement des plants par des souches de *Trichoderma* avait montré une augmentation de la productivité chez un large éventail d'espèces. Ceci s'est manifesté par une accélération de la germination, une augmentation de la vigueur des plantules, une protection vis-à-vis des contraintes de refroidissement et du réchauffement en induisant une protection physiologique et enfin elles fournissent une tolérance au stress salin (Mastouri et al., 2010 ; De Souza et al., 2008 ; Yedidia et al., 2000).

Altomare et al. (1999) ont découvert que la souche T22 de *T. afroharzianum* pouvait produire des formes solubles de manganèse, de zinc métallique et de phosphate de calcium *in vitro*, et également que le champignon produisait des métabolites qui réduisaient le fer ferrique en forme ferreuse facilement assimilable par les plantes. Selon ces chercheurs, la conversion des oxydes métalliques en formes solubles par *Trichoderma* spp. implique la chélation et la réaction de réduction, les deux mécanismes étant également impliqués dans le contrôle des agents phytopathogènes et des composants de la stimulation de la croissance et du contrôle biologique (Anusuya et Jayarajan, 1998; Harman et al., 2005 ; Harman, 2006; Woo et al., 2006).

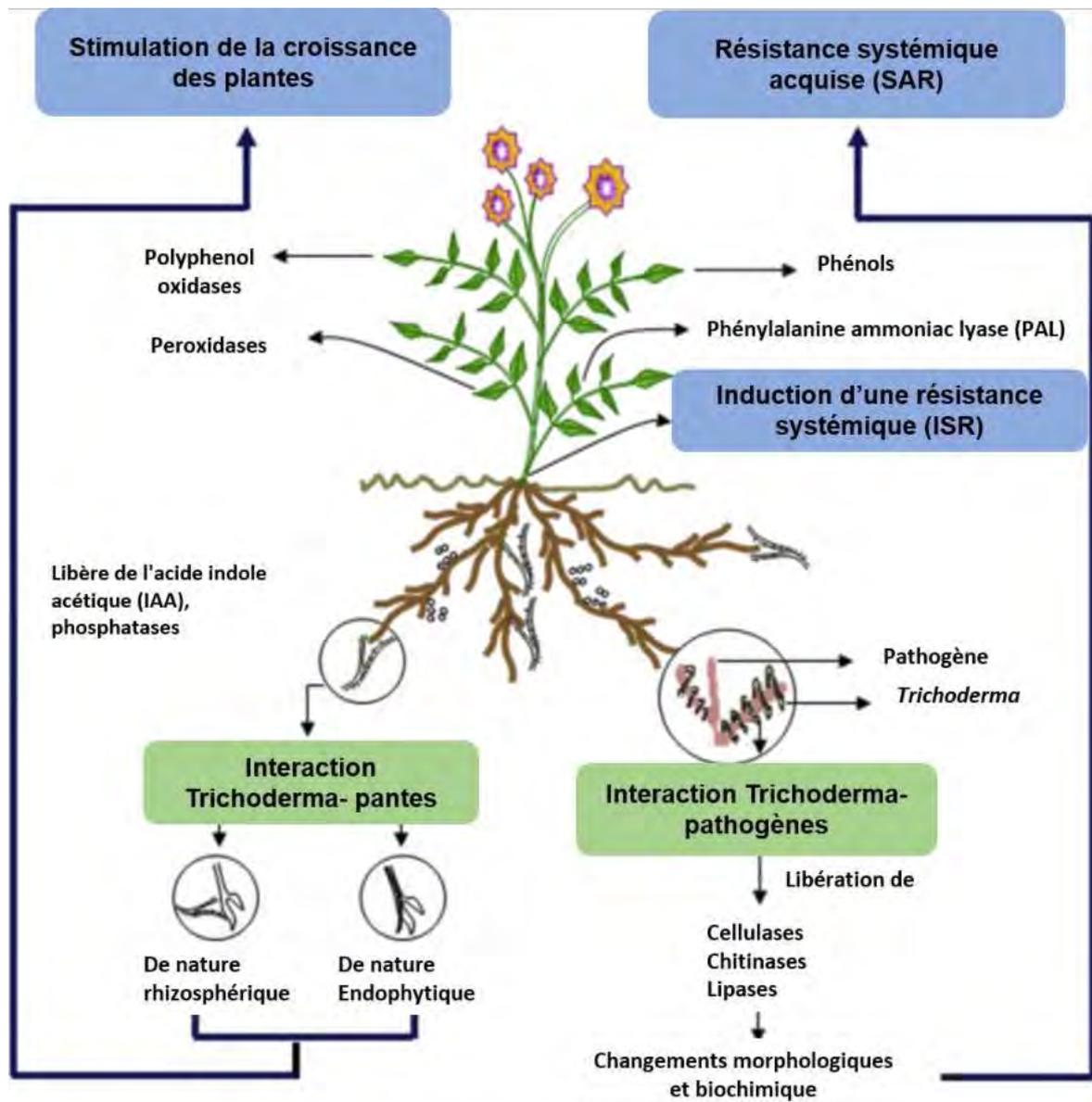


Fig. 7: Induction de la résistance et stimulation de la croissance des plantes par *Trichoderma* spp. (Singh et al., 2014).

3.5 La pathogénicité du genre *Trichoderma*

3.5.1 Pathogénicité sur les champignons cultivés (ex : *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*)

La maladie de la pourriture verte, causée par les espèces de *Trichoderma* est un problème majeur pour les producteurs de champignons comestibles du monde entier. La première épidémie de moisissure verte a été signalée en Irlande du Nord en 1985. Dans le début des années 1990, une maladie similaire est apparue chez les champignons de couches aux États-Unis et au Canada. Les biotypes agressifs ont été identifiés comme *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* (Th2) et *T. aggressivum* f. sp. *aggressivum* (Th4) (Hatvani et al., 2007).

3.5.2 Pathogénicité sur l'Homme

Les espèces de *Trichoderma* sont abondantes dans différents habitats agricoles, mais certains représentants de ce genre, principalement des membres du clade de Longibrachiatum, sont également en train de devenir des agents responsables de diverses maladies humaines avec des conséquences même fatales (Hatvani et al., 2019). Elles peuvent causer des infections opportunistes chez les humains immunodéprimés (ceux qui sont atteints de VIH, de leucémie ou ceux qui suivent une chimiothérapie anticancéreuse) et aussi des allergies pour l'homme (Thrane et al., 2001 ; Kredics et al., 2003 ; Hatvani et al., 2019).

3.6 Les espèces de *Trichoderma* utilisées contre *Botrytis cinerea*

Depuis 1970, différentes espèces de *Trichoderma spp.* ont été étudiées pour le contrôle de *B. cinerea* sur le haricot (Nelson et Powelson, 1988), vigne (Latorre et al., 1997), fraise (Tronsmo et Dennis, 1977) et diverses cultures sous abris (Elad et al., 1995). L'effet de trois espèces de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* et *T. longibrachiatum*) sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* a été démontré par Bendahmane et al., 2012. Les principales espèces de *Trichoderma* utilisées dans la lutte biologique contre le *Botrytis cinerea* sont : *Trichoderma atroviride* ; *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* (Elmer et Reglinski, 2006).

Matériel et Méthodes

4 Matériel et Méthodes

4.1 Matériel Biologique

4.1.1 Prospection et échantillonnage (*Botrytis cinerea*)

Les prospections ont été effectuées durant deux années successives 2016 et 2017, elles ont ciblé 5 espèces de plante à savoir : la vigne (*Vitis vinifera* L.), le fraisier (*Fragaria vesca* L.), la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la courgette (*Cucurbita pepo* L.) et la fève (*Vicia faba* L.). Des échantillons ont été prélevés à partir des organes présentant des symptômes typiques de la maladie de la pourriture grise et à partir de 7 wilayas (Alger, Boumerdès, Biskra, Tizi Ouzou, Bejaia, El Oued, Tipaza) (Fig. 8).



Fig. 8 : Symptômes typiques de la maladie due à *Botrytis cinerea*.

A-G : Symptôme sur les différents organes de la tomate ; H & I : Symptômes sur fraise ; J : Tache chocolat sur feuille de fève ; K & O : Sclérotés sur feuille de vigne ; L & M : Attaques sur courgette ; N : Fructification (sporulation) sur feuille de vigne.

4.1.2 Isolement de l'agent phytopathogène (*B. cinerea*)

Après l'échantillonnage, les fragments symptomatiques des différents organes des plantes hôtes ont été découpés en fragments d'environ 1 cm de longueur et de largeur, ensuite désinfectés à l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 min. Après rinçage à l'eau distillée stérile dans 3 bains successifs pendant 3 min, ils ont été déposés soit dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA ou bien en chambre humide. Ainsi, Les boîtes sont mises à incuber sous une lumière blanche continue à une température de 20 ± 2 °C. Après, 7 à 10 jours d'incubation, des observations microscopiques ont été préparées et les isolats présentant des structures de fructification de *Botrytis* ont été repiqués. L'**annexe 01** indique l'origine de 73 isolats de *B. cinerea* étudiés.

4.1.3 *Trichoderma* spp.

4.1.3.1 Echantillonnage et isolement

L'échantillonnage a été réalisé durant les années 2017 et 2018. A l'aide d'une tarière, du sol rhizosphérique a été prélevé à une profondeur de 20 à 40 cm au niveau des parcelles agricoles dans quelques wilayas du nord-centre de l'Algérie (Tipaza, Boumerdès, Alger).

Les isolats du genre *Trichoderma* ont été isolés à partir de la rhizosphère des plants vigoureux et d'apparence saine de la tomate, du fraisier et de la vigne, et à partir d'un bio-composte commercialisé en Algérie (Bio-composte®). La technique utilisée est celle décrite par Rapilly (1968). Elle consiste à mettre 10 g de terre ou de composte séchés et broyés dans 90 ml d'eau distillée stérile. Les suspensions ont été homogénéisées par agitation à l'aide d'un agitateur de tube. Ensuite une série de dilutions est effectuée jusqu'à la dilution 10^{-9} (1v/9v). 1 ml de chaque dilution a été ensemencé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) avec 0.05 g/l de streptomycine afin d'inhiber la croissance bactérienne. Après 8 à 10 jours d'incubation à 22 ± 1 °C, les colonies présentant des structures de fructifications de *Trichoderma* (sous microscopie optique : conidies, conidiophores, phialides) sont repiquées dans des boîtes de Pétri contenant du PDA. Le **tableau** ci-dessous indique l'origine des isolats de *Trichoderma* spp.

Tableau 6 : Origine des isolats de *Trichoderma* spp.

Code	Année d'isolement	Source, plante hôte	Région
TBS1	2018	Rhizosphère, fraisier	Tipaza
TAS2	2018	Rhizosphère, fraisier	Tipaza
TAS4	2018	Rhizosphère, fraisier	Tipaza
TAS5	2018	Rhizosphère, fraisier	Tipaza

TLS6	2018	Rhizosphère, fraisier	Tipaza
TGS7	2017	Rhizosphère, tomate	Alger
TAS8	2017	Rhizosphère, tomate	Alger
TGS10	2017	Rhizosphère, tomate	Alger
TGS11	2017	Rhizosphère, vigne	Boumerdes
TGS13	2017	Rhizosphère, vigne	Boumerdes
TLC2	2018	Bio-composte®	Bejaia
TLC4	2018	Bio-composte®	Bejaia
TAtC11	2018	Bio-composte®	Bejaia
TLiC8	2018	Bio-composte®	Bejaia
TBeC1	2018	Bio-composte®	Bejaia

4.1.4 Matériel végétal

- a) Les plants et les semences de tomate de la variété Kawa ont été utilisés pour le test de biostimulation et de bioprotection *in vivo* et *in situ*.
- b) Les pommes de la variété Golden Delicious ont été utilisées pour l'étude du pouvoir pathogène des isolats de *B. cinerea*.

4.1.5 Milieux de cultures utilisés

4.1.5.1 Milieu de culture solide

Les milieux de culture organiques Malt-Agar, PDA (Potato Dextrose Agar) et SNA (Special Nutrient Agar) ont été utilisés pour l'isolement, la mise en culture des champignons, la conservation et pour la réalisation des différents tests *in vitro*. Le milieu minéral MS (milieu synthétique) a été utilisé lors des tests *in vitro* pour l'étude de l'effet des métabolites secondaires de *Trichoderma* spp. sur la germination des semences de tomate. La composition des milieux utilisés est en **annexe 02**.

4.1.5.2 Milieu de culture liquide

Le milieu de culture liquide, PDB (Potato Dextrose Broth) a été utilisé pour la mise en culture des *Trichoderma* spp. afin de pouvoir récupérer les métabolites secondaires solubles (**annexe 02**).

4.1.6 Purification et conservation des cultures fongiques

- a) **Repiquages successifs** : Dès l'apparition des jeunes colonies ayant les caractéristiques du champignon recherché, des repiquages successifs sont effectués au niveau de la zone en

pleine croissance du champignon pour la purification des cultures fongiques de tout type de contamination (fongique et/ou bactérienne).

b) Purification par culture de monospore : Des suspensions dont la concentration est de 10^2 spores/ml sont préparées à partir des explants mycéliens âgés de 8 à 10 jours. 100 μ l sont prélevés de chaque suspension et étalés à la surface des boîtes de Pétri stérile contenant de l'eau gélosée préalablement coulée sur une lame stérile. Après 24 h d'incubation, les spores commencent à émettre des tubes germinatifs, le prélèvement est effectué sous une loupe binoculaire à l'aide d'une pipette pasteur étirée. Ainsi, des spores ont été prélevées séparément puis repiquées en boîtes de Pétri contenant du milieu PDA.

c) Conservation : Les cultures fongiques sont conservées en boîtes de Pétri et les tubes inclinés pour les manipulations courantes à une température de 4 °C, et en disque mycéliens desséchés dans des tubes Eppendorf pour une conservation d'une moyenne durée à une température de -20 °C.

4.2 Etudes des isolats de *Botrytis cinerea*

4.2.1 Identification morphologique et culturelle des isolats du genre *Botrytis*

4.2.1.1 Aspect des colonies

Les isolats de *B. cinerea* sont cultivés sur milieu Malt-Agar à raison de 4 répétitions par isolats, ces boîtes sont incubées à 20 ± 2 °C pendant 30 jours. L'aspect des cultures porte sur l'observation de la couleur et de l'aspect du mycélium.

4.2.1.2 Formes et mensurations des conidies

La forme et la mensuration des conidies ont été réalisées uniquement sur les isolats isolés à partir des cultures de fèves, et qui a pour objectif d'appui l'identification morphologique des isolats (BCF01, BCF02, BCF03, BCF04, BCF05, BCF06 et BCF07). Elles ont été réalisées sur 50 conidies / isolat, issues de culture âgée de 7 à 10 jours (incubées à 20 ± 2 °C, à lumière blanche continue).

4.2.1.3 Description des sclérotés

4.2.1.3.1 Estimation du temps nécessaire à l'apparition des sclérotés :

L'étude est réalisée sur tous les isolats cultivés sur milieu PDA. Cette technique consiste à estimer la présence ou l'absence de sclérotés pour chaque isolat, ainsi que le temps nécessaire pour l'apparition du premier sclérote à partir du premier jour d'ensemencement de la boîte.

4.2.1.3.2 Détermination de la densité et la taille des sclérotés :

L'estimation de la densité des sclérotés est réalisée uniquement sur les isolats de type sclérotiens. Le nombre de sclérotés à la surface de la boîte est comptabilisé, le résultat est

divisé sur la surface de la boîte de Pétri. Ainsi, elle est exprimée en nombre de sclérotés/cm². La taille des sclérotés est basée sur la longueur et largeur de chaque sclérote, elle est exprimée en intervalle (plus petite mesure – plus grande mesure) et en mm. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque isolat.

4.2.1.4 Détermination des morphotypes

Cette technique consiste à classer morphologiquement les isolats du genre *Botrytis* en deux principaux types, le premier était le type Mycélien caractérisé par l'absence totale de sclérotés, il est représenté par les types (M1, M2, M3 et M4). Le second était le type Sclérotien, les colonies appartenant à ce type morphologique produisent fréquemment des sclérotés, il est représenté par les types (S1, S2, S3, S4). Un cinquième type Sclérotien (S5) a été identifié et décrit par Kuzmanovska et *al.* (2012).

Les isolats de *B. cinerea* ont été cultivés à raison de quatre répétitions sur milieu Malt-Agar à 20 ± 2 et à l'obscurité pendant 30 jours. Les morphotypes ont été déterminés en se basant sur : l'aspect des colonies, la disposition des sclérotés, la taille et le nombre de sclérotés.

4.2.2 La vitesse de la croissance mycélienne

La mesure de la croissance linéaire consiste à prélever un explant de 8 mm de diamètre à partir d'une culture âgée de 5 à 7 jours et le déposer sur une boîte de Pétri à raison de quatre répétitions par isolat (Kaiser, 1973). Les boîtes sont mises en incubation pendant 5 jours à une température de 20 ± 2 °C. Les mesures des deux diamètres opposés des colonies se font quotidiennement. Le test est arrêté quand le premier isolat atteint la périphérie de la boîte de Pétri (après 5 jours d'incubation). La croissance linéaire de chaque isolat est calculée selon la formule proposée par Rapilly (1968).

$$L = (D-d)$$

L : Croissance linéaire ;

D : Moyenne des deux diamètres opposés de la colonie ;

d : Diamètre de l'explant.

De plus la vitesse moyenne de croissance mycélienne au bout de 5 jours peut être estimée selon la formule suivante :

$$V_m = L / nJ$$

V_m : Vitesse moyenne ;

nJ : nombre de jours d'incubation ;

La vitesse moyenne de la croissance mycélienne (V_m) est exprimée en mm/jours.

4.2.3 Etude du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des isolats de *B. cinerea* a été réalisé sur des demi-pommes de la variété Golden Delicious, la surface des pommes a été stérilisée à l'aide de l'éthanol à 70° ensuite découpée en deux. Trois perforations ont été réalisées à l'aide d'un emporte-pièce de 8 cm de diamètre. La chair de pomme est remplacée par des disques mycéliens du pathogènes d'un même diamètre, plaçant la partie mycélienne du disque au contact avec la chair de pomme. Les demi-pommes inoculées ont été mises en incubation à une température de 20 ± 2 °C pendant 3 jours. Trois répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque isolat testé. Ainsi, l'interprétation des résultats est faite par mensuration des deux diamètres opposés des nécroses (**Fig. 9**).

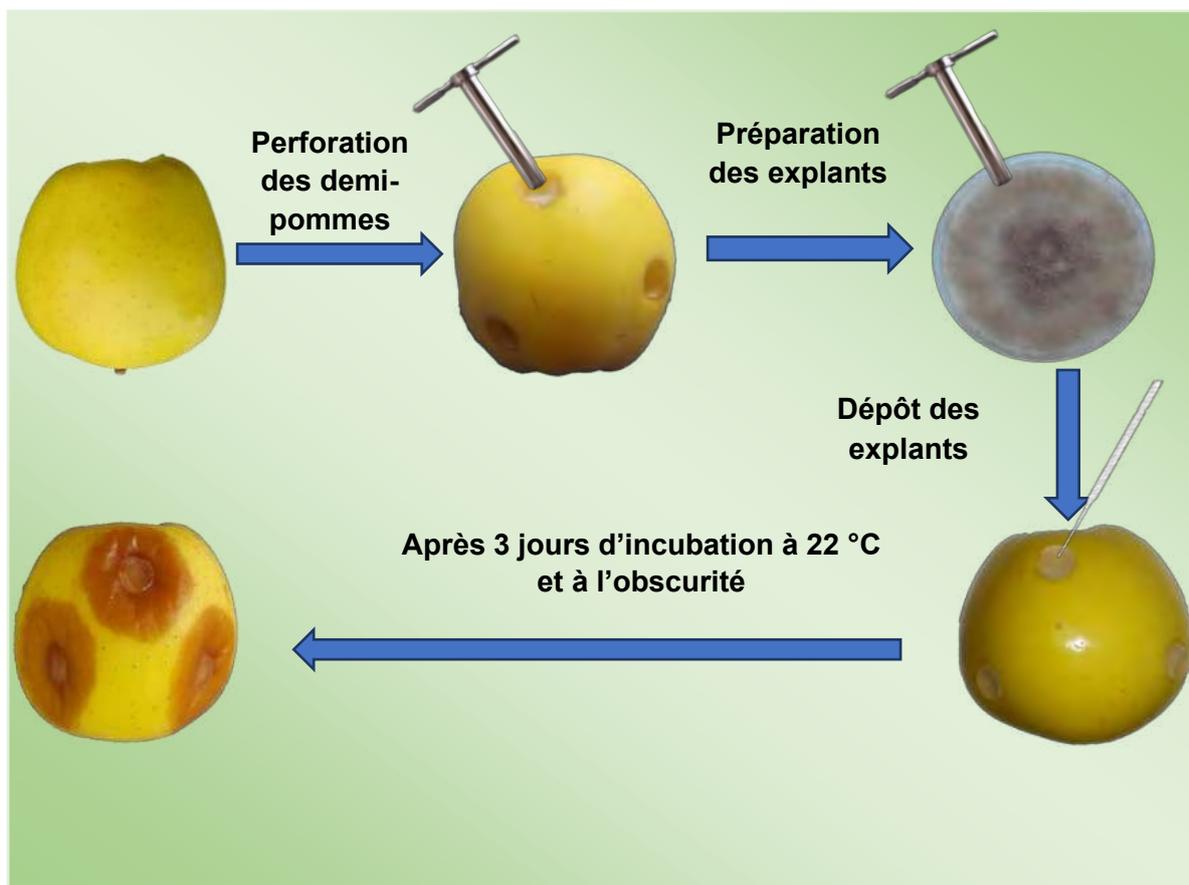


Fig. 9 : Etude du pouvoir pathogène des isolats de *B. cinerea* sur des demi-pommes (Schuepp & Kueng, 1978).

4.2.4 Sensibilité au Fenhexamide

L'étude de l'effet de la matière active fenhexamide (fongicide) sur la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* a été évaluée *in vitro*. La technique utilisée est celle de Wang et al. (1986). Elle consiste à incorporer la dose du fongicide dans le milieu de culture PDA maintenu en surfusion dans un bain marie à 45 °C puis le coulé dans des boites de Pétri.

Après refroidissement, des explants de 8 mm de diamètre sont prélevés à partir des cultures âgées de 4 à 5 jours et déposés dans chaque boîte de Pétri contenant les différentes doses du fongicide. Quatre répétitions sont réalisées pour chaque isolat ainsi que pour les témoins sans fongicide. Les boîtes sont incubées à 20 ± 2 °C et à l'obscurité pendant 4 jours. Le **tableau 7** représente les quatre doses de fenhexamide étudiées.

Tableau 7 : Doses de fenhexamide utilisées pour l'étude de la sensibilité des isolats de *B. cinerea*.

Dose	Concentration en matière active (µg/ml)
D1	0,01
D2	0,10
D3	1,00
D4	10,00

Les boîtes de Pétri sont quotidiennement observées et le test est arrêté lorsque le champignon atteint la périphérie des boîtes témoins. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante (Attrassi et al., 2007) :

$$I (\%) = \frac{DT - Dt}{DT} \times 100$$

I (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

DT : Diamètre des colonies témoins.

Dt : Diamètre des colonies traitées.

Les CI50 ont été déterminées à partir des équations de régressions linéaires données par les courbes Dose/Réponse correspondant aux pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (en ordonnées) en fonction des logarithmes des concentrations testées (en abscisses). Les facteurs de résistance ont été estimés selon la méthode proposée par Leroux et al. (2002) : Facteur de résistance = CI50 de l'isolat testé / CI50 de l'isolat sensible.

4.3 Etudes des isolats de *Trichoderma* spp.

4.3.1 Identification morphologique des isolats de *Trichoderma* spp.

L'identification morphologique a été réalisée sur les 15 isolats obtenus à partir de la rhizosphère des cultures de tomate, fraisier et vigne et à partir du bio-composte. Les cultures des colonies fongiques ont été incubées à 25 °C sur milieux PDA pour les observations macroscopiques et sur milieu SNA pour les observations microscopiques.

Les caractéristiques phénotypiques, morphologiques et culturelles des colonies du genre *Trichoderma* ont été déterminées à partir des observations macroscopiques (aspects et couleurs des colonies, pigmentations diffusées dans le milieu de culture) réalisées sur des cultures âgées de 7 à 10 jours et les observations microscopiques réalisées sur des cultures âgées de 3 à 7 jours, qui portent essentiellement sur : la ramification des conidiophores, la forme des phialides et la forme, la couleur et la taille des conidies.

L'identification morphologique des espèces de *Trichoderma* est basée sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques telles qu'elles sont décrites par Rifai (1969), Bissett (1984, 1991).

4.3.2 Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp.

Des explants mycéliens de 8 mm de diamètre des isolats de *Trichoderma* spp. ont été prélevés à partir de cultures âgées de 5 à 7 jours et déposés au centre des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA, à raison de quatre répétitions pour chaque isolat et pour chaque température étudiée. Les boîtes de Pétri ont été mises en incubation. Neuf différentes températures ont été testées (5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C). La mesure des deux diamètres opposés des colonies a été effectuée chaque 24 h, pendant les quatre jours d'incubation (Samuels *et al.*, 2002).

4.3.3 Identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* spp.

4.3.3.1 Extraction d'ADN

L'ADN génomique des 15 isolats de *Trichoderma* spp. a été extrait à partir des cultures de mycélium âgées de 7 à 10 jours, cultivées sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) selon le protocole de Goodwin & Lee (1993) décrit dans l'**annexe 03** :

4.3.3.2 PCR et séquençage

Les Amplifications PCR ont été effectuées sur la base de 4 régions génomiques : i. Un fragment d'environ 0,6 kb du internal transcribed spacer (ITS) a été amplifié à l'aide des amorces ITS1 et

ITS4 (White et al., 1990). ii. Un fragment d'environ 1,2 kb du Translation elongation factor 1 α (*tef1*) a été amplifiée en utilisant la paire d'amorces EF1-728F (Carbone & Kohn, 1999) et TEF1LLErev (Jaklitsch et al., 2005). iii. Un fragment d'environ 1,1 kb d'ARN polymérase II sous-unité B (*rpb2*) a été amplifié avec la paire d'amorces fRPB2-5f et fRPB2-7cr (Liu et al., 1999). iv. Un fragment de 0,9 kb de la plus grande sous-unité de citrate lyase ATP (*acl1*) a été amplifié avec les amorces acl1-230up et acl1-1220low (Gräfenhan et al., 2011). La solution de mixture est préparée avec Go Taq® Flexi, elle contient 0.5 μ l de chaque amorce (20 μ mol), 1.5 μ l de la solution MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l de dNTP (0.2 mM chaque dNTP), 5 μ l de 5X Green Go Taq® Flexi Buffer, 15.9 μ l d'eau distillé, 0.1 μ l de Taq DNA polymerase (5 unités / μ l) et 1 μ l de la suspension ADN pour un volume total de 25 μ l.

Le programme PCR pour ITS et *tef1* gène commence par une phase de dénaturation initiale à 95 °C pendant 3 min, suivi par 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 s ; une hybridation à 58 °C pendant 30 s, une extension à 72 °C pendant 1 min, une phase d'élongations finale de 10 min à 72 °C et enfin le produit PCR est conservé à 4 °C. Pour les gènes *rpb2* et *acl1* la température d'hybridation a été modifiée pour les deux à 55 °C. Le séquençage a été effectué avec les mêmes amorces utilisées pour l'amplification (**tableau 8**).

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées.

Gène	Nom de l'amorce	Séquences
ITS	ITS1	5'-TCGGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
<i>acl1</i>	acl1-230up	5'-AGCCCGATCAGCTCATCAAG-3'
	acl1-1220low	5'-CCTGGCAGCAAGATCVAGGAAGT-3'
<i>tef1</i>	EF1-728f	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'
	TEF1LLErev	5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3'
<i>rpb2</i>	fRPB2-5f	5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3'
	fRPB2-7cr	5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3'

4.3.3.3 Comparaison nucléotidique et analyse des séquences

Pour l'identification des isolats de *Trichoderma*, les séquences ITS ont été soumises à TrichOKey (Druzhinina et al., 2005) et l'algorithme Blast du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les séquences *tef1* et *rpb2* à TrichoBLAST (Kopchinskiy et al., 2005) de l'international Subcommittee on *Trichoderma* et *Hypocrea* Taxonomy (ISTH) et à l'algorithme Blast du NCBI. Par contre, les séquences *acl1* ont été soumises uniquement à l'algorithme Blast du NCBI. Les quatre marqueurs (ITS, *acl1*, *rpb2*, *tef1*) séquencés ont été analysés indépendamment par une étude phylogénétique.

Les séquences obtenues lors de ce travail et les séquences des souches de référence décrite par Bissett et *al.* (2015), Jaklitsch et *al.* (2015), Chaverri et *al.* (2015), Samuels et *al.* (2012) et Degenkolb et *al.* (2008) récupérées à partir de la plateforme GenBank ont été utilisées pour la réalisation de l'étude phylogénétique. Les séquences des quatre gènes ont été alignées en utilisant ClustalW et analysées avec le logiciel MEGA 7.0.14 (Kumar et *al.*, 2016). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant Kimura 2-parameter distance model (Saitou et Nei, 1987).

4.4 Etude *in vitro* de l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. vis-à-vis des isolats de *Botrytis cinerea*

La méthode consiste à confronter directement et indirectement, en boîte de Pétri, les isolats de *Trichoderma* spp. à trois (03) isolats de *Botrytis cinerea* sélectionnés sur la base de leurs virulence élevée et leurs résistance aux Fenhexamides.

4.4.1 Confrontation directe

La technique utilisée est celle décrite par Benhamou et *al.* (1996). Elle consiste à mettre en confrontation dans une même boîte de Pétri contenant du milieu PDA deux explants de 8 mm de diamètre de l'agent antagonistes (*Trichoderma* spp.) et l'agent pathogène (*B. cinerea*) les explants sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile à partir de culture âgée de 5 à 7 jours. Les deux explants de l'agent pathogène et de l'agent antagonistes *Trichoderma* spp. sont placés en même temps suivant un axe diamétral, laissant une distance de 5 cm entre eux et environ 2 cm de la paroi de la boîte de Pétri. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque combinaison d'isolat *Trichoderma* spp. / isolat de *Botrytis cinerea*. Le témoin contient uniquement l'explant des isolats de *B. cinerea*. Ainsi, les boîtes ont été incubées à 25 °C et à l'obscurité pendant 5 jours (**Fig. 10**). Les notations des résultats d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* et leur envahissement par les souches de *Trichoderma* spp. ont été effectuées tous les jours.

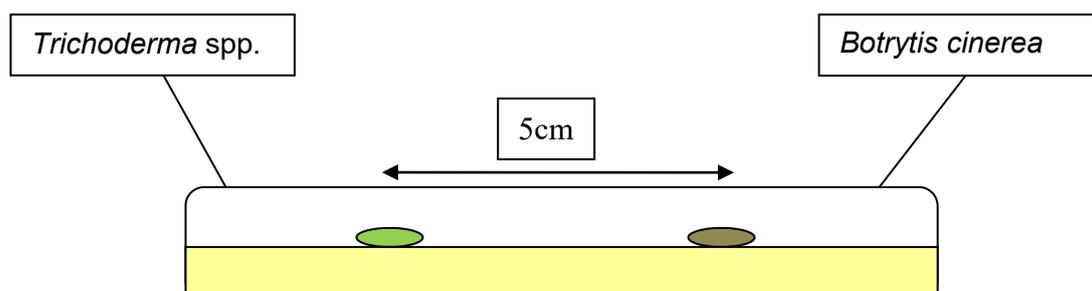


Fig. 10 : Schéma de la confrontation directe entre *Trichoderma* spp. et *B. cinerea* *in vitro* sur milieu PDA.

4.4.2 Confrontation indirecte

Cette méthode décrite par Olivier et Germain (1983), consiste à repiquer l'antagoniste et l'agent pathogène dans deux boîtes séparées contenant le milieu PDA, des explants de 8 mm de diamètre prélevés à partir des cultures âgées de 7 jours ont été déposés au centre de la boîte. Un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Trichoderma* spp. en bas et le *B. cinerea* en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par du parafilm afin d'éviter les pertes en substance volatiles. Le témoin est formé par superposition de deux boîtes. Celle du haut contenant l'agent pathogène sur milieu PDA et celle du bas contenant seulement du milieu PDA. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque combinaison. L'incubation est réalisée à 25 °C et à l'obscurité. La mesure des deux diamètres opposés des colonies de *B. cinerea* est réalisée après 4 Jours d'incubation (**Fig. 11**).

L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma* spp. vis-à-vis des isolats de *Botrytis cinerea* dans les deux méthodes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule décrite par Hmouni et *al.* (1996).

$$I (\%) = 1 - \left(\frac{Cn}{C0} \right) \times 100$$

I (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne ;
Cn : Diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste (mm) ;
C0 : Diamètre moyen des colonies témoins (mm).

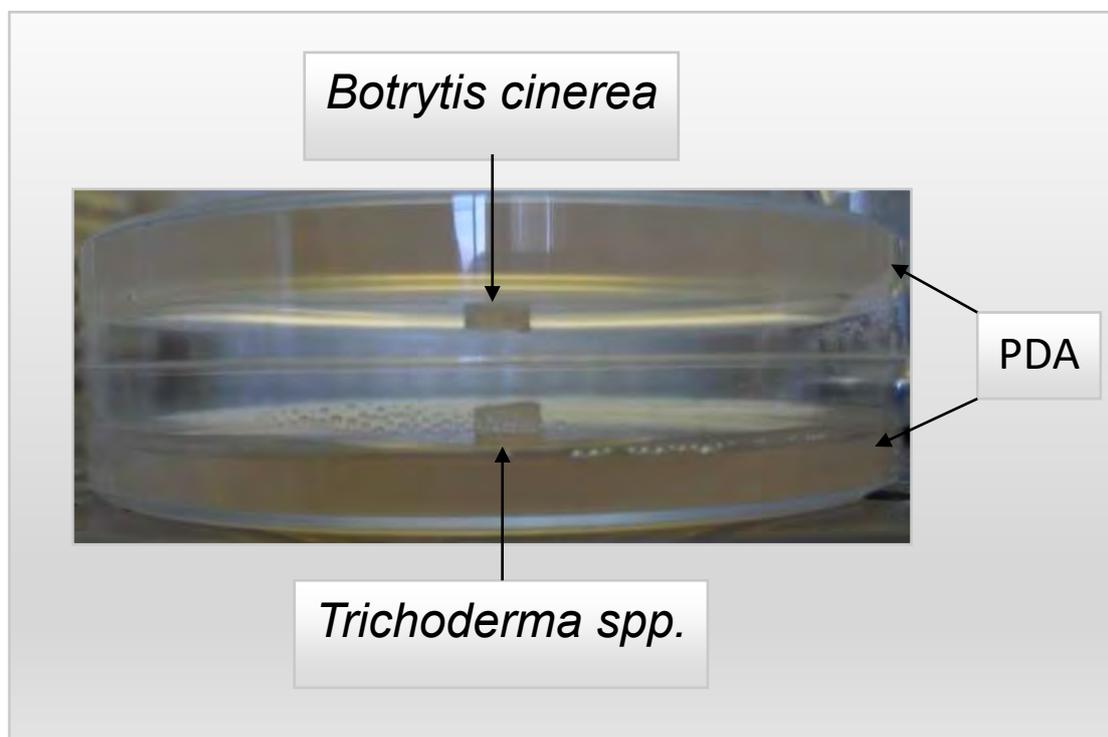


Fig. 11: Test de la confrontation indirecte entre *Trichoderma* spp. et *Botrytis cinerea* *in vitro*.

4.4.3 Etude de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma* spp. sur *Botrytis cinerea*

15 isolats de *Trichoderma* spp. ont été utilisés pour cette étude. La technique consiste à étudier l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de 3 Isolats de *B. cinerea* choisis parmi 73 isolats sur la base de leurs pouvoirs pathogènes élevés, leurs résistances au fenhexamide et isolés à partir de 3 différentes plantes hôtes (vigne, tomate et fraisier).

4.4.3.1 Préparation des filtrats de culture de *Trichoderma* spp.

10 explants mycéliens ont été prélevés sur des cultures âgées de 7 à 10 jours et cultivés dans 100 ml du milieu PDB dans un flacon de 250 ml de volume, à raison d'un explant par 10 ml de milieu, les flacons ont été incubés pendant 72 heures sous agitation continue à 28 °C. Les filtrats obtenus ont subi une double filtration, une première filtration par du papier filtre afin d'éliminer les éléments grossiers (mycélium) et une deuxième filtration par des membranes millipores de 0,20 µm de diamètre afin d'éliminer les spores. Les filtrats ont été conservés à 4 °C (Fig. 12).

4.4.3.2 Préparation de la suspension de spores de *Botrytis cinerea*

La suspension de spores a été préparée à partir des cultures âgées de 7 à 10 jours, des touffes mycéliennes sont prélevées et mises dans des tubes contenant 10 ml d'eau ultrapure stérile, une agitation est réalisée afin de libérer les spores ensuite filtrée afin d'éliminer le mycélium. À l'aide de la cellule de Malassez, la concentration est ajustée à 10⁶ spores/ml.

Mode opératoire :

A. Préparation des mélanges (filtrats de culture + milieu PDB + suspension de spores) :

Nous avons préparé le mélange pour 1 ml comme suit :

➤ Filtrats de cultures + agent pathogène :

- 800 µl de PDB
- 100 µl du filtrat de culture de *Trichoderma* spp.
- 100 µl de la suspension de spores de *Botrytis cinerea* à 10⁶ spores/ml

➤ Témoin naturel (négatif) :

- 800 µl de PDB
- 100 µl du filtrat de culture de *Trichoderma* spp.
- 100 µl d'eau ultrapure

➤ Témoin positif :

- 800 µl de PDB
- 100 µl de PDB
- 100 µl de la suspension de spores de *Botrytis cinerea* à 10⁶ spores/ml.

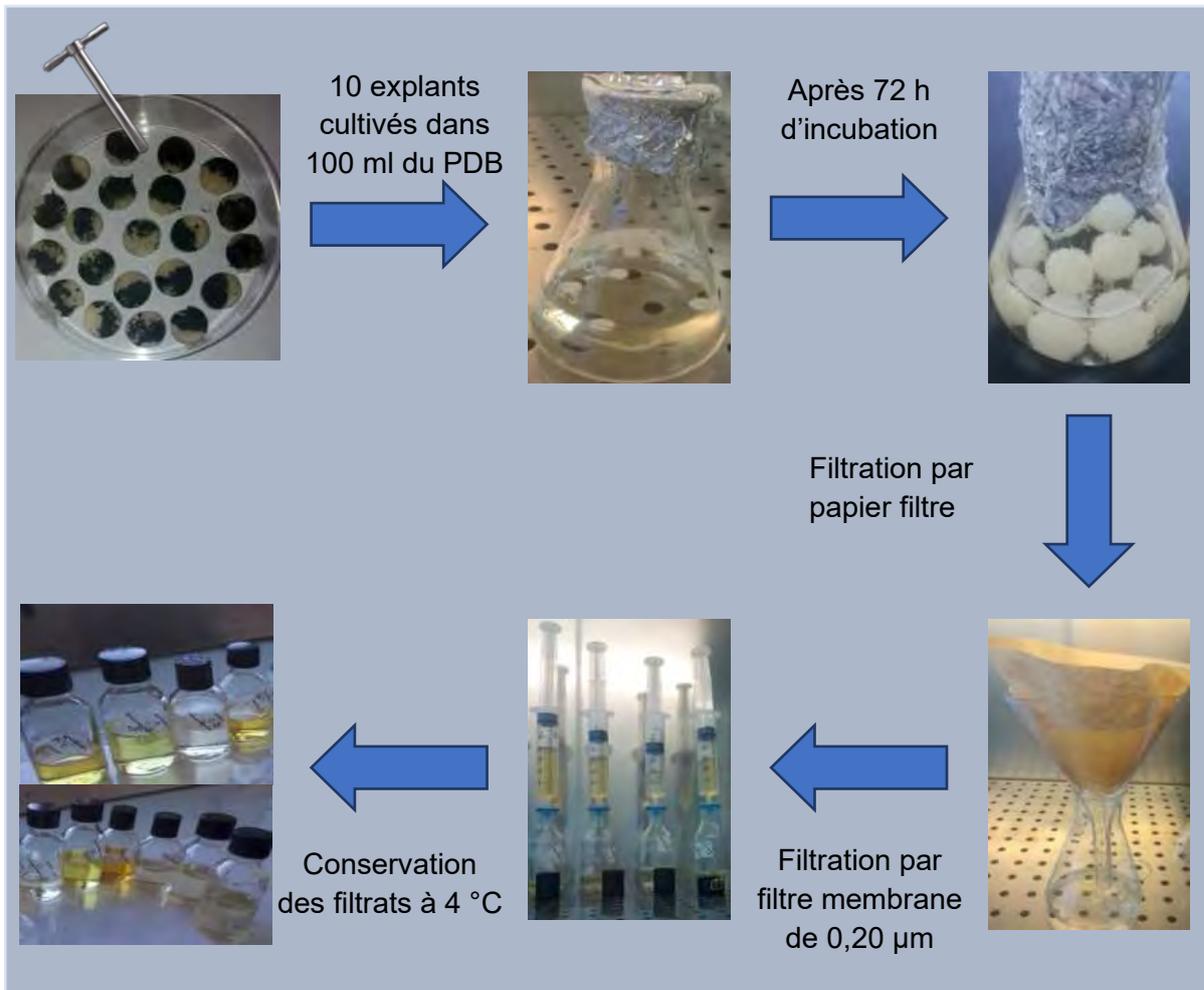


Fig. 12 Préparation des filtrats de culture de *Trichoderma* spp.

B. Préparation des plaques à 96 puits :

300 µl de chaque échantillon ont été répartie dans chaque puits avec trois répétitions techniques pour chaque échantillon dans une même plaque. Les plaques sont couvertes et scellés afin d'éviter le frottement plaque-couvercle et toute contamination éventuelle. Quatre répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque isolat de *B. cinerea* (**Fig. 13**).

C. Le mode opératoire : La plaque scellée est mise dans l'appareil de néphélométrie (Néphélostar®) à une température d'incubation de 25 °C. Une agitation des échantillons est faite chaque 5 minutes et une mesure est prise chaque 10 minutes. Après 33 heures d'incubation le test est arrêté et les données sont récupérées à l'aide du logiciel MARS. Le tableau de données est récupéré sous format Excel et les données sont analysées à l'aide d'un modèle de matrice Excel élaboré au niveau du laboratoire FungiSem. Ainsi, les pourcentages d'inhibition ont été calculés (**Fig. 13**).



Fig. 13: Etude de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma* spp. sur *B. cinerea* en utilisant la technique de la Néphélométrie.

4.5 Effet des isolats de *Trichoderma* sur la germination des graines et le développement des plantules de tomate :

4.5.1 Etude de l'effet des suspensions de spores de *Trichoderma* spp.

Protocole expérimental :

Les semences de tomate de la variété KAWA ont été désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 min suivi de 3 bains successifs de 3 min à l'eau distillée stérile. 100 graines ont été mises dans 10 ml de suspension de spores ($5 \cdot 10^6$ spores/ml) de chacun des isolats de *Trichoderma* spp. étudiés pendant 60 min. Les semences utilisées comme témoin ont été mises dans de l'eau distillée stérile pendant 60 min (You et *al.*, 2016). Après séchage des semences sur un papier wattman stérile, les graines sont mises en chambre humide dans des boîtes de Pétri en verre contenant trois couches de papier buvard humidifié régulièrement, les boîtes ont été incubées à une température de 22 °C, pendant 7 jours.

Notation des résultats

Après 7 jours d'incubation, le pourcentage de germination des semences de tomate a été calculé pour chaque traitement, ainsi que la mesure de la longueur de la racine et de l'hypocotyle des plantules pour chaque traitement, les mesures ont été prises sur 25 plantules. L'indice de vigueur (IV) est calculé selon la formule décrite par Abdul-Baki et Anderson en 1973.

$$IV = (R + H) \times G$$

Avec :

- R : La longueur de la radicule
- H : La longueur de l'hypocotyle
- G (%) : Pourcentage des graines germées qui se calcule par la formule suivante :

$$G\% = \frac{\text{nombre de graines germées}}{\text{nombre total des graines}}$$

4.5.2 Etudes de l'effet des filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp.

Protocole expérimental :

10 graines de tomate de la variété KAWA ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MS, sur chaque graine 10 µl du filtrat de *Trichoderma* spp. ont été déposés. 3 répétitions techniques et 3 répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque isolat de *Trichoderma* spp. avec un total de 9 boîtes (90 graines) par isolat. Les boîtes sont mises dans la chambre de culture 4 jours à l'obscurité et à une température de 23 ± 2 °C et 4 jours dans un incubateur à 25 °C et pendant 16 h lumière / 8 h obscurité (**Fig. 14**).

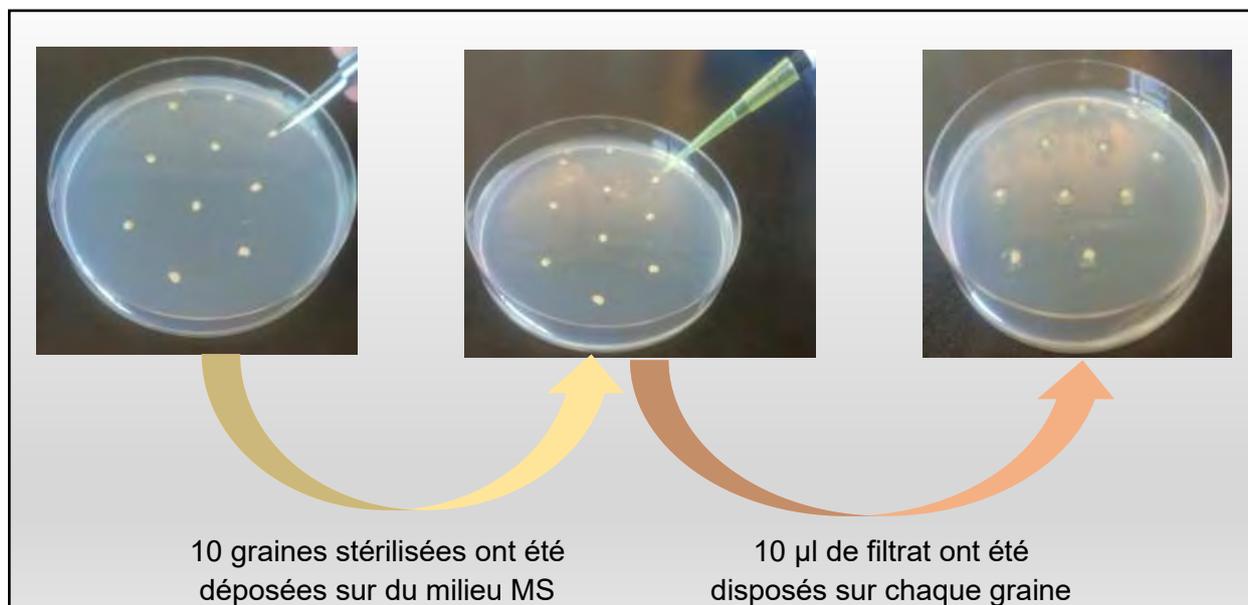


Fig. 14: Filtrats de culture de *Trichoderma* spp. sur les semences de tomate en milieu MS.

Notation des résultats

Le nombre de graines germées est compté à J2 et à J4 et les mesures des hypocotyles et des racicules faites à J8 à l'aide du logiciel ImageJ. L'indice de vigueur est calculé selon la formule décrite par Abdul-Baki et Anderson en 1973.

4.5.3 Etudes de l'effet des composés volatils (VOCs) des isolats de *Trichoderma* spp.

Protocole expérimental :

L'expérimentation est réalisée dans des boîtes hermétiques et transparentes (boîte VOCs), afin de conserver les composés volatils des *Trichoderma* spp. à l'intérieur des boîtes, et de permettre une exposition à la lumière. Les boîtes VOCs ont été préparées avec 8 boîtes par isolats de *Trichoderma* (couvercle fermé non scellé) et 2 boîtes de Pétri avec du milieu MS contenant 20 graines de tomates chacune (sans couvercle). Les boîtes sont mises dans la chambre de culture pendant 4 jours à l'obscurité et à une température de 23 ± 2 °C et 4 jours dans un incubateur à 25 °C et à 16 h lumière / 8 h obscurité. (Fig. 15).

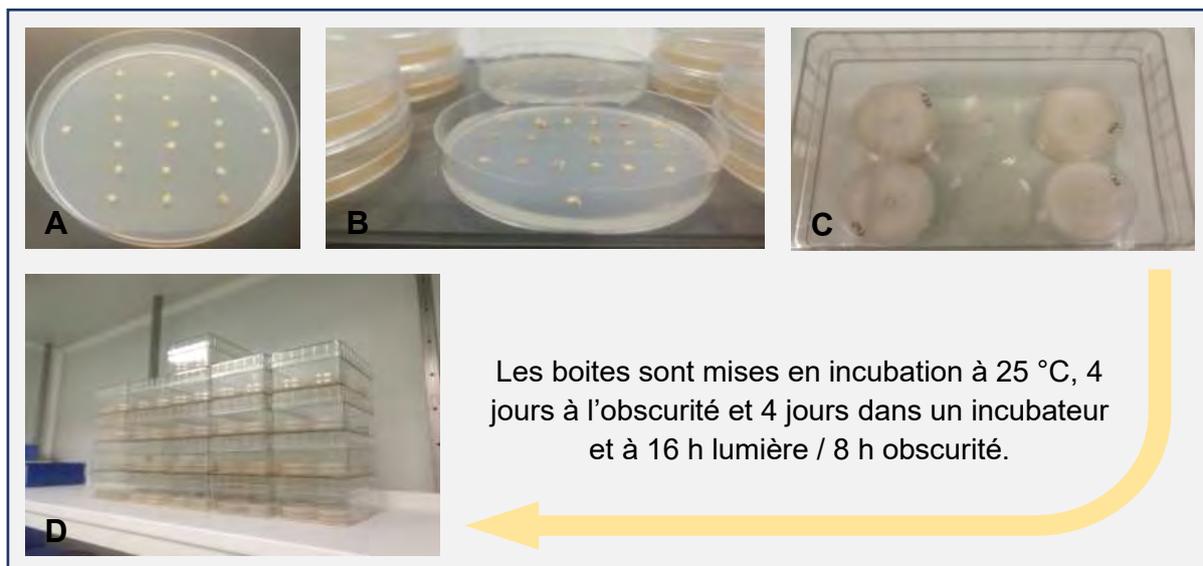


Fig. 15: Effet des composés volatils sur la germination des semences de tomate.

A & B : Semence de tomate sur milieu MS ; **C & D :** Cultures de *Trichoderma* et semences de tomate en Boîte VOCs.

Notation des résultats

Le nombre de graines germées est compté à J2 et à J4 et les mesures des hypocotyles et des racicules sont faites à J8 à l'aide du logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>). L'indice de vigueur est calculé selon la formule décrite par Abdul-Baki et Anderson en 1973.

4.6 Analyses statistiques

Pour évaluer l'effet biocontrôle des isolats de *Trichoderma* spp. sur le développement de *B. cinerea*, les données des tests *in vitro* et *in situ* ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) et les moyennes ont été comparées par le test de Tukey HSD ($P < 0.05$) en utilisant le logiciel R3.4.1 (<http://cran.r-project.org>).

4.7 Essai de biocontrôle *in vivo* sur plants de tomates (*in planta*)

Trois souches de *Trichoderma* (TBS1, TAtC11, TLiC8) ont été évaluées pour leur capacité à contrôler la maladie de la pourriture grise causée par l'isolat le plus virulent de *B. cinerea* (BCT04) *in vivo* sur des plants de tomate cv. « KAWA » âgés de 4 semaines. Les plants de tomates ont été cultivés en serre dans des pots de 12 cm de diamètre contenant un mélange de terreau commercial stérile, de sol stérile et de sable stérile (v/v/v).

Les tests ont été réalisés sur des plants âgés de 28 jours comme suit :

- Inoculation par une suspension de 10^5 spores/ml de *B. cinerea* suivit, après 24 h, d'une pulvérisation avec une suspension de 10^6 spores/ml de *Trichoderma* spp.
- Une pulvérisation avec une suspension de 10^6 spores/ml de *Trichoderma* spp. suivi, après 24 h, d'une inoculation par une suspension de 10^5 spores/ml de *B. cinerea*.
- Le témoin positif est réalisé uniquement par une inoculation par une suspension de 10^5 spores/ml de *B. cinerea*.

Environ 5 ml de suspension conidienne de *B. cinerea* et une même quantité pour la suspension de *Trichoderma* spp. ont été pulvérisées par plant. 10 plants ont été utilisés pour chaque combinaison *B. cinerea* / *Trichoderma* spp. et pour le témoin positif. L'expérience a duré 1 semaine et a été menée trois fois avec des résultats similaires (**Fig. 16**).

Les folioles de tomates ont été notées individuellement en utilisant une échelle qui varie de 0 à 4, où 0 indique que la foliole est d'apparence saine, tandis que, 1,2,3 et 4 indiquent des pourcentages de lésion nécrotique de 1 à 25 %, 26 à 50 %, 51 à 75 % et 76–100 % de la surface totale des folioles, respectivement (You et al., 2016).

Le développement de la maladie sur plants a été évalué en fonction du nombre de folioles malades par rapport au nombre total de folioles. L'indice de sévérité de la maladie (DSI) et l'efficacité de la lutte biologique ont été calculées pour chaque traitement à l'aide des formules suivantes (Xue et al., 2009) :

- L'indice de sévérité de la maladie (DSI) = $[\sum (\text{Le nombre de plantes malades dans cet indice} * \text{indice de maladie}) / (\text{Nombre total de plantes étudiées} * \text{L'indice de maladie le plus élevé})] * 100 \%$.
- Efficacité du contrôle biologique = $[(\text{Indice de sévérité de la maladie du témoin} - \text{Indice de sévérité de la maladie du groupe traité par antagoniste}) / \text{Indice de sévérité de la maladie du témoin}] * 100 \%$.

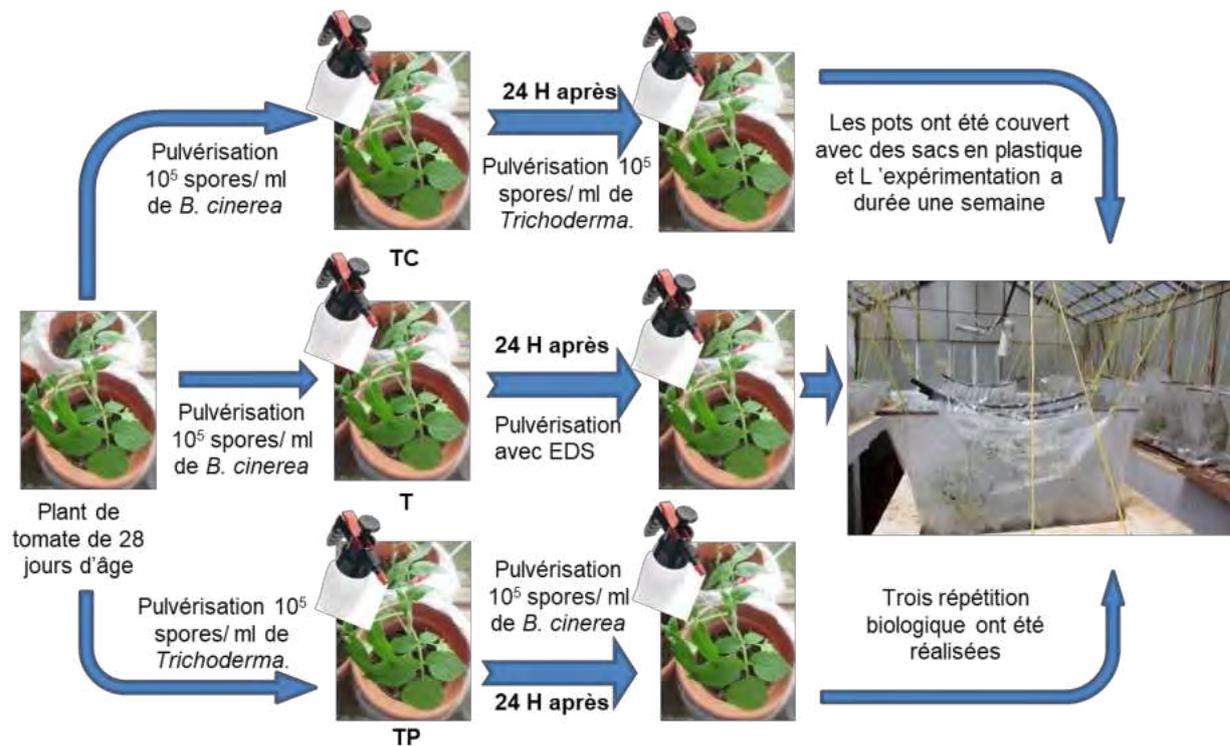


Fig. 16: Schéma de l'essai de biocontrôle de la maladie de la pourriture grise *in situ*.

Résultats

5 Résultats

5.1 Identification morphologique et culturelle des colonies du *Botrytis*

5.1.1 Aspect des colonies :

73 isolats ont été obtenus à partir des cultures de vignes, tomates, fèves, courgettes et fraisières. Les observations ont porté sur la couleur et l'aspect du mycélium. Les résultats présentés dans le **Tableau 9** ont été obtenus après une croissance mycélienne de 12 jours sur milieu PDA, à 20 ± 2 °C et sous une lumière blanche continue.

Tableau 9 : Aspect des colonies des isolats de *Botrytis* sur milieu PDA après 12 jours.

Isolats	Aspect du mycélium	Couleur de la colonie
BCT01	Aérien dense	Gris verdâtre
BCT02	Aérien peu dense	Gris Blanchâtre
BCT03	Rasant	Gris
BCT04	Aérien dense	Gris marron
BCT05	Masse mycélienne	Marron
BCT06	Aérien peu dense	Marron
BCT07	Aérien dense	Gris marron
BCT08	Épais et dense	Gris
BCT09	Rasant	Gris Marron
BCT10	Masses mycéliennes	Marron
BCT11	Cotonneux dense	Gris
BCT12	Aérien peu dense	Gris
BCT13	Subaérien dense	Gris
BCT14	Rasant	Gris blanchâtre
BCT15	Aérien peu dense	Gris
BCT16	Rasant	Gris verdâtre
BCT17	Aérien peu dense	Gris
BCT18	Rasant	Marron verdâtre
BCT19	Rasant	Gris marron
BCT20	Aérien peu dense	Gris blanchâtre
BCT21	Aérien peu dense	Marron
BCT22	Rasant	Marron
BCT23	Rasant	Gris
BCT24	Aérien peu dense	Marron
BCT25	Cotonneux dense	Gris Marron
BCT26	Aérien peu dense	Gris
BCT27	Rasant	Marron
BCT28	Aérien dense	Marron
BCT29	Rasant	Gris blanchâtre
BCT30	Aérien peu dense	Marron
BCT31	Cotonneux dense	Gris blanchâtre
BCT32	Cotonneux dense	Gris
BCT33	Rasant	Marron blanchâtre
BCT34	Aérien peu dense	Gris
BCT35	Masses mycéliennes	Gris
BCF01	Rasant	Gris
BCF02	Rasant	Marron
BCF03	Masse mycélienne	Gris verdâtre

BCF04	Aérien dense	Gris
BCF05	Rasant	Marron
BCF06	Masse mycélienne	Gris Marron
BCF07	Rasant	Marron
BCC01	Cotonneux dense	Marron
BCC02	Aérien peu dense	Gris
BCC03	Rasant	Marron blanchâtre
BCC04	Rasant	Marron
BCC05	Rasant	Gris verdâtre
BCC06	Aérien peu dense	Marron
BCC07	Rasant	Marron
BCC08	Rasant	Marron blanchâtre
BCC09	Rasant	Marron
BCFr01	Rasant	Marron
BCFr02	Rasant	Marron
BCFr03	Aérien peu dense	Gris
BCFr04	Rasant	Marron verdâtre
BCFr05	Rasant	Marron
BCFr06	Rasant	Marron blanchâtre
BCFr07	Aérien peu dense	Gris
BCFr08	Cotonneux peu dense	Gris
BCFr09	Masse mycélienne	Gris
BCFr10	Rasant	Marron blanchâtre
BCFr11	Rasant	Marron
BCV01	Aérien peu dense	Marron
BCV02	Aérien peu dense	Gris Marron
BCV03	Cotonneux peu dense	Gris
BCV04	Rasant	Marron verdâtre
BCV05	Masse mycélienne	Gris
BCV06	Rasant	Marron blanchâtre
BCV07	Rasant	Gris
BCV08	Aérien dense	Gris Marron
BCV09	Rasant	Marron
BCV10	Cotonneux peu dense	Marron

5.1.2 Forme et mensurations des conidies

La forme et la mensuration de 50 conidies ont été réalisées uniquement sur les isolats obtenus à partir des plants de fève afin de faire une identification morphologique des isolats (**Tableau 10**).

Les résultats de cette étude montrent que les mensurations conidiennes des isolats obtenus à partir de la culture de fève varient de 7,5 à 12,1 μm pour la longueur et de 6,5 à 11,2 μm pour la largeur des conidies, la forme des conidies est essentiellement Ovoïde à Elliptique. Les valeurs des mensurations nous laissent supposer que les isolats obtenus à partir des cultures de fèves appartiennent probablement à *B. cinerea*.

Tableau 10 : Formes et Intervalle des dimensions des conidies des isolats de *Botrytis* isolés à partir des cultures de fèves.

Isolats	Mensuration (µm)	Forme des conidies
BCC01	7,5–10,5 x 7,1–9,8	Ovoïde à Elliptique
BCC02	7,9–10,8 x 6,8–9,3	Ovoïde à Elliptique
BCC03	7,7–11,2 x 7,3–10,1	Ovoïde à Elliptique
BCC04	8,5–11,7 x 6,5–9,6	Ovoïde à Elliptique
BCC05	8,3–12,3 x 6,7–10,8	Ovoïde à Elliptique
BCC06	7,9–12,1 x 7,8–11,2	Ovoïde à Elliptique
BCC07	8,2–11,9 x 6,9–10,6	Ovoïde à Elliptique

5.1.3 Analyse des sclérotés

L'estimation du temps d'apparition des sclérotés, de la densité et la taille des sclérotés sont réalisées uniquement sur les isolats de type Sclérotien. Le nombre des sclérotés a été estimé sur un centimètre carré pour chaque isolat, sur des cultures âgées de 30 jours, incubées à l'obscurité et à une température de 20 ± 2 °C. La densité la plus élevée a été observée chez les isolats BCC05, BCC07 avec une moyenne de 1,78 sclérotés/cm² et de 1,17 sclérotés/cm², respectivement. La taille des sclérotés est réalisée sur l'ensemble des sclérotés présents dans les boîtes de Pétri. Les résultats de cette analyse sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Densité des sclérotés et premier jour de l'apparition du 1er sclérote des isolats du type Sclérotien.

Code isolats	Sclérotés/boîte de Pétri	Sclérotés/cm ²	Jour d'apparition du 1er sclérote	Mensuration (mm)
BCC02	73,33	1,15	10	0,6 – 4,5 x 1,0 – 6,0
BCC04	113,33	1,78	9	1,0 – 6,0 x 1,2 – 7,0
BCC06	38,33	0,60	11	1,1 – 4,0 x 1,5 – 5,5
BCC07	25,66	0,40	14	1,1 – 4,5 x 1,4 – 9,0
BCC09	30,67	0,48	8	1,6 – 5,5 x 2,0 – 10,0
BCC02	24,50	0,39	7	1,2 – 4,5 x 1,8 – 11,0
BCC05	17,00	0,27	12	0,8 – 7,0 x 1,0- 14,0
BCC07	74,33	1,17	12	1,1 – 5,5 x 1,5 – 15,0
BCC08	27,00	0,42	8	1,7 – 6,2 x 2,0 – 12,0
BCCr01	13,33	0,21	20	1,2 – 4,0 x 1,4 – 9 ;0
BCCr02	40,00	0,63	19	0 ,9 – 4,0 x 1,3 – 8,5
BCCr04	71,00	1,12	10	0,8 – 2,7 x 1,0 - 4,0
BCCr06	43,50	0,68	9	1,0 – 4,2 x 1,2 – 10,0
BCCr07	26,33	0,41	10	1,0 – 4,3 x 1,2 – 6,0
BCCr11	27,33	0,43	13	1,3 – 5,1 x 1,8 – 13,0
BCT03	40,00	0,63	15	0,9 - 4,0 x 0,8 - 3,0
BCT04	64,00	1,01	20	1,2 – 6,0 x 0,9 – 4,0
BCT09	58,00	0,91	18	1,5 – 7,5 x 1,1 - 5,0
BCT11	33,00	0,52	20	1,5 – 7,8 x 1,2 - 4,7
BCT13	20,00	0,31	12	1,8 – 7,5 x 1,2 – 11,0
BCT15	19,33	0,30	12	4,5 – 14,0 x 2,5 – 9,0
BCT18	39,00	0,61	12	1,2 – 14,0 x 1,0 – 4,5
BCT19	22,50	0,35	10	1,2 – 6,0 x 1,0 – 4,0
BCT20	23,33	0,37	11	1,3 – 2,2 x 1,1 – 2,5
BCT21	27,33	0,43	12	1,0 – 8,0 x 0,7 -1.8
BCT27	29,50	0,46	18	1,4 - 7,0 x 1,0 – 7,0
BCT28	33,00	0,52	10	1,5 – 7,0 x 1,0 – 4,0

BCT29	35,67	0,56	12	2,0 – 11,0 x 1,7 – 4,0
BCT30	48,33	0,76	15	0,9 – 10,0 x 0,8 – 4,0
BCT32	21,33	0,34	16	1,1 – 7,0 x 1,0 – 4,2
BCT33	28,67	0,45	16	1,2 – 4,0 x 0,8 – 3,5
BCT34	18,67	0,29	13	1,1 – 8,0 x 0,9 – 3,0
BCT35	42,33	0,67	14	1,4 - 5,8 x 1,0 – 6,1
BCV1	27,33	0,43	17	0,8 – 4,0 x 1,3 – 4,5
BCV2	38,67	0,61	12	1,8 – 7,7 x 1,3 – 10,8
BCV4	42,33	0,67	13	3,2 – 13,8 x 2,5 – 8,0
BCV6	63,17	0,99	9	1,2 – 4,7 x 1,3 – 6,3
BCV8	37,17	0,58	11	1,2 – 4,8 x 1,4 – 5,4
BCV9	77,67	1,22	8	1,1 – 3,7 x 1,2 – 7,3
BCV10	31,83	0,50	16	0,9 – 3,7 x 1,2 – 4,1

L'analyse des sclérotés de nos isolats a révélé une grande variabilité de leur taille, leur densité, leur disposition en boîte de Pétri et leur temps d'apparition. Les résultats de cette étude vont être utilisés dans la détermination des morphotypes et l'identification morphologique des isolats. De ce fait, les isolats obtenus à partir des cultures de fèves ont montré les caractéristiques des isolats appartenant à *B. cinerea*, la taille des sclérotés est plus grande que celle observée chez les isolats de *B. fabae* (Zhang et al., 2010).

5.1.4 Détermination des morphotypes :

Les colonies des isolats de *B. cinerea* cultivées sur milieu Malt-Agar ont été classées en neuf types morphologiques selon les critères décrits par Martinez et al., 2003 (Aspect des colonies, disposition des sclérotés, taille et nombre de sclérotés).

Les types morphologiques décrits par Martinez et al. (2003) ont été classés principalement en deux principaux groupes, le premier était le type Mycélien caractérisé par l'absence totale de sclérotés, il est représenté par les types (M1, M2, M3 et M4). Le second était le type Sclérotien, les colonies appartenant à ce type morphologique produisent fréquemment des sclérotés, il est représenté par les types (S1, S2, S3, S4). Un cinquième type Sclérotien (S5) a été identifié et décrit en 2012 par Kuzmanovska et al. (Fig. 17).

Les résultats de notre étude ont montré que 40 isolats ont été du type Sclérotien par rapport à 33 isolats de type Mycélien, le plus grand nombre d'isolats a été enregistré chez le type S3 avec 16 isolats et le nombre d'isolats le plus faible a été enregistré chez le type S5 avec seulement 2 isolats. La Fig. 18 représente la répartition des isolats en type Mycéliens et Sclérotiens.

Résultats

Les Isolats obtenus à partir des cultures de courgette, de fève, du fraisier et de tomate, ont montré que le nombre d'isolats de type Mycélien et de type Sclérotien sont presque égaux, à savoir : pour la courgette (5 isolats Sclérotiens et 4 isolats Mycéliens), pour la fève (4 isolats Sclérotiens et 4 isolats Mycéliens), pour le fraisier (6 isolats Sclérotiens et 5 isolats Mycéliens) et pour la tomate (18 isolats Sclérotiens et 17 isolats Mycéliens). Par contre, les isolats obtenus à partir des cultures de vigne étaient majoritairement de type Sclérotien (7 Isolats) et seulement 3 isolats étaient de type Mycélien.

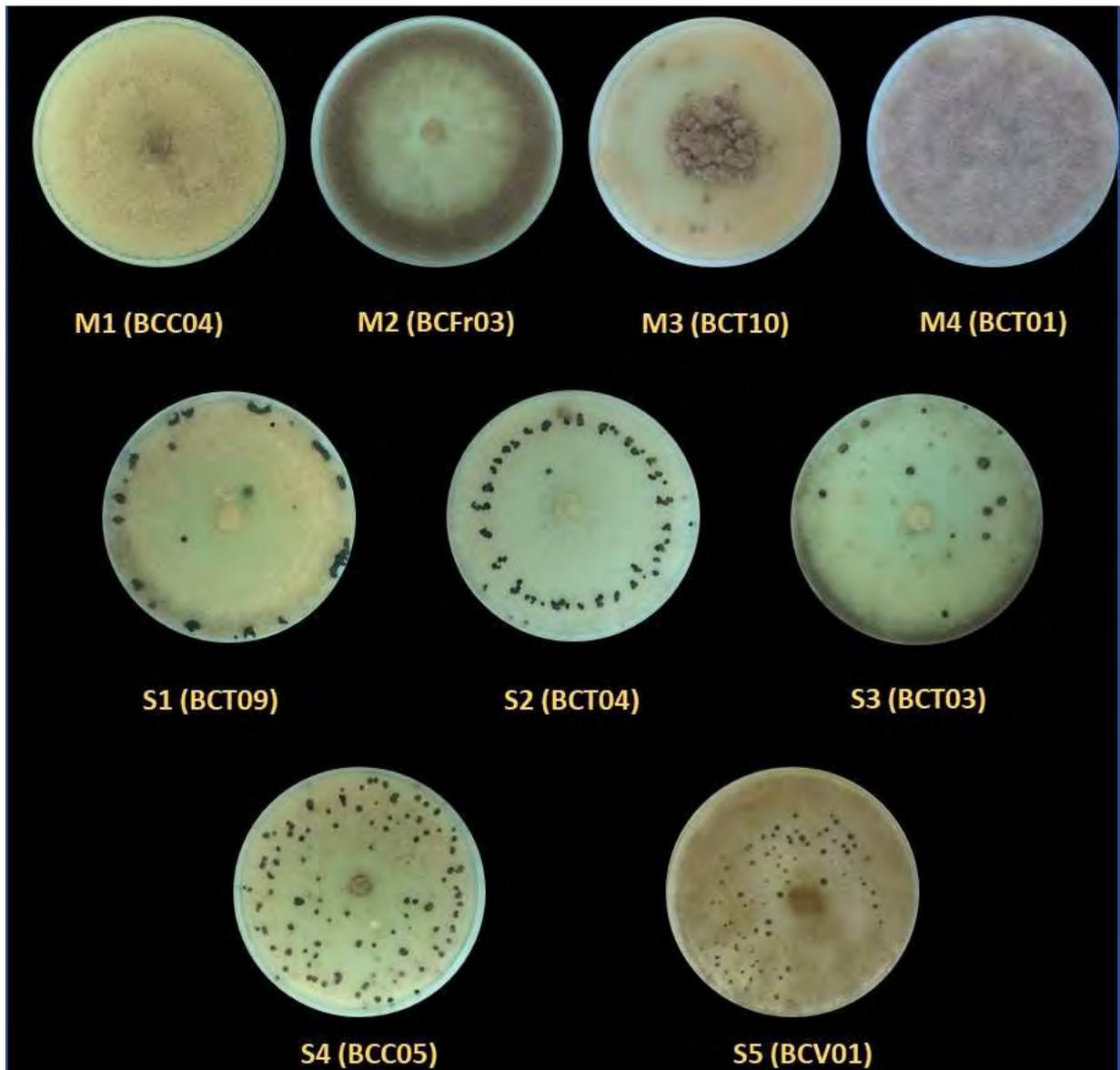


Fig. 17: Les types morphologiques (morphotypes) obtenus.

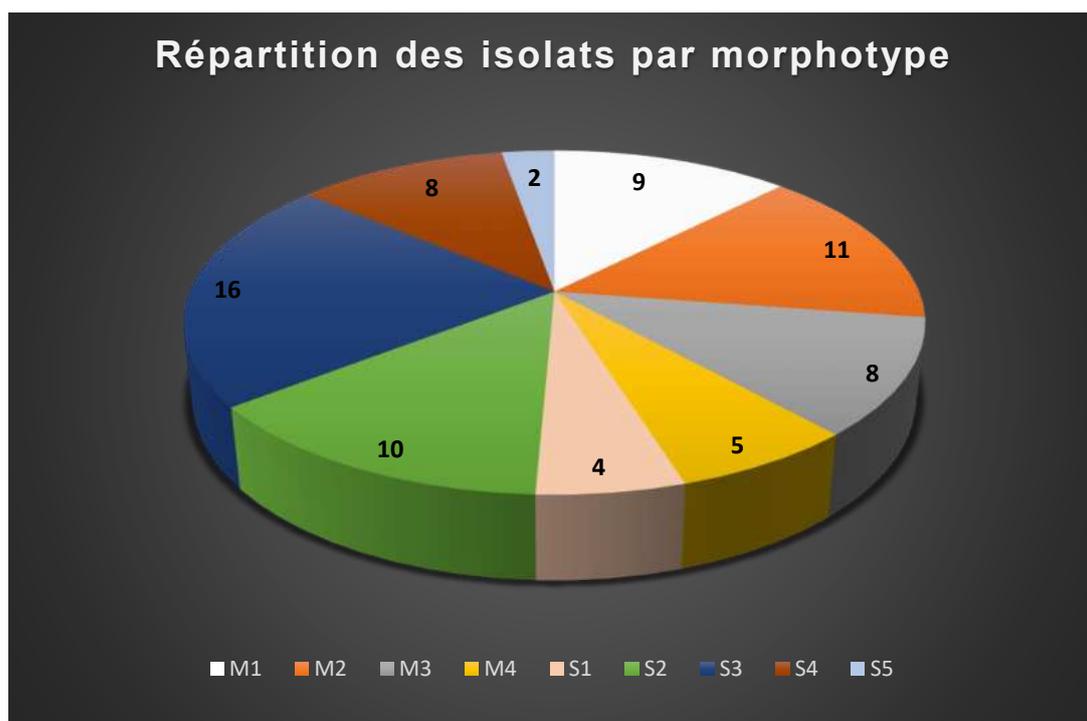


Fig. 18 : Répartition des isolats selon leurs types morphologiques (M1, M2 M3, M4, S1, S2, S3, S4, S5).

5.1.5 Vitesse de la croissance mycélienne

La vitesse de la croissance mycélienne des 73 isolats de *B. cinerea* a été calculée au bout de 04 jours d'incubation à l'obscurité et à une température de 20 ± 2 °C et à raison de 4 répétitions. Les mesures des deux diamètres opposés des colonies sont faites d'une manière quotidienne et la vitesse moyenne de croissance mycélienne de chaque isolat a été calculée (**Tableau 12**).

L'analyse de la variance des résultats de la vitesse de croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea*, montre une différence très hautement significative ($P = 0,001 < 0,01$) (**Annexe 04**). Les isolats ont été classés en fonction de leurs vitesses de croissance mycélienne en 3 groupes d'isolats. Le premier groupe représente les isolats les plus lents dont la vitesse moyenne est comprise entre 12,00 et 15,00 mm/j avec seulement 9 isolats, le second groupe est un groupe intermédiaire dont la vitesse est comprise entre 15,00 et 18,00 mm/j avec 38 isolats et le dernier groupe est celui des isolats les plus rapides dont la vitesse est supérieure à 18 mm/j avec 26 isolats. La vitesse de la croissance mycélienne journalière observée chez les isolats varie de 12,75 mm/jours enregistrée chez l'isolat BCFr05 à 19,75 mm/jours enregistrée chez l'isolat BCF02. Le **tableau 12** représente la vitesse journalière de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* étudiés.

Tableau 12 : Classification morphologique des isolats de *B. cinerea* et leurs vitesses de croissance mycélienne.

Isolats	M	Vm (mm/j)	Isolats	M	Vm (mm / j)
BCC01	M4	18,33	BCT10	M3	16,75
BCC02	M4	19,08	BCT11	S3	17,83
BCC03	S4	19,58	BCT12	M1	18,83
BCC04	M1	14,58	BCT13	S3	15,75
BCC05	S4	18,08	BCT14	M3	17,92
BCC06	M1	17,33	BCT15	S3	16,50
BCC07	S2	18,50	BCT16	M3	16,00
BCC08	S3	16,33	BCT17	M2	17,33
BCC09	S2	19,08	BCT18	S3	18,17
BCF01	M2	17,42	BCT19	S4	18,75
BCF02	S2	19,75	BCT20	S3	14,33
BCF03	M3	17,92	BCT21	S3	18,00
BCF04	M2	18,00	BCT22	M1	18,17
BCF05	S2	17,83	BCT23	M3	17,25
BCF06	M3	17,33	BCT24	M2	16,42
BCF07	S2	18,67	BCT25	M1	16,33
BCF08	S3	18,08	BCT26	M2	16,83
BCFr01	S2	19,08	BCT27	S2	17,58
BCFr02	S4	16,92	BCT28	S3	14,25
BCFr03	M2	17,00	BCT29	S2	16,58
BCFr04	S1	16,58	BCT30	S4	17,33
BCFr05	M1	12,75	BCT31	M3	17,08
BCFr06	S4	17,67	BCT32	S4	18,83
BCFr07	S3	18,08	BCT33	S2	17,75
BCFr08	M4	18,42	BCT34	S3	17,75
BCFr09	M3	17,92	BCT35	S4	17,67
BCFr10	M2	18,67	BCV01	S5	18,75
BCFr11	S3	19,17	BCV02	S3	19,00
BCT01	M4	18,50	BCV03	M1	16,42
BCT02	M2	18,67	BCV04	S3	15,67
BCT03	S3	16,83	BCV05	M2	16,92
BCT04	S2	16,00	BCV06	S1	13,92
BCT05	M1	18,83	BCV07	M1	15,83
BCT06	M2	13,33	BCV08	S3	17,58
BCT07	M2	14,25	BCV09	S1	16,58
BCT08	M4	14,08	BCV10	S5	13,42
BCT09	S1	17,58			

Vm : Vitesse de la croissance mycélienne ; M : Morphotype

Les isolats obtenus à partir des cultures de courgette ont montré majoritairement une croissance rapide 6/9 isolats, 2/9 isolats avec une croissance moyenne et seulement 1/9 isolat avec une croissance lente. Concernant les isolats obtenus à partir des cultures de fève 6/8

isolats ont montré une croissance rapide et aucun isolat n'avait une croissance lente. Quant aux isolats obtenus à partir des cultures de fraisiers 6/11 isolats ont montré une croissance rapide et seulement 1/11 isolat avec une croissance lente. Les isolats obtenus à partir des cultures de tomates 16/35 isolats ont montré une croissance rapide, 14/35 isolats avec une croissance moyenne et 5/35 isolats avec une croissance lente. Cependant, Les isolats obtenus à partir des cultures de vigne ont montré 3/10 isolats avec une croissance rapide et 5/10 isolats avec une croissance moyenne et 2/10 isolats avec une croissance lente.

5.1.6 Pouvoir pathogène des isolats de *B. cinerea*

Le pouvoir pathogène de 73 isolats de *B. cinerea* isolés à partir des Tomates (35 isolats), des vignes (10 isolats), des fraisiers (10 isolats), des courgettes (10 isolats) et des fèves (8 isolats) a été évalué sur des demi-pommes de la variété Golden Delicious. A raison de trois répétitions techniques (perforations) et trois répétitions biologiques. Après trois jours d'incubation les deux diamètres opposés des taches nécrotiques ont été mesurés. L'analyse de la variance effectuée sur la pathogénicité définie par les diamètres moyens des lésions nécrotiques des isolats de *B. cinerea* a révélé une différence hautement significative ($P = 0,001 < 0,01$) des différents isolats étudiés (**Annexe 05**).

Les résultats de notre étude montrent que les 73 isolats testés dans nos conditions de travail ont causés des lésions nécrotiques, donc ils sont tous pathogènes. L'agressivité des isolats varie du moins agressifs avec un diamètre de nécrose moyen de 13,85 mm, aux plus agressifs (BCFr11, BCT04 et BCV02) avec un diamètre de nécrose moyen de 34,67 mm, de 34,00 mm et de 31,33 mm, respectivement. Cette variabilité nous a permis de distinguer trois groupes : i. Les isolats peu agressifs dont le diamètre des lésions varie de 15,00 à 22,50 mm (16 isolats). ii. Les isolats moyennement agressifs dont le diamètre des lésions varie de 22,51 à 30,00 mm (37 isolats). iii. Les isolats très agressifs dont le diamètre des lésions supérieure à 30,01 mm (19 isolats). La **Fig. 19** illustre les lésions nécrotiques causées par des isolats peu agressifs, moyennement agressifs et très agressifs.

Les isolats obtenus à partir des cultures de courgette et fève sont moyennement et très agressif, ceux obtenus à partir des cultures de fraisiers et vigne sont moyennement et très agressifs. Quant aux isolats obtenus à partir des cultures de tomate sont majoritairement peu et moyennement agressifs (13 isolats / 17 isolats) et seulement 5 isolats très agressifs (**Fig. 20**).

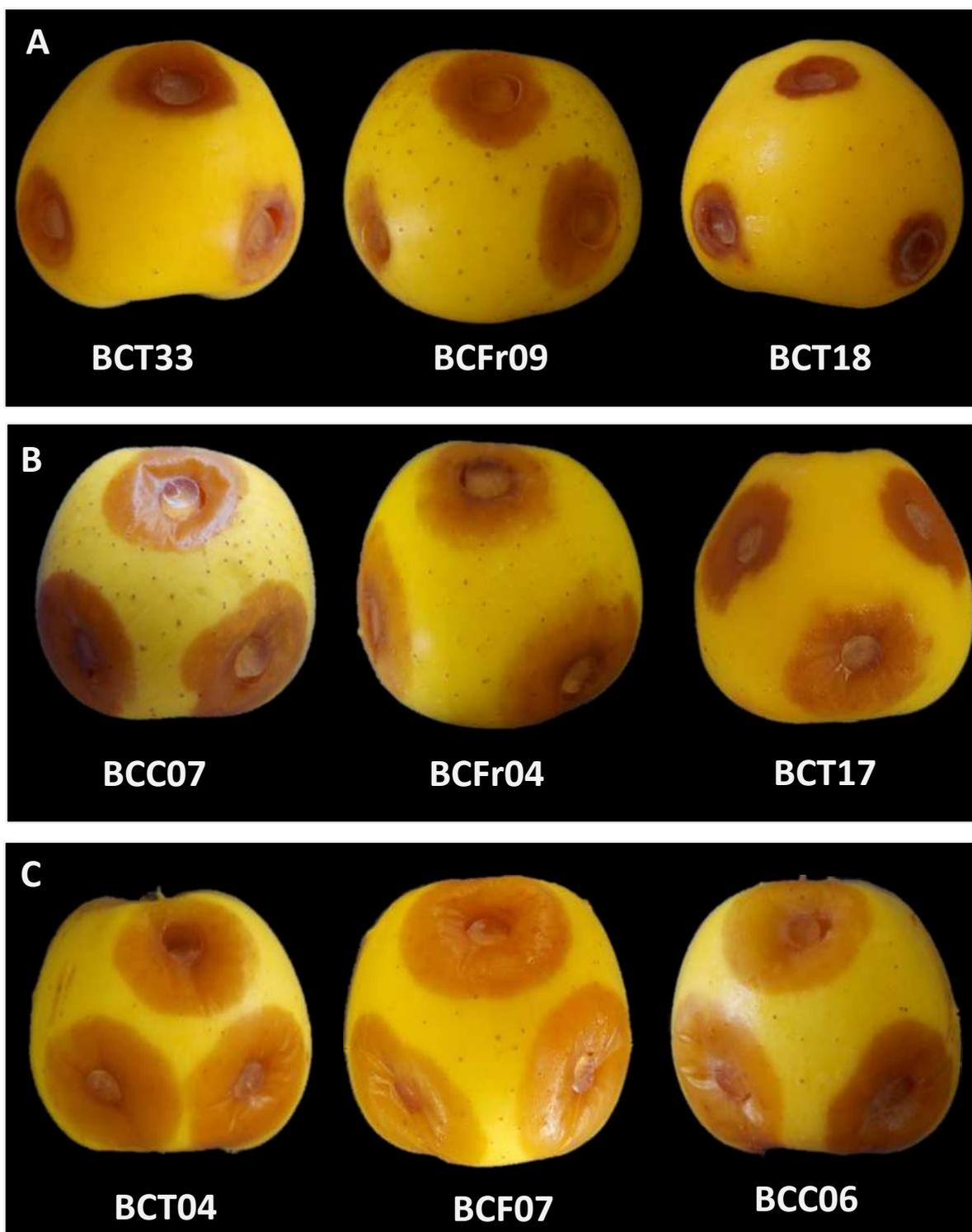


Fig. 19 : Pouvoir pathogène des isolats de *B. cinerea*.

A : lésions nécrotiques causées par des isolats peu virulents ; B : lésions nécrotiques causées par des isolats moyennement virulents ; C : lésions nécrotiques causées par des isolats très virulents.

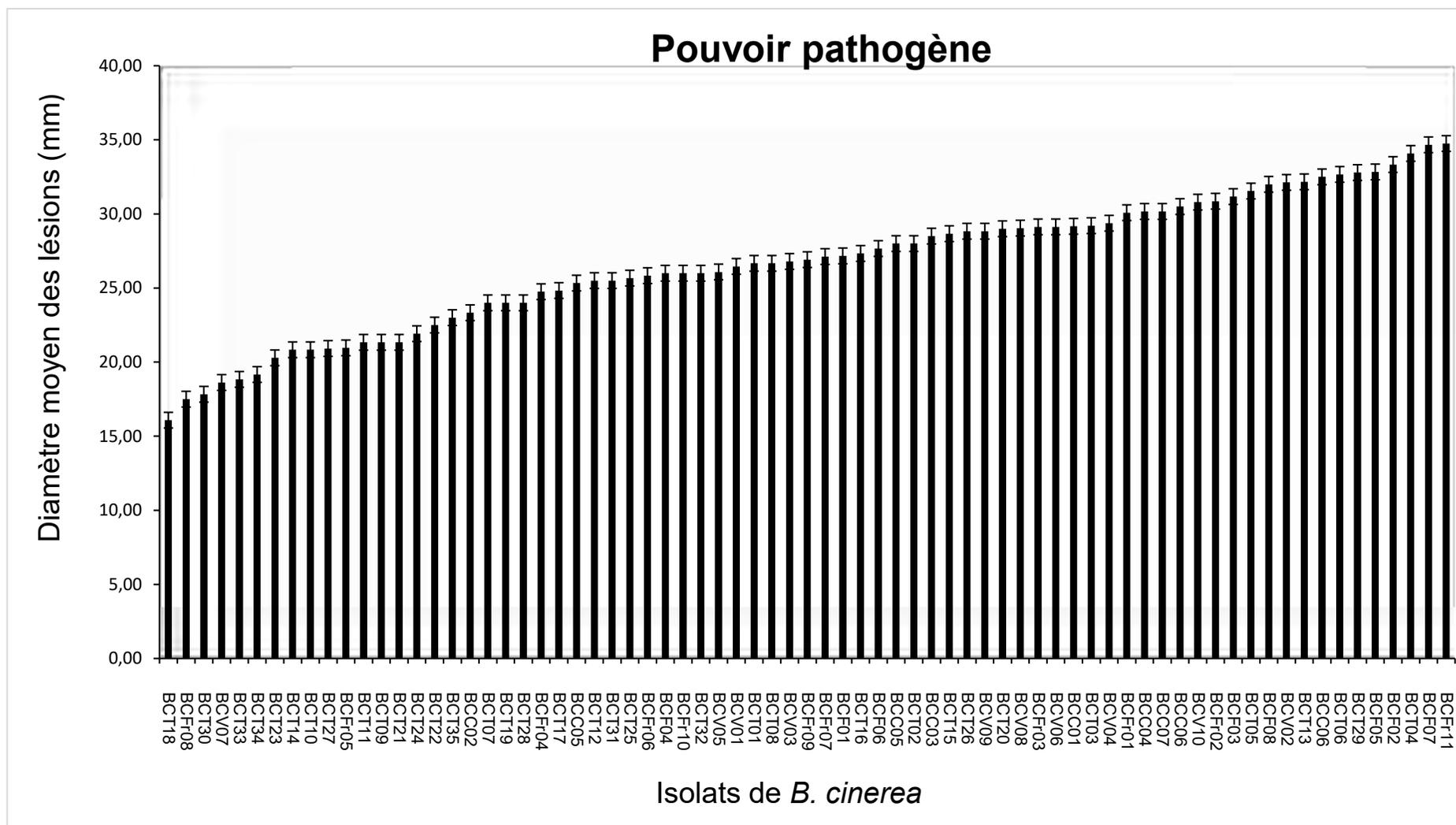


Fig. 20 : Diamètres moyens des lésions nécrotiques causés par les isolats de *B. cinerea* sur des demi-pommes.

5.1.7 Sensibilité au fenhexamide

L'effet de la matière active « fenhexamide » sur les isolats de *B. cinerea* a été évalué *in vitro*. Quatre concentrations du fongicide ont été incorporé dans un milieu de culture (PDA) maintenu à une température de 45 °C. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque combinaison dose/isolat. Après quatre jours d'incubation, les deux diamètres opposés des colonies ont été mesurés et les pourcentages d'inhibition calculés. L'**annexe 06 et les Fig. 21 et 22** montrent les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* causés par les quatre concentrations du fongicide utilisées.

Les courbes dose/réponse (**Annexe 07**) ont été tracées sur la base des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea*. A partir de ces courbes, Les CI50 ont été calculées et les facteurs de résistance estimés. Les résultats de l'effet du fenhexamides sur les isolats de *B. cinerea* étaient très variables. La dose discriminante dans le cadre de cette étude est la D2 (0,1 mg/l), cette dernière nous a permis de classer nos isolats en deux grands groupes : un groupe d'isolat sensible au fenhexamide donc du phénotype HydS lorsque la CI50 < 0,1 mg/l et le pourcentage d'inhibition est supérieur ou égale à 50 % et un groupe d'isolat résistant au fenhexamide donc du phénotype HydR lorsque la CI50 > 0,1 mg/l et un pourcentage d'inhibition inférieur 50 % (**tableau 13**).

L'analyse de la variance des résultats obtenus sur l'inhibition de la croissance mycélienne des 73 isolats de *Botrytis cinerea* étudiés a relevé une différence hautement significative ($P = 0,001 < 0,01$) pour les facteurs étudiés (Isolats/Doses) ainsi que pour leurs interactions (**Annexe 08**), 50 isolats ont montré une CI50 < 0,1 mg/l avec un pourcentage d'inhibition supérieur ou égale à 50 % et 23 isolats ont montré une CI50 > 0,1 mg/l et un pourcentage d'inhibition inférieur 50 %, avec 6 isolats ont été inhibés à moins de 20 % à la dose D2 (0,1 mg/l).

A la dose D1 (0,01 mg/l) de notre étude seulement 6 isolats ont été inhibés à plus de 50 % contre 67 isolats inhibés à moins de 50 % avec des taux d'inhibitions très variables allant de 2,07 % pour l'isolat BCFr06 à 63,04 pour BCFr04. A la dose D3 (1 mg/l) 64 isolats ont été inhibés à plus de 60 %, 3 isolats à plus de 50 % et 6 isolats ont été inhibé à moins de 20 % montrant une résistance vis-à-vis du traitement fenhexamide. A la dose D4 (10 mg/l), 67 isolats ont été inhibés à plus de 75 % et seulement 6 isolats ont montré une inhibition inférieure à 50 % à la dose D4 (10 mg/l) qui représente 100 fois la concentration de la dose discriminante, montrant ainsi leur forte résistance au fenhexamide.

Les isolats obtenus à partir des cultures de fèves ont montré 6/8 isolats résistants et 2/8 isolats peu sensible et ceux isolés à partir des cultures de fraisier ont montré 4/11 isolats résistants,

Résultats

avec 6 à 47 % d'inhibition de la croissance mycélienne et 7/11 Isolats sensibles. Alors que, les isolats obtenus à partir des cultures de courgette ont montré une sensibilité voire une résistance modérée au fenhexamide avec des taux d'inhibition de la croissance mycélienne allant de 47 % à 59 % à la dose discriminante D2.

Les isolats obtenus à partir des cultures de tomates ont révélé 12/35 isolats résistants avec des taux d'inhibition inférieure à 50 % qui varie de 39 à 49 % et 23/35 isolats montrant un taux d'inhibition supérieure à 50 % variant de 51 à 74 % à la dose discriminante D2. Les isolats obtenus à partir des cultures de vigne ont montré le taux le plus faible de résistance avec seulement 1/10 isolat résistant, montrant un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de 40 % à la dose discriminante D2.

Les isolats montrant une résistance élevée vis-à-vis de la matière active fenhexamide ont été isolés à partir des cultures de fraisier (BCFr03, BCFr06 et BCFr11) et à partir des cultures de fève (BCF01, BCF04 et BCF06).



Fig. 21 : Effet des différentes doses de fenhexamide sur la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis cinerea*. Les isolats sensibles sont représentés par l'isolat BCT10, les moyennement

résistants sont représentés par l'isolat BCT15 et les résistants par l'isolat BCFr06. Tm : représente le témoin sans fongicide. D1 = 0,01 mg/l, D2 = 0,1 mg/l, D3 = 1 mg/l et D4 = 10 mg/l.

Tableau 13 : Les CI50 et facteurs de résistance des isolats de *B. cinerea* étudiés. Les isolats sont classés par ordre croissant de la CI50 et degrés de résistance.

Isolat	CI 50	Facteur de résistance	Isolat	CI 50	Facteur de résistance
BCFr04	0,008	1,00	BCC04	0,055	6,86
BCFr05	0,008	1,05	BCT27	0,055	6,86
BCT10	0,009	1,18	BCC09	0,057	7,09
BCT02	0,010	1,19	BCT25	0,061	7,59
BCV04	0,010	1,22	BCC03	0,063	7,87
BCT17	0,011	1,39	BCFr01	0,063	7,92
BCT29	0,012	1,55	BCT20	0,065	8,10
BCFr08	0,013	1,57	BCT12	0,068	8,43
BCT21	0,013	1,66	BCF03	0,074	9,25
BCT09	0,017	2,06	BCT05	0,081	10,06
BCT31	0,017	2,10	BCT26	0,090	11,21
BCT23	0,018	2,20	BCC05	0,095	11,90
BCV03	0,018	2,20	BCT13	0,096	11,95
BCV09	0,020	2,56	BCT15	0,108	13,52
BCV06	0,022	2,77	BCT07	0,120	14,94
BCT11	0,024	2,99	BCT01	0,121	15,06
BCT33	0,027	3,34	BCFr07	0,122	15,25
BCC08	0,030	3,70	BCF05	0,127	15,89
BCT34	0,031	3,84	BCF07	0,130	16,23
BCT19	0,033	4,15	BCT30	0,143	17,85
BCT18	0,034	4,25	BCF02	0,144	18,03
BCT24	0,036	4,45	BCC07	0,149	18,59
BCT32	0,037	4,65	BCFr10	0,152	19,00
BCFr09	0,037	4,66	BCT06	0,156	19,47
BCFr02	0,039	4,86	BCT08	0,182	22,76
BCT14	0,039	4,88	BCC02	0,183	22,82
BCV10	0,039	4,93	BCC01	0,191	23,79
BCT16	0,040	4,96	BCF08	0,191	23,90
BCV08	0,040	5,04	BCC06	0,212	26,50
BCT03	0,048	6,02	BCV02	0,372	46,43
BCV05	0,049	6,09	BCF01	242,606	30290,85
BCT28	0,051	6,35	BCFr03	422,295	52726,02
BCT35	0,053	6,62	BCFr11	903,964	112865,30
BCT22	0,054	6,69	BCF06	2737,532	341797,14
BCV01	0,054	6,72	BCFr06	2794,267	348880,84
BCT04	0,054	6,77	BCF04	17681,760	2207672,97
BCV07	0,054	6,78			

La classification des isolats en fonction des degrés de résistance selon l'échelle proposée par Billard et *al.* (2011) a révélé que 50 isolats ont montré un facteur de résistance inférieure à 12 et une CI50 < 0,1 mg/l, donc ils sont hypersensibles (HS) à sensibles (S) du type HydS. 17 isolats avec un facteur de résistance qui varie de 13 à 46,43 et une CI50 >0,1 mg/l, donc sont légèrement résistant (LR) à moyennement résistant (MR) probablement de type HydR2 ou HydR3⁻ et 6 isolats avec un facteur de résistance supérieure à 50, donc hautement résistant (HR), probablement du type HydR1 (Naturellement résistant, isolats appartenant à *B. pseudocinerea*) ou HydR3⁺ (résistance acquise, isolats appartenant à *B. cinerea*). De ce fait, nos résultats révèlent que 68 % d'isolats étudiés sont HS/S au fenhexamide, 27 % R/MR et 8 % hautement résistant (**Fig. 22**).

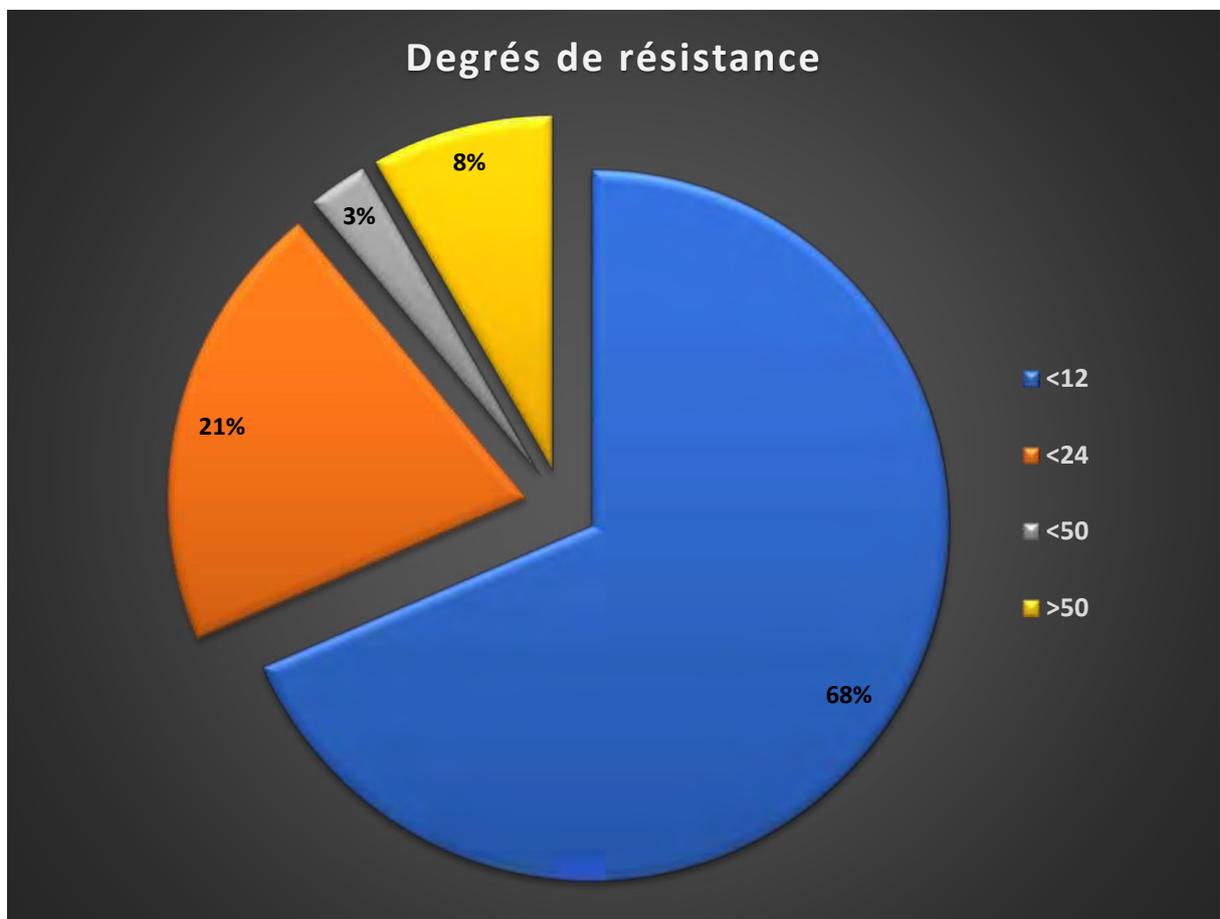


Fig. 22 : Répartition de 73 isolats de *B. cinerea* en fonction des degrés de résistance.

5.2 Identification morphologique et culturelle des colonies de *Trichoderma* spp.

La confirmation de l'appartenance des isolats au genre *Trichoderma* et la caractérisation phénotypique, morphologique et culturelle des colonies de *Trichoderma* spp. ont été réalisées sur les 15 isolats obtenus à partir des rhizosphères des cultures de tomate, fraisier et vigne et à partir du bio-composte. Les 15 isolats ont montré une croissance mycélienne rapide, ils atteignent la périphérie des boîtes de Pétri après 3 à 4 jours d'incubation à une lumière blanche continue et à 25 °C. la croissance des colonies se fait d'une manière concentrique chez l'ensemble des isolats.

Les colonies mycéliennes des isolats (TBS1, TAS2, TAS4, TAS5, TLS6 TAS8, TBeC1, TLC2, TLC4 et TLiC8) sont initialement de couleur blanchâtre, qui change progressivement avec l'âge en vert claire voire vert foncé, par contre les colonies des isolats (TGS07, TGS10, TGS11, TGS13 et TAtC11) sont de couleur blanchâtre même avec l'âge avec une légère présence de la couleur verte. La pigmentation du milieu variant du jaune, jaune-vert brillant à orange a été observée chez certain isolats. La **Fig. 23** illustre l'aspect des colonies de *Trichoderma* spp. et la pigmentation sur le milieu de culture PDA.

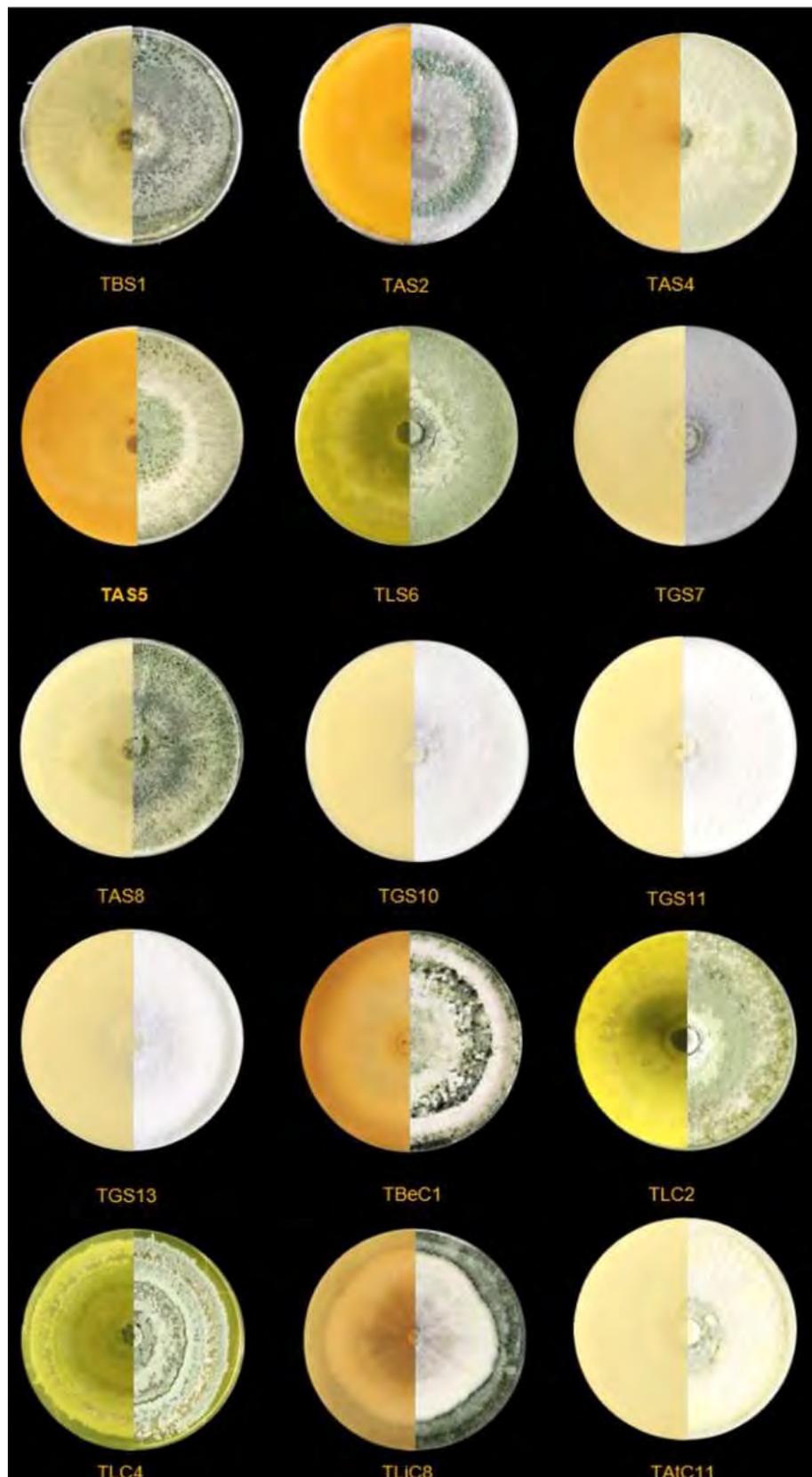


Fig. 23 : Aspect des colonies de *Trichoderma* spp. et la pigmentation sur le milieu de culture PDA

Résultats

Les observations microscopiques des structures de fructifications des isolats ont été réalisées à l'aide de la microscopie photonique et de la microscopie électronique à balayage (**Fig. 24**), elles nous ont permis de décrire la forme et le regroupement des phialides, la morphologie des conidiophores, la taille, la forme et la couleur des conidies. Le **tableau 14** représente les caractéristiques microscopiques des fructifications des isolats étudiés.

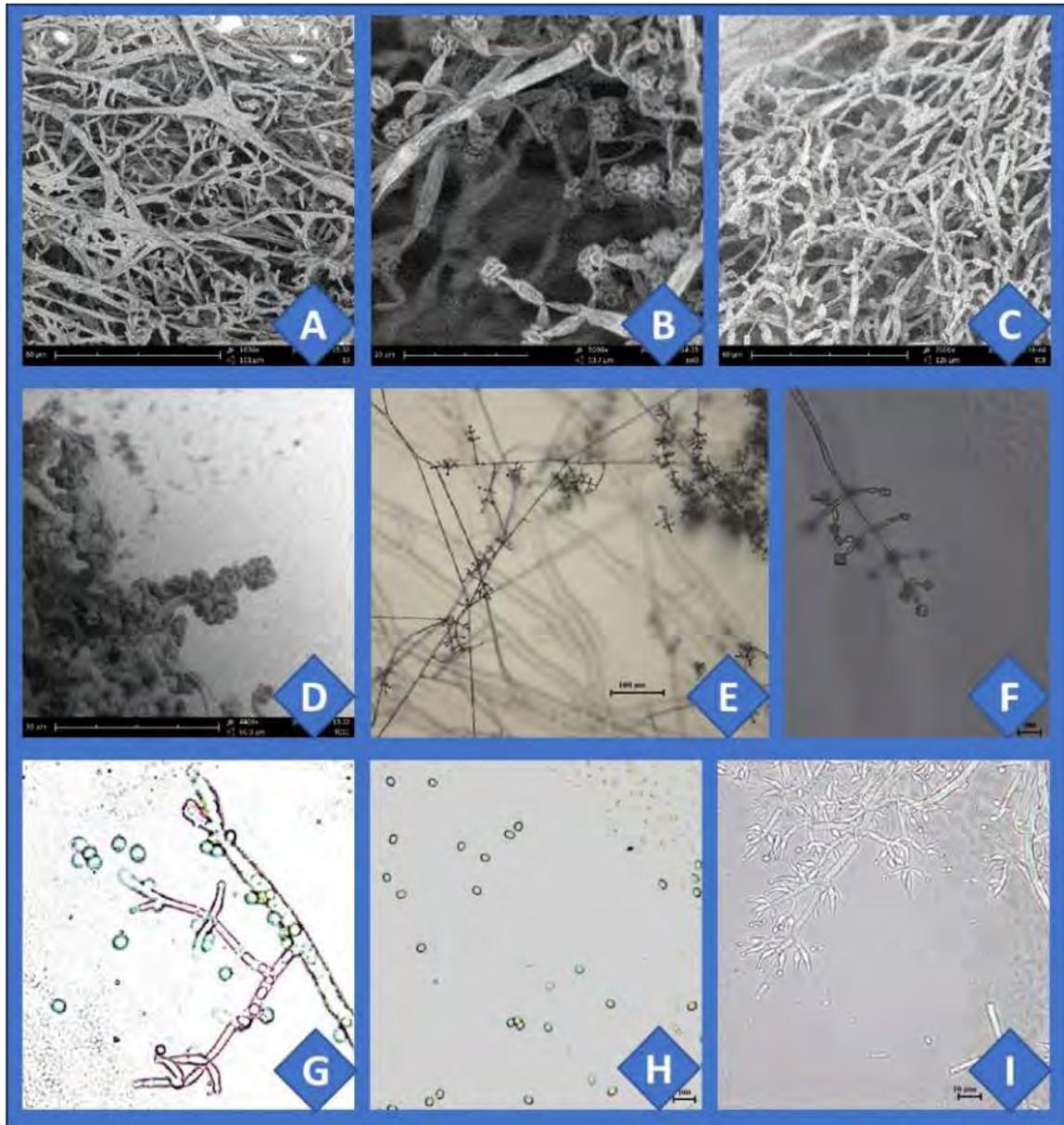


Fig. 24 : L'aspect des structures de fructification sous microscopie électronique à balayage (A, B, C, D) et sous microscopie optique (E, F, G, H, I) des isolats de *Trichoderma* spp.

Les résultats des observations microscopiques montrent que les isolats possèdent des conidiophores ramifiés à plusieurs reprises (structure pyramidale) avec des phialides lagéniformes (en forme de bouteille), Ampulliformes portant les conidies vertes ou hyalines. Des

caractéristiques morphologiques semblables sont décrites par Rifai (1969) ; Bissett (1984 & 1991a, b, c) pour l'identification microscopique des isolats appartenant au genre *Trichoderma*.

Tableau 14 : Les caractéristiques morphologiques des structures de fructification des isolats étudiés.

Isolats	Conidies			Phialides	Conidiophores
	Couleur	Forme	Taille (µm)	Forme	Forme
TBS1	Vert pâle	Subglobuleuse	2,2 - 3,3 x 2,0 - 2,6	Ampulliforme	Pyramidale
TAS2	Vert à vert foncé	Subglobuleuse à ovoïde	2,6 – 3,3 x 2,4 – 3,2	Lagéniforme à ampulliforme	Pyramidale symétrique
TAS4	Vert à vert foncé	Subglobuleuse à ovoïde	2,5 – 3,5 x 2,1 – 3,3	Lagéniforme à ampulliforme	Pyramidale symétrique
TAS5	Vert à vert foncé	Subglobuleuse à ovoïde	2,4 – 3,5 x 2,3 – 3,3	Lagéniforme à ampulliforme	Pyramidale symétrique
TLS6	Vert clair	Ellipsoïdales à oblongues	1,2 – 4,6 x 1,1 – 3,2	Lagéniforme à cylindrique	Symétrique, avec un axe principal long
TGS7	Hyaline à jaune pâle	Ellipsoïdales à oblongues	3,6 – 4,7 x 2,9 – 3,4	Lagéniforme	Étroits et flexueux
TAS8	Vert à vert foncé	Subglobuleuse à ovoïde	2,2 – 3,6 x 2,4 – 3,1	Lagéniforme à ampulliforme	Pyramidale symétrique
TGS10	Hyaline à jaune pâle	Ellipsoïdales à oblongues	3,6 – 4,9 x 2,8 – 3,4	Lagéniforme	Étroits et flexueux
TGS11	Hyaline à jaune pâle	Ellipsoïdales à oblongues	3,3 – 5,2 x 2,6 – 3,2	Lagéniforme	Étroits et flexueux
TGS13	Hyaline à jaune pâle	Ellipsoïdales à oblongues	3,7 – 4,7x 2,4 – 3,8	Lagéniforme	Étroits et flexueux
TBeC1	Vert à vert foncé	Subglobuleuse à ovoïde	2,4 – 3,7 x 2,3 – 3,3	Ampulliforme ou Lagéniforme	Pyramidale symétrique
TLC2	Vert clair	Ellipsoïdales à oblongues	1,0 – 4,7 x 1,0 – 3,0	Lagéniforme à cylindrique	Symétrique, avec un axe principal long
TLC4	Vert clair	Ellipsoïdales à oblongues	1,4 – 4,4 x 1,3 – 3,1	Lagéniforme à cylindrique	Symétrique, avec un axe principal long
TLiC8	Verdâtre	Subglobuleuse à ovoïde	2,3 – 3,6 x 2,4 - 3,1	Ampulliforme à flasque.	Pyramidale
TATC11	Vert pâle	Subglobuleuse à ovoïde	3,3 – 4,3 x 2,6 – 3,2	Lagéniforme	Lagéniforme courbé

A l'issu de cette caractérisation morphologique et culturale (Marco et microscopique) 4 groupes distincts ont été observés :

Le 1^{er} groupe comporte les isolats (TAS2, TAS4, TAS5, TAS8, TBeC1 et TLiC8) dont les conidiophores ont une forme pyramidale symétrique, les branches sont assez espacées, l'axe principal et chaque branche se termine par verticille de 3 à 5 phialides. Les phialides sont lagéniformes à ampulliformes, les conidies sont subglobuleuses à ovoïdes. Une pigmentation de couleur jaune orangé à orange diffuse dans le milieu ; une douce odeur est parfois détectée. Ces caractéristiques correspondent à la description du clade *Harzianum* (Chaverri et al., 2015).

Le 2^e groupe comporte un seul isolat (TBS1), il est caractérisé par des conidies subglobeuses de couleur vert-jaunâtre à vert pâle, les conidiophores comprennent un axe central distinct, large avec des branches fertiles, séparées par de courts entre-nœuds, apparaissant avec un angle presque droit par rapport à l'axe principal, chaque branche se termine par un verticille de 1 à 3 phialides ampulliformes. Aucune pigmentation n'est diffusée dans la gélose et aucune odeur distinctive n'a été constatée. Ces caractéristiques sont similaires à celles du clade *Brevicompectum* décrit par Degenkolb et *al.* (2008).

Le 3^e groupe est composé de 3 isolats (TLS6 TLC2, TLC4) et il est caractérisé par des conidiophores symétriques, souvent avec un axe principal long jusqu'à 150 µm et des branches latérales courtes. Les phialides sont disposées en verticilles et souvent la cellule basale se termine par une courte phialide apparaissant comme une excroissance de la cellule basale. Les phialides sont typiquement lagéniforme à presque cylindrique, souvent crochue. Les conidies sont de forme ellipsoïdale à oblongue. Un pigment jaune brillant est souvent diffusé dans un milieu de culture. Des caractéristiques semblables ont été décrites par Samuels et *al.* (2012) dans le cas des espèces de *Trichoderma* appartenant au clade Longibrachiatum.

Le 4^e groupe comporte les isolats TGS7, TGS10, TGS11, TGS13 et TAtC11, il est caractérisé par des conidiophores étroits et flexueux produisant des branches latérales souvent unicellulaires chacune se termine par 2 à 4 phialides souvent crochu ou sinueux. Les conidies avaient tendance à se former en pustules pulvinées à hémisphériques. Aucun pigment n'a été noté sur le milieu gélosé. Une odeur de noix de coco plus ou moins forte était détectée dans les cultures sur milieu de culture. Des caractéristiques similaires ont été décrites par Jaklitsch et *al.* (2006, 2011) dans le cas des espèces de *Trichoderma* appartenant au clade Viride.

Les résultats suivants concernent nos isolats dans nos conditions d'expérimentation, l'identification morphologique des espèces appartenant au genre *Trichoderma* est très complexe et elle reste peu fiable en raison d'une similitude élevée au niveau des caractéristiques morphologiques et culturelles entre les différentes espèces du genre. Le recours à l'identification moléculaire est primordial pour une identification juste et fiable

5.3 Effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp.

L'étude de l'effet de la température sur la croissance mycélienne de *Trichoderma* spp. a été réalisée sur neuf (09) différentes températures à savoir : 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C. La réponse de nos isolats aux différentes températures testées a été très variable (**Annexe 09**).

Résultats

Les résultats de la présente étude révèlent que les limites de tolérance de notre collection se situent entre 10 et 40 °C, au-dessus ou au-dessous de cet intervalle aucun isolat n'avait poussé, comme le présente clairement la **Fig. 25** à la température 5 et 45 °C aucune croissance mycélienne n'a été enregistrée.

A 10 °C, l'ensemble des isolats ont poussé, par contre le diamètre moyen de croissance mycélienne était réduit, les isolats qui toléraient mieux cette température étaient les isolats de *T. gamsii* (TGS10 et TGS7) et de *T. longibrachiatum* (TLC2 et TLC4) avec des diamètres de 65,90, 51,80, 63,40 et 51,50 mm, respectivement. Cependant, l'isolat de *T. brevicompactum* (TBS1) montre une difficulté de croître avec un diamètre moyen de seulement 9,00 mm.

A 15 °C, les diamètres moyens de la croissance mycélienne étaient supérieurs à 50 mm au quatrième jour d'incubation, à l'exception de l'isolat de *T. brevicompactum* (TBS1) qui a montré un diamètre moyen de 20,17 mm au quatrième jour d'incubation.

A 20 °C, 10 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré un diamètre moyen de croissance mycélienne de 85 mm au quatrième jour d'incubation et 05 isolats ont montré une croissance mycélienne réduite et le plus faible diamètre a été enregistré chez l'isolat de *T. brevicompactum* (TBS1) avec 64,33 mm.

A 35 °C, seulement deux isolats ont enregistré une croissance avec un diamètre moyenne de 85 mm, à savoir *T. longibrachiatum* (TLC2 et TLC4), à cette température la croissance mycélienne des isolats de *T. gamsii* (TGS10 et TGS7) et de *T. atroviride* (TAtC11) a été complètement inhibée.

A 40 °C, nous avons enregistré la croissance mycélienne de seulement deux isolats de *T. longibrachiatum* (TLC2 et TLC4) avec un diamètre de croissance mycélienne moyenne de 85 et 76 mm, respectivement.

Tandis que, l'optimum de croissance a été enregistré à deux températures, à savoir, 25 et 30 °C, les diamètres moyens étaient pour l'ensemble des isolats à 85 mm (la colonie occupe toute la surface de la boîte de Pétri au quatrième jour d'incubation).

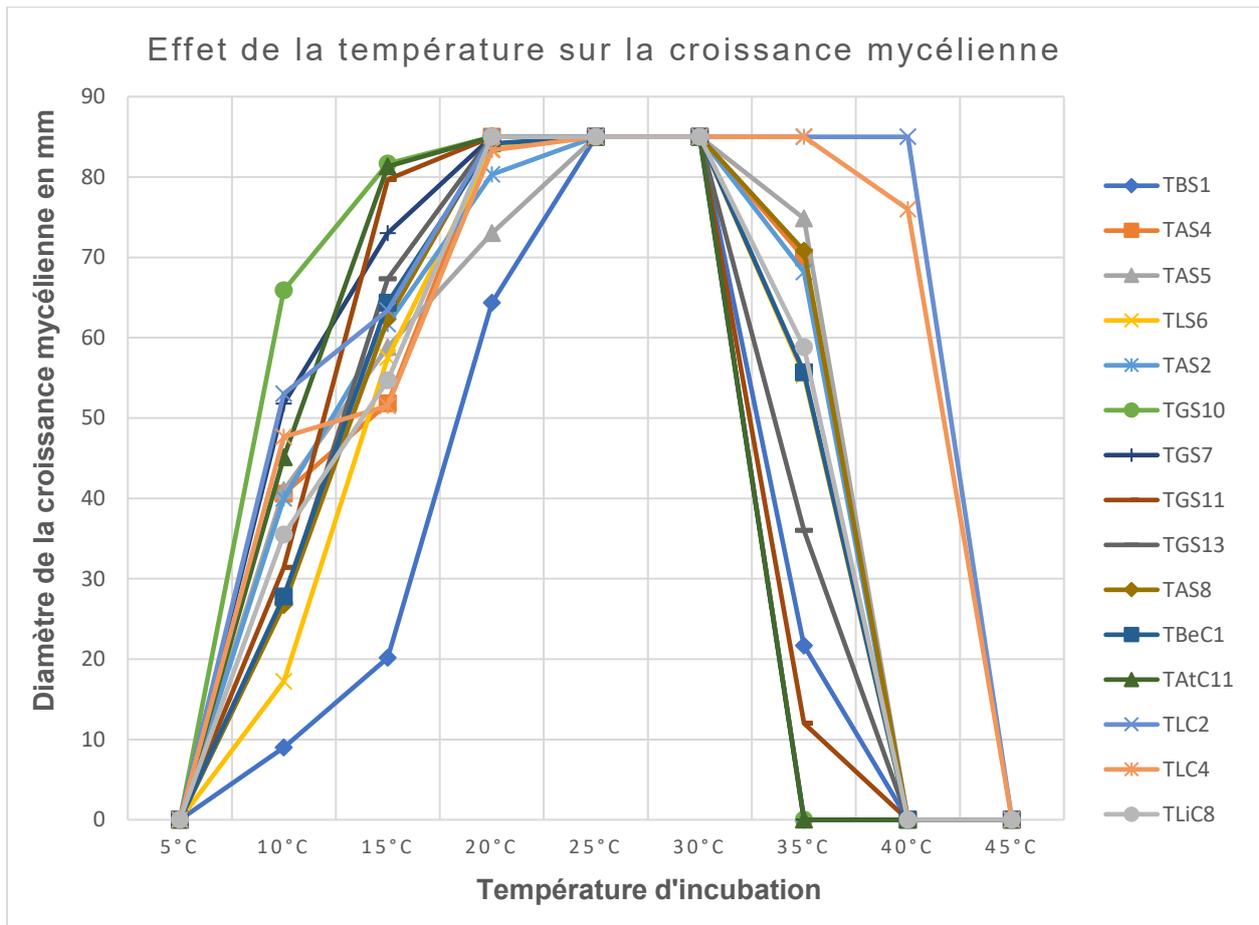


Fig. 25 : L'effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *Trichoderma* spp.

5.4 Identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* spp.

Quinze isolats présentant des caractéristiques macroscopiques et microscopiques du genre *Trichoderma* ont été isolés à partir des différents échantillons collectés. L'ADN génomique des isolats a été extrait et une PCR a été réalisée en utilisant quatre paires d'amorces. Les quatre régions génomiques ont été séquencées en vue de réaliser une analyse de séquence et une étude phylogénétique.

5.4.1 Résultats de la PCR :

L'amplification a été effectuée sur 4 régions génomique des 15 isolats étudiés et les résultats des PCR sont illustrés dans les Fig. 26, 27, 28 et 29 correspondants aux profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (ITS1 et ITS4), (EF1-728F et TEF1LLerev), (fRPB2-5f et fRPB2-7cr) et (acl1-230up et acl1-1220low), respectivement.

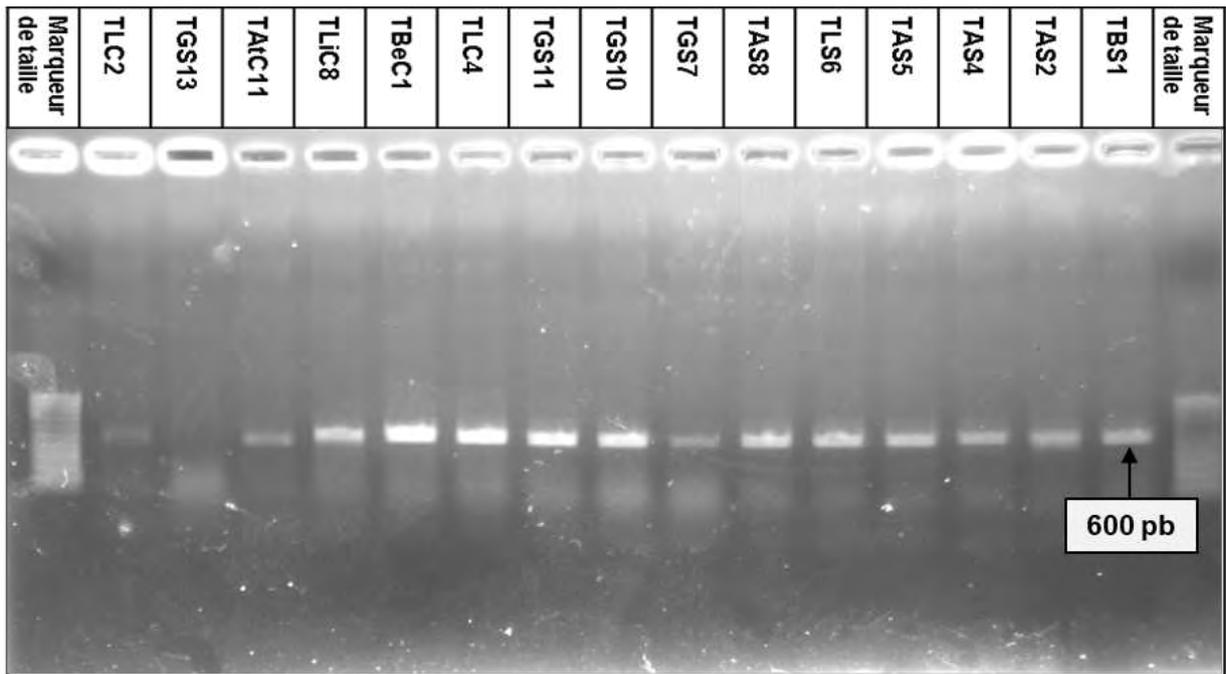


Fig. 26 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (ITS1 et ITS4).

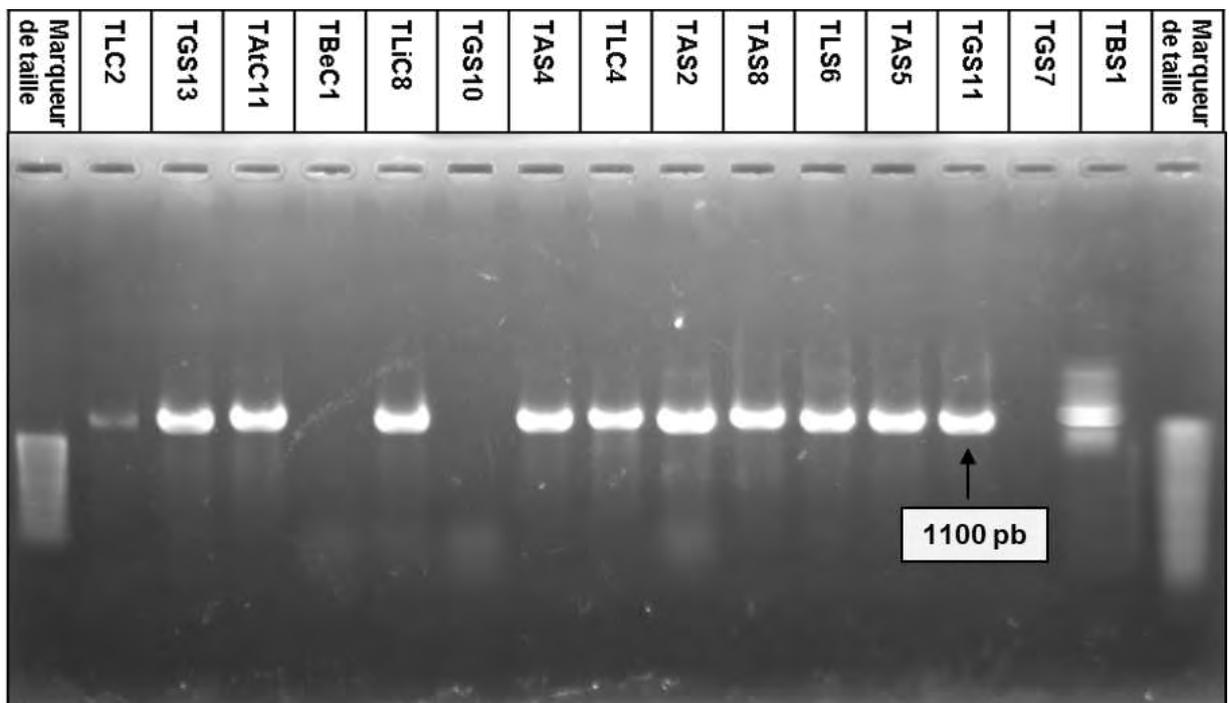


Fig. 27 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (EF1-728F et TEF1LLERev).

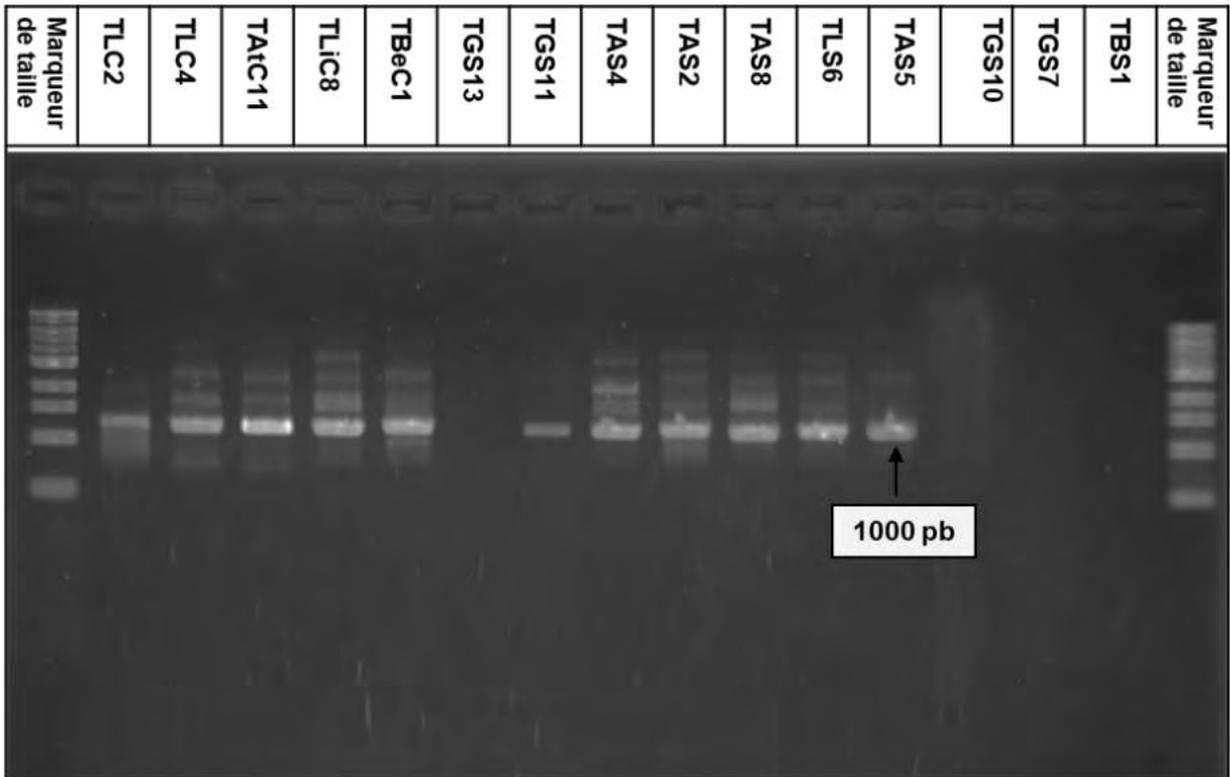


Fig. 28 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (fRPB2-5f et fRPB2-7cr).

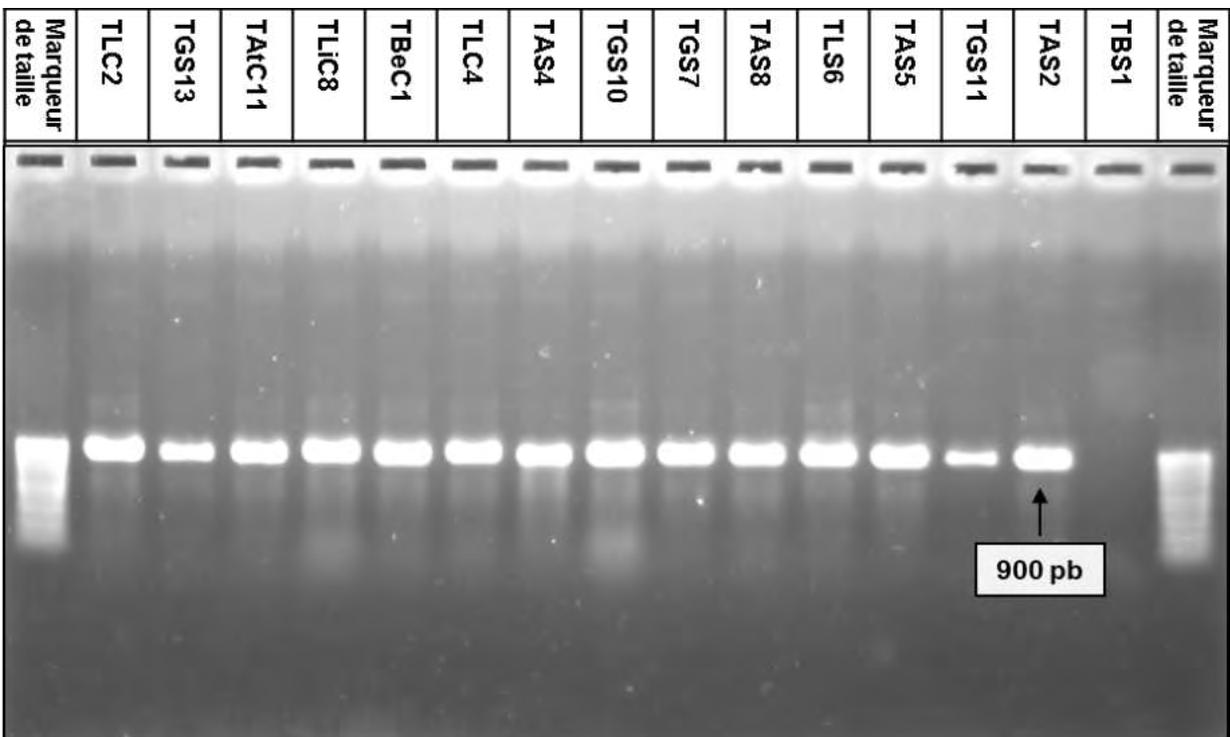


Fig. 29 : Profils électrophorétiques obtenus avec les paires d'amorces (acl1-230up et acl1-1220low).

5.4.2 Comparaison nucléotidique

Les séquences obtenues lors de ce travail (**Tableau 15**) ont été comparées avec les séquences présentes dans NCBI en utilisant le programme du BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et soumises aussi aux programmes TrichOKEY (<http://isth.info/tools/molkey/index.php>) et TrichoBLAST (<http://isth.info/tools/blast/index.php>) de ISTH. Les résultats ayant la plus haute similarité avec les séquences obtenues lors de cette étude ont été sélectionnés pour l'identification de l'espèce.

Ainsi, Les isolats TAS2, TAS4, TAS5, TAS8 ont montré une similitude de 99 % avec les séquences de référence de l'espèce *T. afroharzianum*, du clade *Harzianum* pour les gènes *tef1* (KP008850) et *rpb2* (FJ442691) et de 96 % avec l'espèce *T. simmonsii*, membre du clade *Harzianum* pour le gène *acl1* (KJ665182). L'isolat TBeC1 présente 99 % d'identité nucléotidique avec les séquences de référence de l'espèce *T. breve*, du clade *Harzianum* pour les gènes *tef1* (KY688046) et *rpb2* (KY687983) et 97 % avec l'espèce *T. guizhouense* pour le gène *acl1* (KJ665030). L'isolat TLiC8 présente 99 % d'identité nucléotidique avec les séquences de référence de l'espèce *T. lixii*, du clade *Harzianum* pour le *tef1* (FJ716622) et *rpb2* (KJ665290) et 98 % avec l'espèce *T. atrobrunneum* pour le gène *acl1* (KJ664949). Cependant les séquences ITS de ces isolats ont été identifiés comme étant des *T. harzianum* / *H. lixii* et elles ont montré 100 % de similitude avec plusieurs espèces du clade *harzianum*.

Les isolats TLS6, TLC2 et TLC4 ont montré une similitude de 99 % avec les séquences de référence de l'espèce *T. longibrachiatum*, membre du clade longibrachiatum pour les 03 gènes *tef1* (JQ685867), *Rpb2* (JQ685883) et *acl1* (KJ665057). Cependant, pour le gène ITS, Ils ont été identifiés comme étant *T. longibrachiatum* et ont montré un pourcentage de similitude de 100 % avec plusieurs espèces appartenant au clade Longibrachiatum.

Les isolats TGS11 et TGS13 ont montré une similitude de 99 % avec les séquences de référence de l'espèce *T. gamsii*, membre du clade viride pour le gène *tef1* (JN715613, EF488134). De plus, les isolats TGS7 et TGS10 ont montré une similitude de 99 % avec la séquence de référence de l'espèce *T. gamsii* pour le gène *acl1* (KJ665025). L'isolat TAtC11 a montré une similitude de 99 % avec les séquences de référence de l'espèce *T. atroviride*, du clade viride pour les gènes *tef1* (MH176994), *rpb2* (FJ860518) et *acl1* (KJ664952). Tandis que, pour le gène ITS, ils ont été identifiés comme des espèces appartenant au clade viride et un pourcentage de similitude de 100 % avec plusieurs espèces de ce clade.

L'isolat TBS1 a montré une similitude de 99 % avec les séquences de référence de l'espèce *T. brevicomcompactum*, du clade Brevicomcompactum pour le gène *tef1* (EU338292, EU338283), il a été identifié comme étant *T. brevicomcompactum* et il a montré 100 % d'identité avec plusieurs espèces du clade Brevicomcompactum.

Résultats

Tableau 15 : Origine, identification et code accession GenBank des isolats de *Trichoderma* spp. étudiés.

Code isolat	Source	Région	Identifiés comme	Code accession GenBank			
				ITS	<i>tefl</i>	<i>rpb2</i>	<i>acl1</i>
TBS1	Rhizosphère, fraisier	Tipaza	<i>T. brevicompactum</i>	MT041658	MT069952	-	-
TAS2	Rhizosphère, fraisier	Tipaza	<i>T. afroharzianum</i>	MT041662	MT069945	MT069957	MT075924
TAS4	Rhizosphère, fraisier	Tipaza	<i>T. afroharzianum</i>	MT041659	MT069954	MT069955	MT075922
TAS5	Rhizosphère, fraisier	Tipaza	<i>T. afroharzianum</i>	MT041660	MT069944	MT069956	MT075925
TLS6	Rhizosphère, fraisier	Tipaza	<i>T. longibrachiatum</i>	MT041661	MT069951	MT069959	MT069962
TGS7	Rhizosphère, tomate	Alger	<i>T. gamsii</i>	-	-	-	MT075921
TAS8	Rhizosphère, tomate	Alger	<i>T. afroharzianum</i>	MT041663	MT069946	MT069958	MT075923
TGS10	Rhizosphère, tomate	Alger	<i>T. gamsii</i>	MT041664	-	-	MT075920
TGS11	Rhizosphère, vigne	Boumerdes	<i>T. gamsii</i>	MT041665	MT069947	-	-
TGS13	Rhizosphère, vigne	Boumerdes	<i>T. gamsii</i>	-	MT069948	-	-
TLC2	Bio-composte®	Bejaia	<i>T. longibrachiatum</i>	-	MT069950	-	MT069963
TLC4	Bio-composte®	Bejaia	<i>T. longibrachiatum</i>	MT041666	MT069949	MT069960	MT069964
TBeC1	Bio-composte®	Bejaia	<i>T. breve</i>	MT584657	-	MT587314	MT587316
TLiC8	Bio-composte®	Bejaia	<i>T. lixii</i>	MT584658	MT587276	MT587315	MT587317
TAtC11	Bio-composte®	Bejaia	<i>T. atroviride</i>	MT041667	MT069953	MT069961	MT069965

(-) signifie absence de code accession pour l'isolat / gène en question.

5.4.3 Analyse phylogénétique

Des arbres phylogénétiques ont été construits pour chacun des quatre gènes étudiés, avec les séquences des quinze isolats algériens et les séquences de références téléchargées de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ainsi, les arbres des gènes *tef1*, *rpb2* et *acl1* ont révélé une même distribution phylogénétique des séquences obtenues lors de ce travail et la présence de quatre clades distincts.

Le premier est le clade *Harzianum* dans lequel on trouve les isolats TAS2, TAS4, TAS5 et TAS8, TBeC1 et TLiC8 pour les arbres phylogénétiques des gènes (*tef1*, *rpb2* et *acl1*), les quatre premiers isolats sont étroitement liés à la souche de référence de l'espèce *T. afroharzianum* (G.J.S. 04-186). L'isolat TBeC1 est étroitement lié à la souche de référence de l'espèce *T. breve* (HMAS:248844) et l'isolat TLiC8 était étroitement lié à la souche de référence de l'espèce *T. lixii* (G.J.S.97-96 = CBS 110080) (**Fig. 30, 31, 32**).

Le deuxième est le clade Longibrachiatum dans lequel on trouve les isolats TLS6, TLC2 et TLC4, qui sont étroitement liés à la souche de référence de *T. longibrachiatum* (S328) pour les 3 arbres (*tef1*, *rpb2* et *acl1*). Le troisième clade est celui de Viride, dans lequel on trouve les isolats TGS7, TGS10, TGS11, TGS13 et TAtC11, les quatre premiers sont étroitement liés aux souches de références de *T. gamsii* et l'isolat TAtC11 est étroitement lié aux souches de références de *T. atroviride* (S360). Le quatrième, est le clade Brevicompectum dans lequel on trouve l'isolat TBS1 qui est étroitement lié aux souches de références de *T. brevicompectum* (G.J.S.04-381 ; GJS 04-380 ; GJS 05-178) (**Fig. 30, 31, 32**).

Cependant, L'arbre ITS a révélé une même distribution phylogénétique concernant les clades, mais ayant placé les espèces différemment, les isolats TAS2, TAS4, TAS5, TAS8 ont été classé avec l'espèce *T. pyramidale*. Les isolats TLS6 et TLC4 ont été classé avec l'espèce *T. orientale*. L'isolat TBS1 a été classé avec l'espèce *T. turrialbense*. Les Isolats TAtC11, TGS10 et TGS11 ont été classés avec *T. scalesiae* (**Fig. 33**).

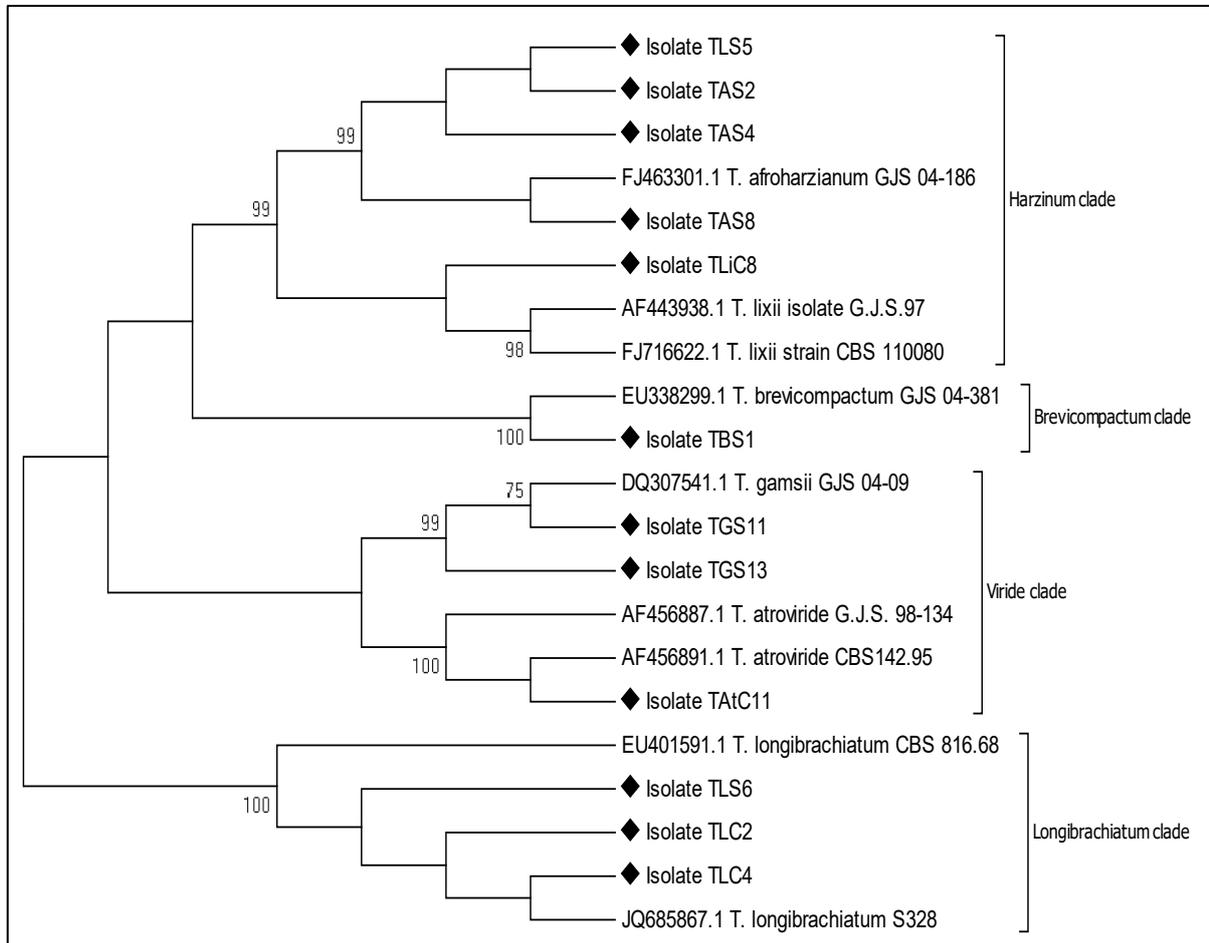


Fig. 30 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de *Trichoderma* spp. construit sur la base de l'analyse des séquences *tef1*. Les branches supportées à plus de 75 % pour 1000 bootstrap sont précédées d'un chiffre qui représente le pourcentage par lequel cette branche est supportée. ♦ : Symbolise les isolats algériens de la présente étude.

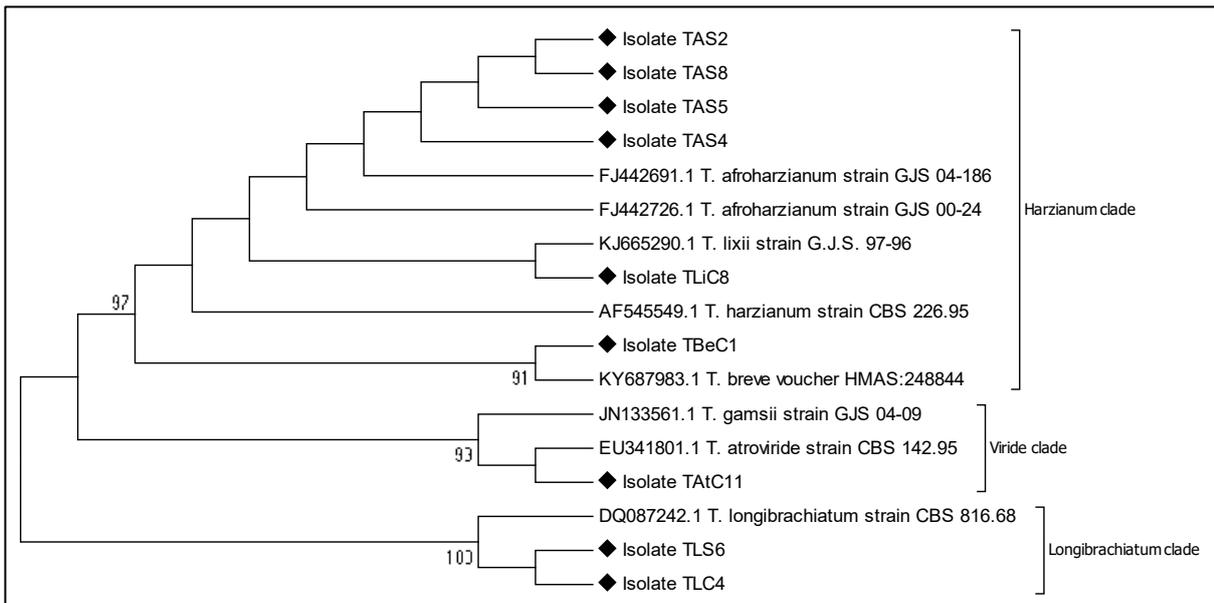


Fig. 31 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de *Trichoderma* spp. construit sur la base de l'analyse des séquences *rpb2*. Les branches supportées à plus de 75 % pour 1000 bootstraps sont précédées d'un chiffre qui représente le pourcentage par lequel cette branche est supportée. ◆ : Symbolise les isolats algériens de la présente étude.

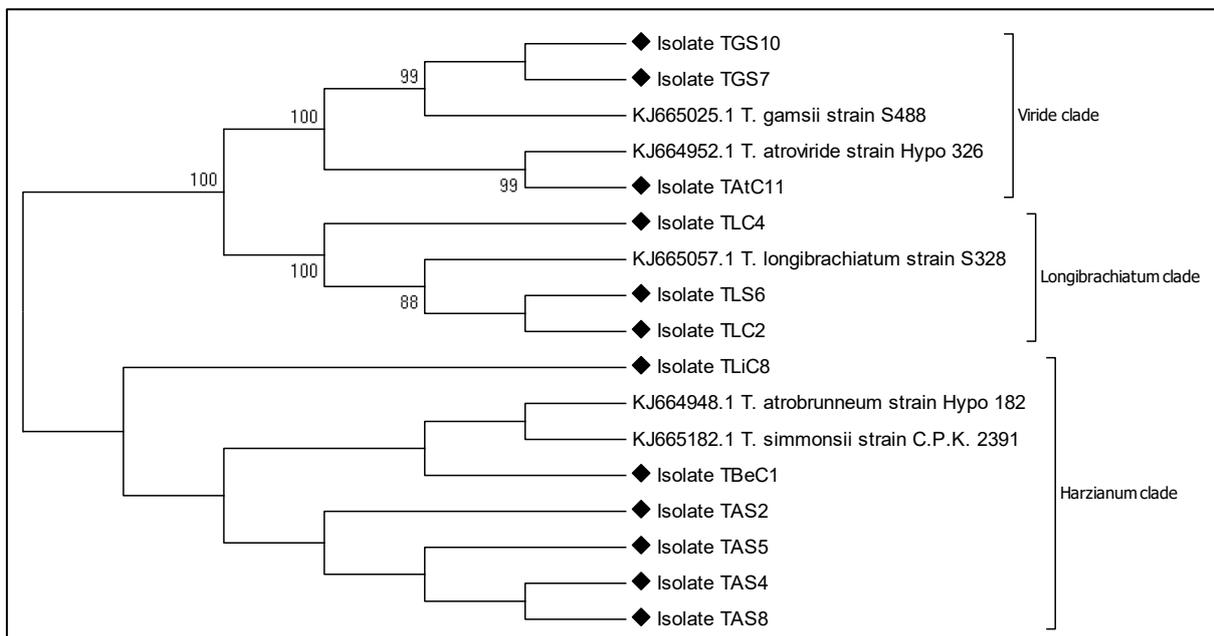


Fig. 32 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de *Trichoderma* spp. construit sur la base de l'analyse des séquences *Acl1*. Les branches supportées à plus de 75 % pour 1000 bootstraps sont précédées d'un chiffre qui représente le pourcentage par lequel cette branche est supportée. ◆ : Symbolise les isolats algériens de la présente étude.

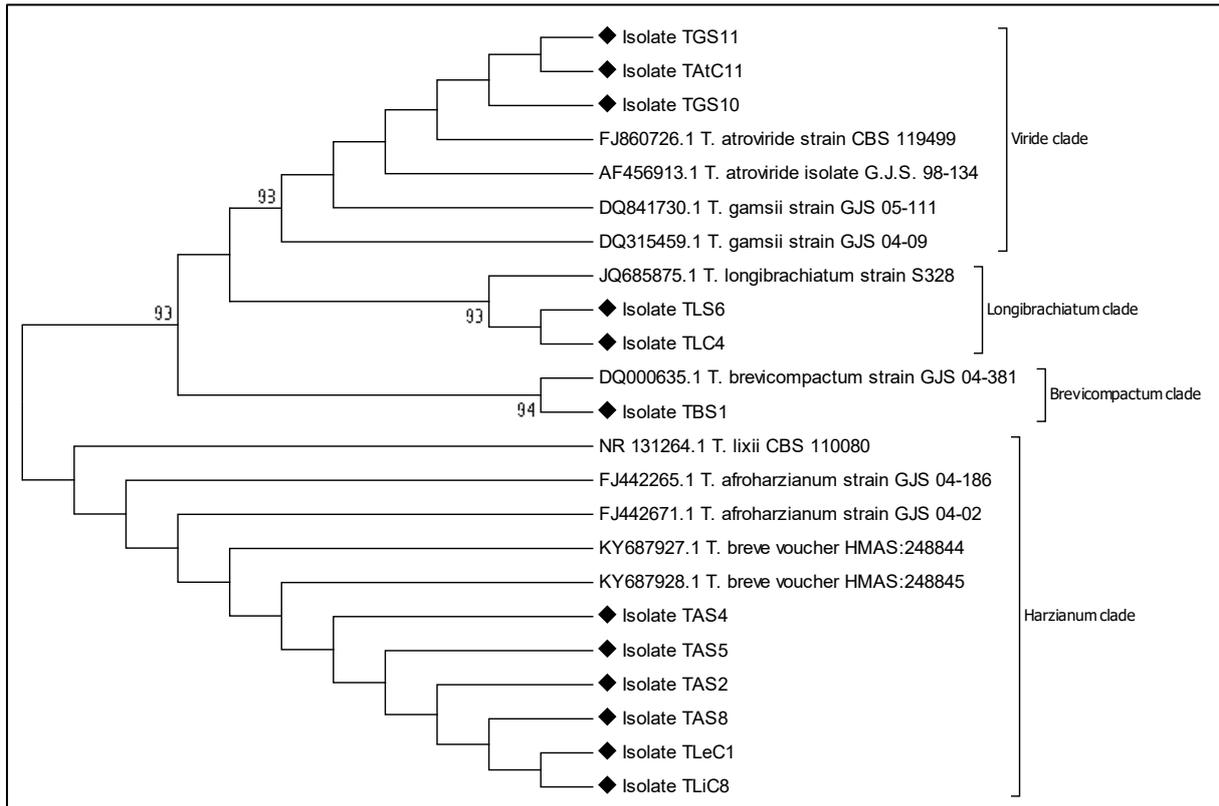


Fig. 33 : Arbre phylogénétique (neighbor-joining) de *Trichoderma* spp. construit sur la base de l'analyse des séquences ITS. Les branches supportées à plus de 75 % pour 1000 bootstrap sont précédées d'un chiffre qui représente le pourcentage par lequel cette branche est supportée. ◆ : Symbolise les isolats algériens de la présente étude.

5.5 L'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. vis-à-vis des isolats de *Botrytis cinerea*

5.5.1 Effet antagoniste *in vitro*

5.5.1.1 Confrontation directe :

Dans le test de confrontation directe *in vitro*, l'inhibition de la croissance mycélienne de *B. cinerea* a été mise en évidence après 5 jours d'incubation à $20 \pm 1^\circ \text{C}$ et à l'obscurité. Les 15 souches de *Trichoderma* spp. ont inhibé considérablement la croissance mycélienne des trois isolats de *B. cinerea* par rapport aux témoins sans *Trichoderma* spp. avec un intervalle qui varie de 53 à 65 % d'inhibition sur le milieu PDA. L'analyse de la variance de l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* est très hautement significative ($P = 0,0000001 < 0,0001$) (**Annexe 10**). Les meilleurs résultats d'inhibition ont été enregistrés chez les souches TGS7 ($62,27 \pm 2,75 \%$), TAtC11 ($61,97 \pm 2,27 \%$), TLS6 ($61,60 \pm 1,94$) et TGS10 ($61,36 \pm 2,07$) appartenant à *T. gamsii*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* et *T. gamsii*, respectivement. Cependant les souches TLC2 et TLC4 de *T.*

longibrachiatum et la souche TBeC1 de *T. breve* ont montré les taux d'inhibition les plus faibles, qui varient de 54 à 57 % (Fig. 34 et 35).

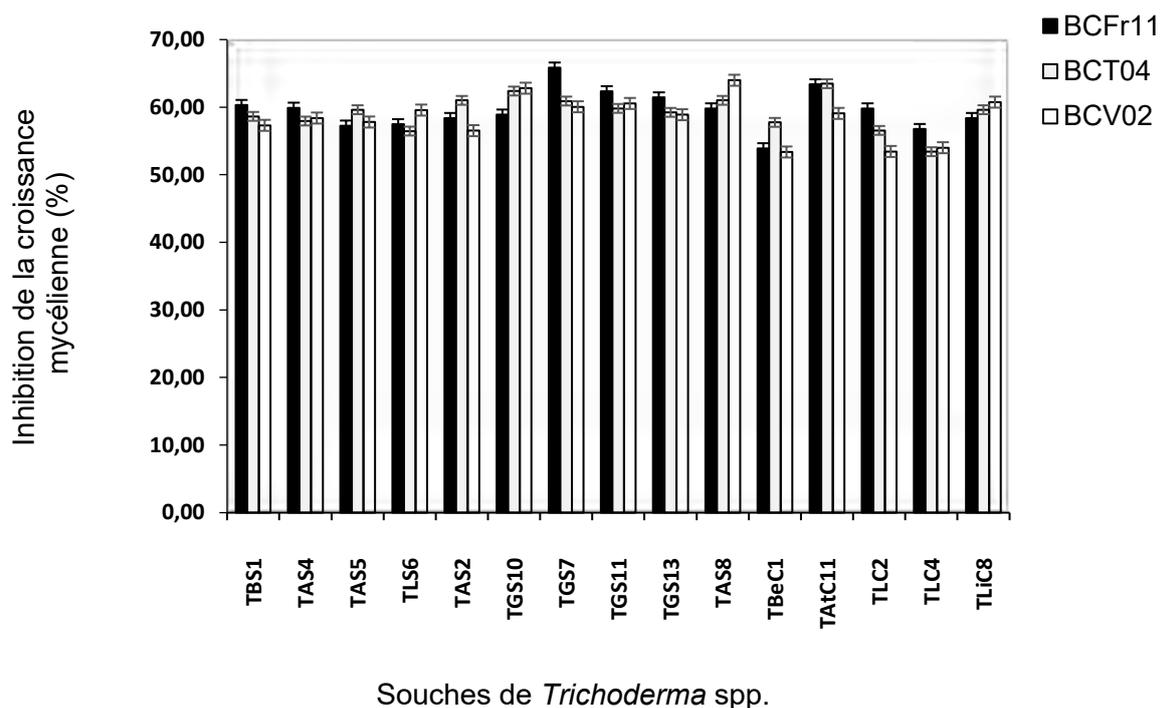


Fig. 34 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois isolats de *B. cinerea* causée par quinze souches de *Trichoderma* spp. en confrontation directe. Les valeurs sont la moyenne des répétitions techniques et biologiques (\pm écart type « SE »).



Fig. 35 : Effets des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* (BCFr11, BCT04 et BCV02) en confrontation directe *in vitro*. TM : témoin sans *Trichoderma* spp.

5.5.1.2 Confrontation indirecte

L'analyse des résultats ont révélé une différence hautement significative ($P = 0.001 < 0.01$) de l'effet des substances volatiles produites par les isolats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* testés (**Annexe 11**). Les meilleurs taux d'inhibition ont été enregistrés avec les substances volatiles produites par les souches *T. gamsii* (l'isolat TGS7) et *T. atroviride* (l'isolat TAtC11) qui ont réduit la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* de 64,49 % et de 62,31 % respectivement, par rapport au témoin sans *Trichoderma*. Tandis que, le taux d'inhibition le plus faible a été enregistrés chez l'isolat *T. longibrachiatum* (isolat TLS6) et l'isolat *T. afroharzianum* (TAS4), respectivement (**Fig. 36 et 37**).

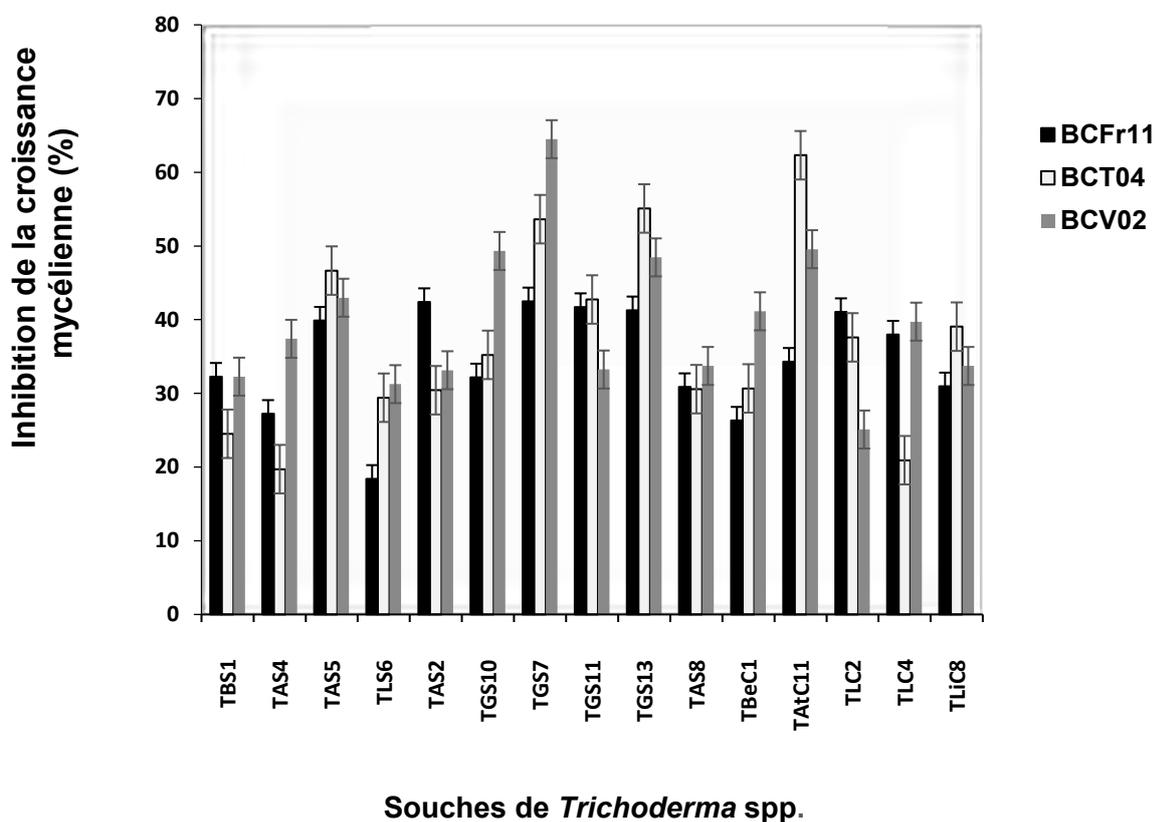


Fig. 36 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de trois isolats de *B. cinerea* causée par quinze souches de *Trichoderma* spp. en confrontation indirecte.

Les valeurs sont la moyenne des répétitions techniques et biologiques (\pm écart type « SE »).

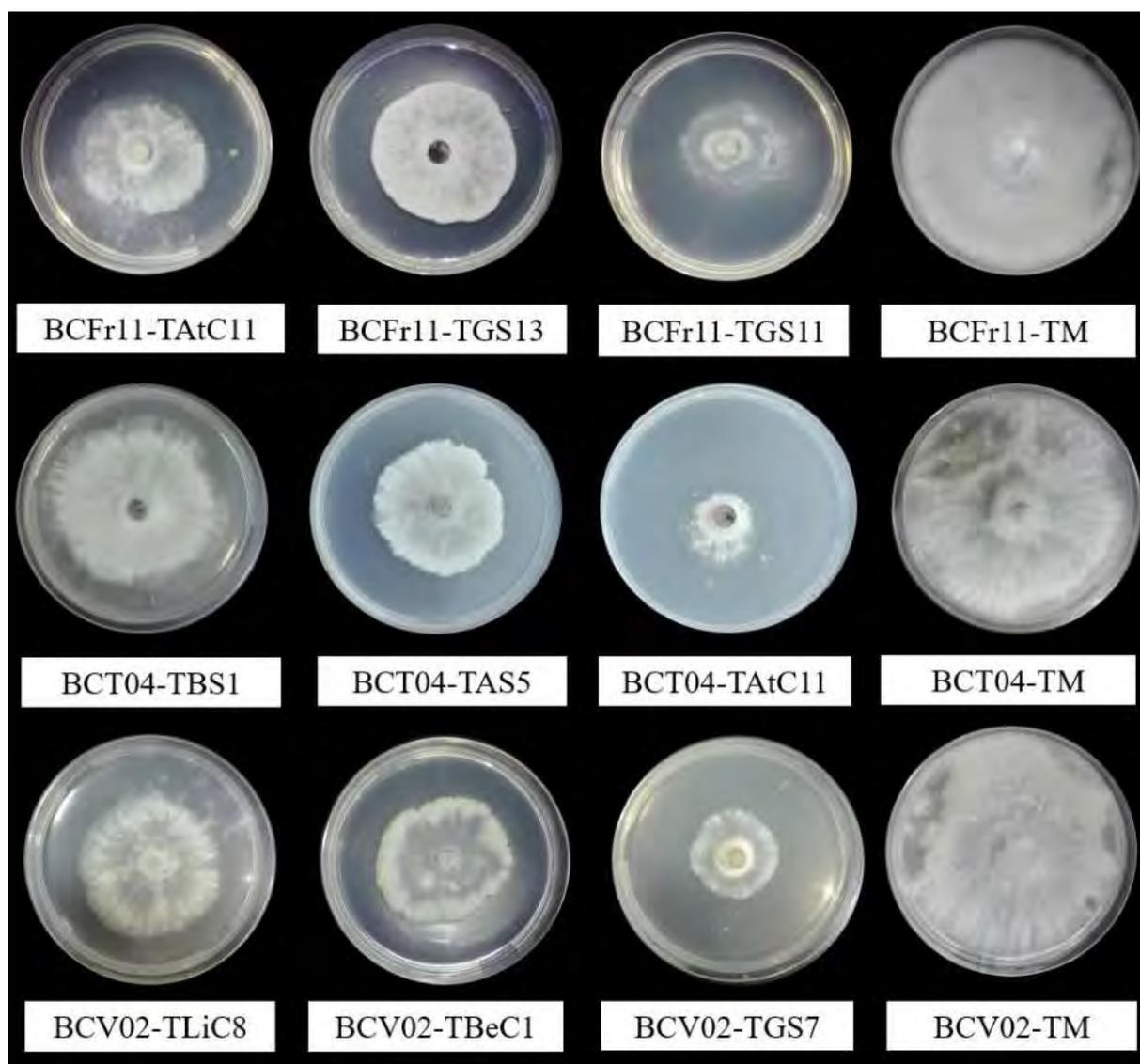


Fig. 37 : Effets des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* (BCFr11, BCT04 et BCV02) en confrontation indirecte *in vitro*.

TM : témoin sans *Trichoderma* spp

5.5.2 Filtrat de cultures

L'effet des filtrats de culture de 15 isolats de *Trichoderma* spp. testés sur la germination des spores des souches BCV02, BCT04 et BCFr10 de *B. cinerea* a été évalué en néphélomètre *in vitro*. L'analyse de la variance des résultats de l'effet des filtrats de culture sur l'inhibition de la croissance germinale montre une différence hautement significative ($P \leq 0,001$) pour les facteurs étudiés (Isolats *B. cinerea* / filtrats *Trichoderma*) et une différence non significative ($P > 0,05$) pour leur interaction (**Annexe 12**).

Les meilleurs pourcentages d'inhibition ont été enregistrés chez les filtrats de culture des isolats de *T. brevicompactum* (TBS1) avec un pourcentage d'inhibition de 90,68 % et *T. atroviride*

(TAtC11) avec un pourcentage d'inhibition de 68,72 %, suggérant un fort effet antifongique des filtrats de ces deux isolats. Alors que, les filtrats de 12 isolats de *Trichoderma* spp. ont révélé une stimulation de la germination des spores de *B. cinerea* pour les trois isolats testés (BCV02, BCT04, BCFr11) par rapport au témoin sans *Trichoderma* avec un pourcentage de stimulation qui varie de 4,25 à 46,31 %, le plus haut pourcentage de stimulation a été enregistré chez les isolats de *T. longibrachiatum* (TLS6 et TLC2) (**Fig. 38**).

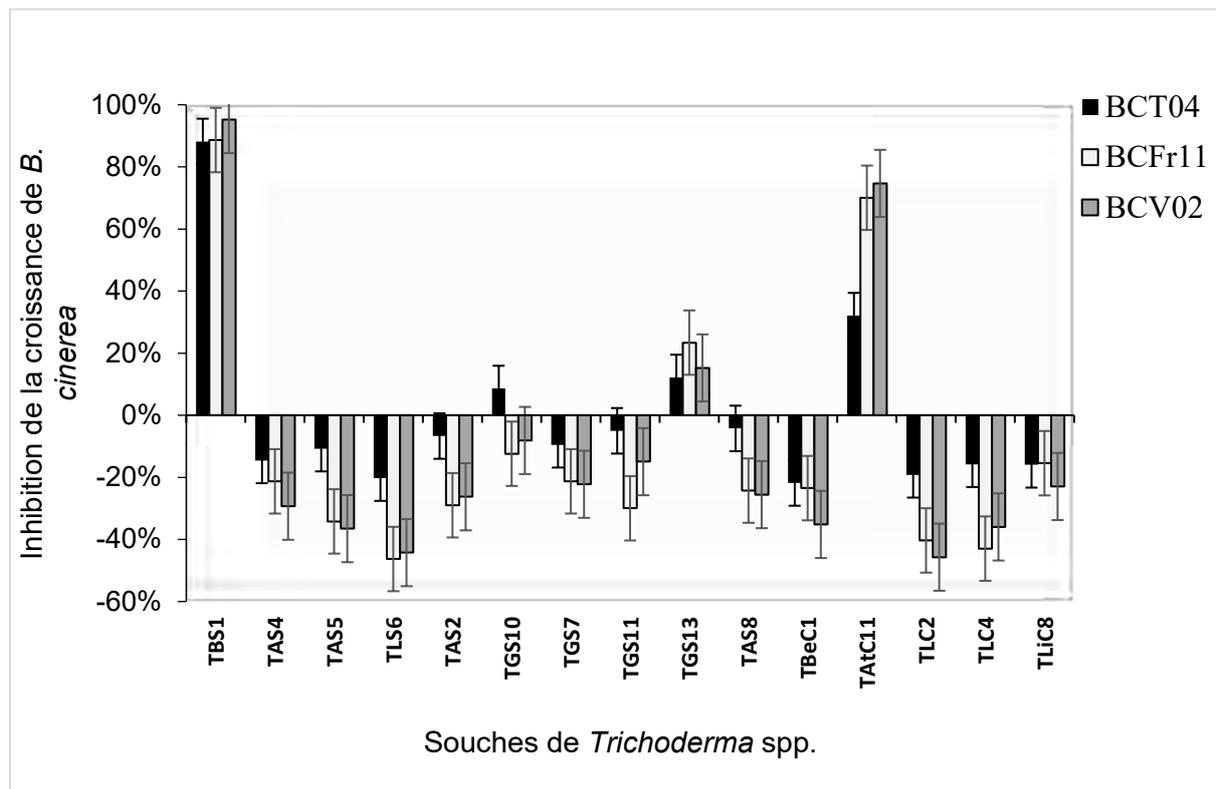


Fig. 38 : Effet des filtrats de cultures de quinze isolats de *Trichoderma* spp. sur la germination des spores et de croissance mycélienne des jeunes hyphes de trois isolats de *B. cinerea*. Les valeurs sont la moyenne des répétitions techniques et biologiques (\pm écart type « SE »).

5.6 Effet des isolats de *Trichoderma* sur la germination des graines et plantules de tomate :

5.6.1 Effet des suspensions de spore de *Trichoderma* spp.

Le pourcentage de germination des graines et l'indice de vigueur (Seedling Vigor) a été calculé après sept (07) jours d'incubation. L'analyse de la variance a révélé une différence hautement significative ($P = 0,001 < 0,01$) pour l'indice de vigueur des plantules de tomates et une corrélation positive a été observée entre le pourcentage de germination et l'indice de vigueur (**Annexe 13**). Les isolats TAS2 et TBS1 ont montré les meilleurs résultats en biostimulation de la germination des graines et l'élongation de l'hypocotyle et de la racine par rapport au témoin

avec un indice de vigueur de 6520 et 4943, respectivement. Cependant, Les isolats TGS10, TGS13 et TGS11 ont montré un indice de vigueur inférieur à celui du témoin, ce qui révèle un effet inhibiteur de ces isolats sur la germination des graines et la croissance des plantules de tomate (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Effet des suspensions de spores des isolats de *Trichoderma* spp. sur la germination et l'indice de vigueur des graines de tomates. Les isolats sont classés par ordre décroissant de l'indice de vigueur.

Isolats	Pourcentage de graines germées(G)	Indice de vigueur (SG)
TAS2	87,18 ± 2,01	6520 ± 202,73
TBS1	82,96 ± 2,43	4943 ± 303,21
TLS6	74,37 ± 2,14	4127 ± 99,73
TGS7	72,63 ± 1,48	3772 ± 192,19
TLC2	74,54 ± 3,69	3825 ± 134,33
TLiC8	75,31 ± 1,07	3674 ± 162,06
TAS8	71,39 ± 1,59	3276 ± 49,62
TAS4	63,71 ± 2,35	3145 ± 118,50
TLC4	70,73 ± 1,66	3152 ± 5,53
TAS5	53,67 ± 0,45	2111 ± 48,52
TBeC1	74,26 ± 1,38	1414 ± 116,50
TAtC11	58,64 ± 2,30	1434 ± 66,55
Témoin	69,83 ± 1,37	1186 ± 50,36
TGS10	62,91 ± 1,32	869 ± 71,55
TGS13	58,08 ± 1,83	354 ± 48,12
TGS11	53,10 ± 1,08	312 ± 14,35

5.6.2 Effet des composés volatils des isolats de *Trichoderma* spp.

Le pourcentage de germination des graines et l'indice de vigueur (Seedling Vigor) ont été calculés après huit (08) jours d'incubation (4 jours à l'obscurité et à une température de 23 ± 2 °C et 4 jours dans un incubateur à 25 °C et à 16 H lumière / 8 H obscurité). L'analyse de la variance sur les résultats de l'effet des VOCs sur les graines de tomate a révélé une différence très hautement significative ($P = 0,0000001 < 0,001$) (**Annexe 14**).

Les composés volatils de 7 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré un indice de vigueur supérieur à celui du témoin, ce qui peut s'expliquer par un effet biostimulant sur la germination des graines et l'élongation de l'hypocotyle et de la racicule des plantules de tomates, les meilleurs résultats ont été observés chez les VOCs des isolats *T. longibrachiatum* (TLC4) et *T. afroharzianum* (TAS4, TAS5) avec un indice de vigueur de 6479,77; de 6278,64 et de 6231,21 respectivement. Tandis que, les composés volatils de 8 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré

un effet inhibiteur sur la germination et l'indice de vigueur des plantules de tomate. L'indice de vigueur le plus faible a été enregistré chez les VOCs de l'isolat *T. gamsii* (TGS13) avec 24,73 et seulement 13,33 % de graines ont germé. Le **tableau 17** représente les pourcentages de germination ainsi que les indices de vigueur engendrés par les composés volatils des isolats étudiés.

Tableau 17 : Effet des composés volatils des isolats de *Trichoderma* spp. sur la germination et l'indice de vigueur des graines de tomates. Les isolats sont classés par ordre décroissant de l'indice de vigueur.

Isolats	Pourcentage de Germination (G%)	Indice de vigueur (IV)
TLS6	96,67 ± 5,77	6133,47 ± 2296,18
TAS5	100,00 ± 0,00	6231,21 ± 2124,00
TLC4	100,00 ± 0,00	6479,77 ± 1409,02
TAS4	98,33 ± 1,44	6278,64 ± 1087,25
TLC2	97,50 ± 4,33	5414,08 ± 1233,03
TBeC1	100,00 ± 0,00	5421,17 ± 1004,61
TAS2	100,00 ± 0,00	4974,07 ± 780,31
Témoin	99,17 ± 1,44	4933,50 ± 608,53
TLiC8	97,50 ± 2,50	4460,08 ± 647,01
TAS8	100,00 ± 0,00	1731,97 ± 885,27
TBS1	90,00 ± 7,50	1327,69 ± 784,05
TGS11	99,17 ± 1,44	1581,21 ± 340,97
TAtC11	96,67 ± 3,82	1300,88 ± 443,82
TGS10	97,50 ± 2,50	1168,65 ± 262,18
TGS7	91,67 ± 6,29	949,20 ± 334,96
TGS13	13,33 ± 23,09	24,73 ± 42,83

5.6.3 Effet des filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp.

Les filtrats de culture de 15 isolats de *Trichoderma* spp. ont été testés *in vitro* sur les graines de tomates afin d'évaluer leurs effet sur la germination et sur la croissance de la racine et de l'hypocotyle des plantules. Au terme de huit jours d'incubation (4 jours à l'obscurité et 4 jours à une photopériode de 16 h lumière et 8 h d'obscurité), les pourcentages de germinations des graines ainsi que l'indice de vigueur ont été calculés. L'analyse de la variance des résultats de ce test ont montré une différence très hautement significative pour les pourcentages de germinations des graines ($P = 0,0000001 < 0,001$) et une différence non significative ($P > 0,05$) de l'indice de vigueur (**Fig. 39**) (**Annexe 15**).

Un effet biostimulant sur la germination des graines et l'élongation de l'hypocotyle et de la racine des plantules de tomates a été enregistré chez les filtrats de culture de 12 isolats de *Trichoderma* spp. avec un indice de vigueur supérieur à celui du témoin. L'indice de vigueur le

plus important a été enregistré chez l'isolat *T. brevicompactum* (TBS1) et *T. afroharzianum* (TAS5) avec 8722,82 et 7745,45 respectivement. Cependant, un effet inhibiteur a été enregistré chez les filtrats de culture des isolats (TAS8, TLiC8 et TLC2) qui ont montré un indice de vigueur inférieur à celui du témoin. Le **tableau 18** représente les pourcentages de germination ainsi que les indices de vigueur engendrés par les différents filtrats de culture.

Tableau 18 : Effet des filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp. sur la germination et l'indice de vigueur des graines de tomates. Les isolats sont classés par ordre décroissant de l'indice de vigueur.

Isolats	Pourcentage de Germination (G%)	Indice de vigueur (IV)
TBS1	100,00 ± 0,00	8722,82 ± 780,31
TAS5	100,00 ± 0,00	7745,45 ± 1020,06
TLC4	94,44 ± 1,92	7639,02 ± 1074,65
TGS13	93,33 ± 3,33	7615,08 ± 194,98
TAS2	96,67 ± 3,33	7441,04 ± 1324,36
TGS10	93,33 ± 3,33	7429,62 ± 1451,93
TLS6	92,22 ± 3,85	7339,50±534,44
TBeC1	94,44 ± 5,09	7325,52 ± 1556,01
TGS11	97,78 ± 1,92	7298,86 ± 473,13
TGS7	95,55 ± 3,86	7120,64±1211,47
TAtC11	97,78 ± 1,92	7022,48 ± 1488,05
TAS4	95,56 ± 1,92	6995,39 ± 609,72
Témoin	91,11 ± 1,92	6863,71 ± 544,98
TAS8	95,55 ± 1,93	6733,56±251,83
TLiC8	96,67 ± 0,00	6610,10 ± 1126,42
TLC2	95,55 ± 1,93	5254,27 ± 488,50

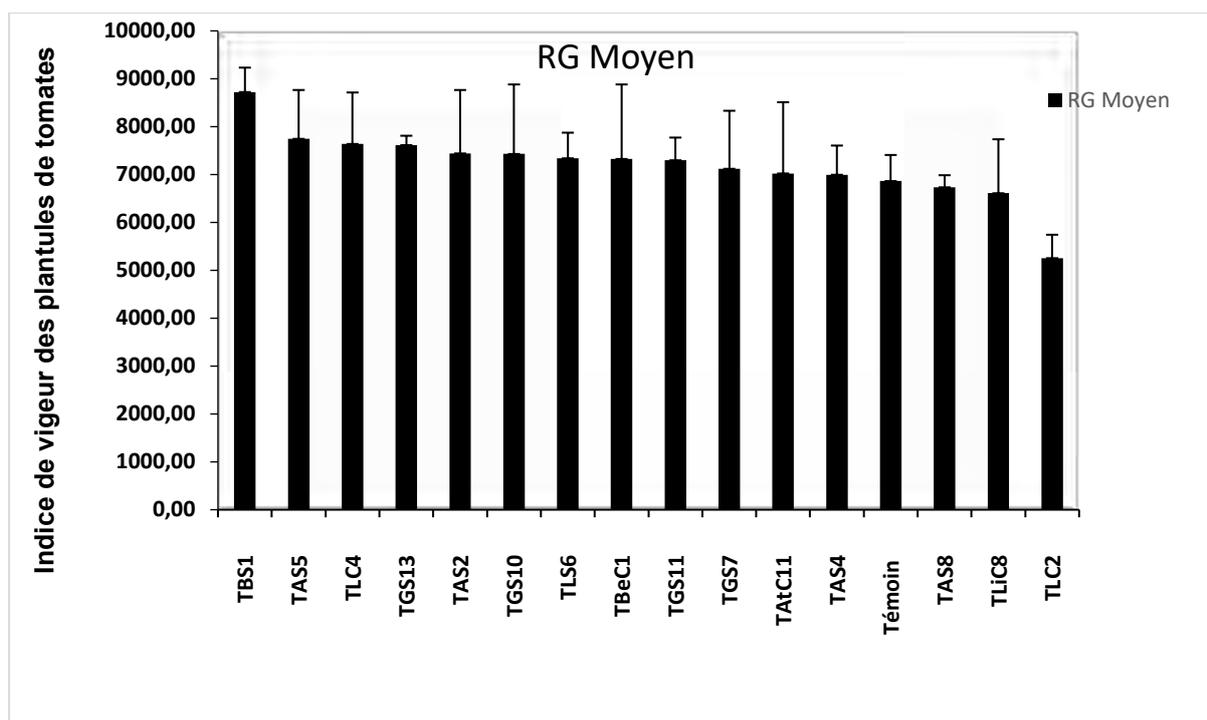


Fig. 39 : Effet des filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp. sur l'indice de vigueur des graines de tomates

5.7 Essai de biocontrôle *in vivo* sur des plants entiers de tomates (*in planta*)

L'effet des suspensions de spores de *T. atroviride* (TAtC11), de *T. brevicompactum* (TBS1) et de *T. lixii* (TLiC8) sur le contrôle de la maladie causée par *B. cinerea* (BCT04) a été évalué *in planta* sur des plants entiers de tomate de la variété KAWA « Variété ayant montré le plus haut degré de sensibilité parmi les huit variétés utilisées dans l'étude de Bouzit (2018).

Les résultats de l'indice de sévérité de la maladie calculé pour les 7 traitements effectués montrent que le témoin positif a enregistré l'indice de maladie le plus élevé, les plants ayant reçu une pulvérisation par des suspensions de spores de *B. cinerea*, 24 h après, une pulvérisation par des suspensions de spores de *Trichoderma* spp. (Traitement Curatif) ont montré un indice de sévérité de la maladie nettement supérieur à ceux traités par une suspension de spores de *Trichoderma* spp., 24 h après, pulvérisés par des suspensions de spores de *B. cinerea* (Traitement Préventif) (**Fig. 40**).

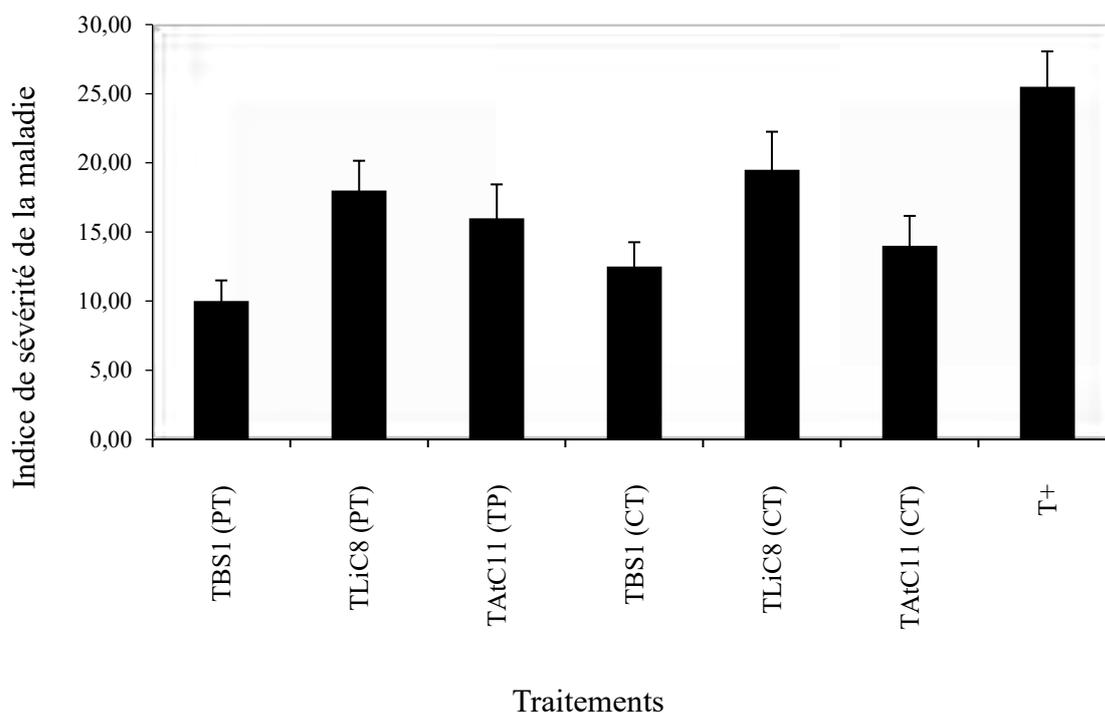


Fig. 40 : Indice de sévérité de la maladie causée par l'isolat *B. cinerea* (BCT04) sur les plantes de la tomate (Variété de Kawa).

CT : Traitement curatif ; PT : Traitement Préventif ; Les plants ont été traités avec les suspensions de spores des isolats TBS1, TAAtC11 et TLiC8 de *Trichoderma* spp. ; Le témoin positif est représenté par T+ (\pm écart type « SE »).

Une activité de biocontrôle a été observée chez les trois souches de *Trichoderma* testées (TBS1, TAAtC11, TLiC8) pour le traitement préventif et pour le traitement curatif. Par contre, pour les trois espèces utilisées, l'efficacité du contrôle biologique a été plus importante en traitement préventif qu'en traitement curatif, suggérant ainsi, que l'utilisation de nos souches en traitement biologique est préférable qu'il soit en application préventive pour lutter efficacement contre la maladie de la pourriture grise.

L'analyse de la variance des résultats de l'effet du traitement sur le contrôle de la maladie a révélé une différence très hautement significative ($P = 0,0000001 < 0,001$) et une corrélation positive a été observée entre l'indice de la maladie et l'effet du traitement sur le contrôle de la maladie (**Annexe 16**). De ce fait, les pourcentages les plus élevés de l'efficacité du contrôle biologique ont été enregistrés chez la souche (TBS1) de *T. brevicompactum*, $64,43 \pm 4,34$ % en traitement préventif et $51,35 \pm 1,56$ % en curatif, tandis que, les pourcentages de l'efficacité du contrôle biologique les plus faibles ont été enregistrés chez la souche TLiC8 de *T. lixii* avec $34,19 \pm 4,54$ % en traitement préventif et seulement $28,46 \pm 8,93$ % en traitement curatif (**Fig.**

41). Sur la base de ces résultats, *T. brevicompactum* (TBS1) semble être l'isolat le plus efficace en contrôle de la pourriture grise sur plants entiers de tomate causée par *B. cinerea* (BCT04).

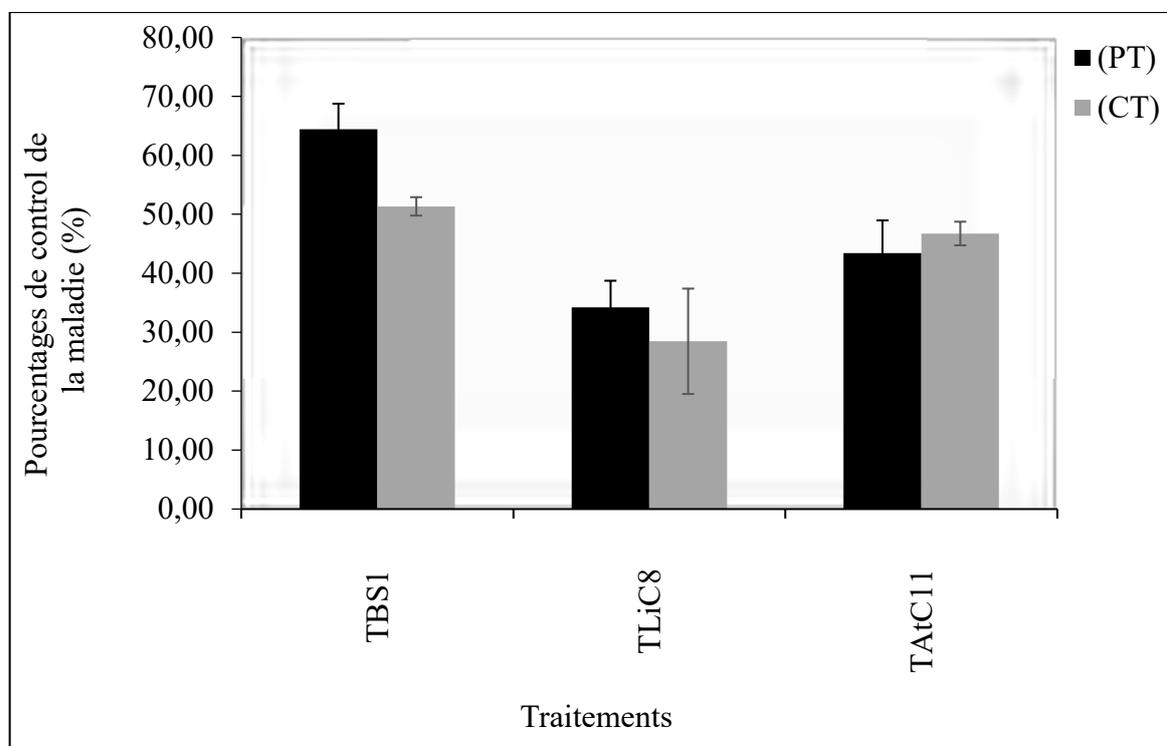


Fig. 41 : Résultat de l'effet du contrôle biologique des plants de tomate contre la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* (BCT04). PT : Traitement Préventif ; CT : Traitement curatif.

Par l'utilisation des isolats de *Trichoderma* spp. (TBS1, TAAtC11, TLiC8). Les tests ont été réalisés sur des plants de tomates de 30 jours (variété Kawa). Deux modalités de traitement ont été appliquées, le traitement préventif (TP) et le traitement curatif (CT). Les valeurs correspondent à la moyenne de 30 répétitions (\pm SE).

Discussion

6 Discussion :

B. cinerea est reconnu comme un agent phytopathogène à haut risque, les pertes économiques dues à ce pathogène dépassent 2 milliards d'euros par an (Dean et al., 2012). A présent, le contrôle de ce phytopathogène est essentiellement chimique, mais en raison de sa large variabilité génétique et de ses capacités d'adaptation, une résistance acquise a été observée avec tous les fongicides utilisés contre la moisissure grise (Angelini et al., 2016). Ceci à inciter la communauté scientifique à s'orienter vers d'autres méthodes de lutte alternatives dont la lutte biologique, par utilisation des agents antagonistes (Nicot et al., 2011).

La taille des conidies est considérée comme un critère de discrimination entre les espèces appartenant au genre *Botrytis*, la taille et la couleur des sclérotés peuvent être aussi un bon critère d'identification des espèces du genre *Botrytis*, notamment celles de *B. cinerea* et de *B. fabae*, quant à la couleur et l'aspect des colonies sont moins significatifs en raison de leur variation au sein d'un même isolat (Harrison, 1983).

Les résultats de la mensuration et l'aspect des conidies des isolats obtenus à partir des cultures de fève ont révélé que les conidies sont de forme Ovoïde à Elliptique et la taille des conidies est de 7,5-12,1 x 6,5-11,2 µm. Des résultats similaires ont été décrits dans la bibliographie pour les isolats identifiés comme des isolats de *Botrytis cinerea* (Zhang et al., 2010).

L'analyse des sclérotés est un élément indispensable pour la détermination des morphotypes (Martinez et al., 2003), mais aussi ils ont un rôle important dans l'identification des espèces du genre *Botrytis*. Les sclérotés de *Botrytis cinerea* sont relativement plus grands, peu nombreux et de couleur noire à duvet gris par contre ceux de *Botrytis Fabae* sont relativement petits, nombreux et de couleur noire (Zhang et al., 2010). De ce fait, Les isolats obtenus à partir de culture de fèves appartiennent probablement à *Botrytis cinerea*. Une étude moléculaire serait nécessaire pour une identification précise et fiable.

La caractérisation phénotypique et morphologique des isolats de *Botrytis cinerea* a révélé deux principaux groupes, un Mycélien caractérisé par l'absence totale de sclérote, représenté par 4 types (M1, M2, M3 et M4) et le second groupe est Sclérotien caractérisé par la production abondante de sclérote, il est représenté par cinq types à savoir S1, S2, S3, S4 et S5. Les résultats de notre étude ont montré que le pourcentage des isolats de type Sclérotien (54,80 %) est nettement supérieur à celui des isolats de type Mycélien (45,20 %). Aucun modèle spécifique n'a été observé entre l'origine géographique et les classes morphologiques. Des résultats semblables ont été obtenus par de nombreux auteurs (Khramtsov et al., 2002 ; Kuzmanovska et al., 2012 ; Kumari et al., 2014).

L'analyse de la variance de la vitesse de la croissance mycélienne de nos isolats de *B. cinerea* a révélé une différence hautement significative. Des résultats similaires ont été obtenus par Martinez et al. (2003) et Kumari et al. (2014) et ils ont constaté une grande variabilité de la vitesse de la croissance mycélienne chez les populations de *Botrytis cinerea* étudiées.

Les résultats du test du pouvoir pathogène de 73 isolats de *B. cinerea* effectué sur des demi-pommes de la variété Golden Delicious ont révélé une différence d'agressivité significative. Concordant ainsi avec les résultats de plusieurs études qui révèlent que les isolats de *B. cinerea* ne manifestent pas tous le même degré d'agressivité sur une même plante hôte (Decognet et al., 2009 ; Mirzaei et al., 2009 ; Kumari et al., 2014).

Le fenhexamide est un Botryticide inhibiteur de la biosynthèse des stérols, inhibe la 3-cétoréductase (Erg27) impliquée dans la déméthylation du C-4. L'analyse de la variance des résultats du test de la sensibilité au fenhexamide réalisé sur 73 isolats de *Botrytis cinerea* a révélé une variabilité hautement significative de la croissance mycélienne des isolats soumis aux différentes doses de fenhexamide.

La dose D2 (0,1 mg/l) de notre étude est décrite comme la dose discriminante qui est utilisée pour classer les isolats de *B. cinerea* entre sensibles (pourcentage d'inhibition est supérieur ou égale à 50 %) et résistants (pourcentage d'inhibition est inférieur à 50 %). 50 isolats se sont montrés sensibles à modérément résistants (soit 68,5 %) et 23 isolats (soit 31,5 %) résistants dont 17 isolats ont montré une résistance (ils sont probablement du phénotype HydR3⁻ ou HydR2) et 6 isolats ont montré une forte résistance (ils sont soit de type HydR1 ou de type HydR3⁺). Une étude moléculaire serait nécessaire pour la confirmation des différents phénotypes.

B. cinerea montre une sensibilité très variable aux traitements par les différentes doses du fenhexamide (Leroux, 2007). Plusieurs phénotypes résistants au fenhexamide ont été détectés dans les populations de *Botrytis cinerea* des vignobles français (Billard et al., 2012). Les principales souches hautement résistantes présentent un remplacement de la phénylalanine en position 412 dans la protéine Erg27, alors que 20 modifications simples ont été identifiées dans des souches modérément résistantes (Fillinger et al., 2008 ; Esterio et al., 2011b ; Grabke et al., 2013 ; Saito et al., 2014b).

Essentiellement, trois phénotypes de *Botrytis cinerea* résistants au fenhexamide ont été décrits : **HydR1** qui représente les isolats naturellement résistants, connus comme *Botrytis pseudocinerea*, sa résistance est due à une métabolisation du fenhexamide par les souches de *B. pseudocinerea* (Suty et al., 1999). Plus tard, Billard et al. en 2011 ont démontré que

l'inactivation du cytochrome P450, nommé Cyp684 a complètement aboli la résistance au fenhexamide chez *B. pseudocinerea*. **HydR2**, rarement observé, est un phénotype de *B. cinerea* résistant au fenhexamide dont la résistance est due à la détoxification du cytochrome P450, le cytochrome P450 impliqué dans la détoxification reste à identifier (Fillinger et Welker, 2016). **HydR3**, le phénotype résistant plus souvent rencontré, présente une sensibilité réduite du site ciblé (mutation au niveau de la 3-cétoréductase « erg27 »). Ces modifications diminuent l'affinité du fenhexamide pour les isoenzymes 3-cétoréductase (Debieu et al., 2013), permettant à l'enzyme d'être active même à des concentrations élevées de fenhexamide. La fréquence des isolats de types HydR3 est parfois élevée, en 2010, une moyenne de 27 % a été enregistrée dans les vignobles de Champagne atteint (Billard et al., 2012).

Nos résultats, ainsi que les résultats de plusieurs recherches, révèlent que la fréquence des isolats potentiellement résistants au fenhexamide est relativement faible (Billard et al., 2012, Saito et al., 2014b). Les résistances de type HydR3 ne devraient pas persister en l'absence du fongicide, et que ce phénotype a un impact modéré sur l'efficacité des traitements au fenhexamide pour contrôler la pourriture grise dans les vignobles (Billard et al., 2012).

Le genre *Trichoderma* est composé de plusieurs espèces antagonistes ; certaines souches sont recherchées pour leur grand potentiel en contrôle biologique et en stimulation des défenses naturelles des plantes par divers mécanismes (Hermosa et al., 2012). Plusieurs souches de *Trichoderma* sont utilisées dans la formulation de nombreux produits commerciaux pour la lutte biologique et/ou la bio-stimulation des plantes (Samuels, & Hebbbar, 2015). Cependant, nous préférons utiliser des souches indigènes isolées à partir des sols agricoles du nord-centre de l'Algérie comme dans le cas de l'étude réalisée par Chihat et al. (2021), afin d'éviter toute perturbation écologique de la biodiversité microbienne du sol. De plus, une identification et une caractérisation minutieuses doivent être effectuées avant toute utilisation (Galarza et al., 2015).

Les résultats de l'identification morphologique et culturale (Marco et microscopique) des isolats de *Trichoderma* spp. nous ont permis de distinguer 4 groupes : Le 1^{er} groupe comporte les isolats (TAS2, TAS4, TAS5, TAS8, TBeC1 et TLiC8) dont les caractéristiques morphologiques et culturales correspondent à la description du clade *Harzianum* (Jaklitsch, 2009 ; Chaverri et al., 2015). Le 2^e groupe comporte un seul isolat (TBS1) montrant des caractéristiques similaires à celles du clade *Brevicompactum* décrit par Degenkolb et al., (2008). Le 3^e groupe est composé de 3 isolats (TLS6 TLC2, TLC4) dont les caractéristiques sont semblables à celles décrites par Samuels et al., (2012) dans le cas des espèces de *Trichoderma* appartenant au clade Longibrachiatum. Le 4^e groupe comporte les isolats TGS7, TGS10, TGS11, TGS13 et TAtC11, il montre des caractéristiques similaires à celles

décrites par Jaklitsch et *al.*, (2006, 2011) dans le cas des espèces de *Trichoderma* appartenant au clade Viride. L'identification morphologique et culturale des espèces de *Trichoderma* reste peu fiable en raison de la similitude élevée des caractères. De ce fait, une identification moléculaire est nécessaire pour la confirmation des résultats précédents.

Pour l'identification moléculaire des souches algériennes de *Trichoderma*, quatre régions génomiques (ITS, *tef1*, *rpb2* et *acl1*) ont été séquencées. Les différentes séquences obtenues ont été analysées avec les programmes Trichokey et Trichoblast (Druzhinina et *al.*, 2005 ; Kopchinskiy et *al.*, 2005) et l'algorithme NCBI Blast. Le pourcentage d'identité nucléotidique a été calculé pour les séquences algériennes obtenues lors de cette étude pour les 4 gènes. Les résultats étaient en accord avec ceux obtenus dans la recherche BLAST, les séquences *tef1*, *rpb2* et *acl1* ont permis de faire une identification précise des isolats, cependant, les séquences ITS indiquaient 100 % de similitudes pour chaque séquence avec plusieurs espèces du même clade.

L'analyse phylogénétique des séquences a révélé une même distribution génétique pour les trois arbres conçus à partir des séquences *tef1*, *rpb2* et *acl1*. Ces résultats étaient similaires à ceux obtenus par (Jaklitsch et *al.*, 2013 ; Jaklitsch & Voglmayr, 2015). L'arbre ITS a révélé la même distribution au niveau du clade (en plaçant les isolats dans les clades appropriés), mais l'identification au niveau de l'espèce était différente par rapport aux résultats des arbres de gènes précédents. Plusieurs auteurs ont également rapporté des résultats différents obtenus lors de l'utilisation des ITS (Chaverri et *al.*, 2015 ; Samuels, 2006 ; Galarza et *al.*, 2015).

Les résultats d'identification moléculaire des isolats de *Trichoderma*, nous ont permis d'identifier 15 souches, appartenant à cinq espèces de *Trichoderma* réparties dans 4 clades différents. Jusqu'à présent, seulement, huit espèces de *Trichoderma* ont été signalées en Algérie : *T. harzianum*/ *H. lixii*, *T. asperellum*, *T. ghanense*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. atrobrunneum* et *T. afroharzianum* (Bouregghda & Bouznad, 2009 ; Kerroum et *al.*, 2015 ; Debbi et *al.*, 2018 ; Keddad & Bouzenad, 2019 ; Haouhach et *al.*, 2020). Sur la base de ces résultats, un premier signalement de la présence de *T. brevicompactum*, *T. breve* et *T. lixii* en Algérie a été effectué.

Dans cette étude, la capacité des isolats algériens de *Trichoderma* à contrôler la pourriture grise a été démontrée. Les isolats présentant une efficacité prometteuse dans la lutte biologique contre *B. cinerea* ont été sélectionnés sur la base des tests effectués *in vitro*. Trois modes d'action différents ont été évalués, à savoir la compétition, l'activité antifongique des composés volatils sécrétés par les isolats de *Trichoderma* spp. et celle de leurs filtrats de culture. Cette approche a été adoptée du fait que les études antérieures (Harman et *al.*, 2004 ; Azarmi et *al.*, 2011 ; Hermosa et *al.*, 2013 ; Shentu et *al.*, 2014) ont démontré que les souches

de *Trichoderma* utilisent plusieurs mécanismes (seul ou combinés) pour lutter efficacement contre les agents phytopathogènes. En conséquence, trois isolats ont été choisis pour le test de biocontrôle *in situ*, deux d'entre eux (TBS1, TAtC11) ont montré une efficacité intéressante dans le test des filtrats de culture en néphélomètre et la troisième souche (TLiC8) de *T. lixii* a été utilisée afin de tester son efficacité en biocontrôle.

L'inhibition de la croissance mycélienne radiale des isolats de *B. cinerea* en confrontation directe varie de 54 à 64 %, montrant ainsi la grande compétitivité des espèces appartenant au genre de *Trichoderma* (Benitez et al., 2004). La réduction des concentrations des nutriments entraîne généralement la réduction de la germination des conidies et une croissance plus lente du tube germinatif du pathogène (Nassr et Barakat, 2013). Cependant, les meilleurs résultats ont été observés chez les souches de *T. gamsii* (TGS7, TGS10), de *T. atroviride* (TAtC11) et de *T. longibrachiatum* (TLS6), ces trois espèces ont été décrites par plusieurs études pour leurs capacités à contrôler la pourriture grise et d'autres maladies fongiques de plante (Zhang et al., 2018 ; Redda et al., 2018 ; Hjeljord et Tronsmo, 2003, Bouregghda et Bouznad, 2009).

Les résultats du test de confrontation indirecte ont montré une grande variabilité de l'effet des composés volatils de *Trichoderma* spp. sur l'inhibition de la croissance mycélienne des trois isolats de *B. cinerea* étudiés. Cependant, *T. gamsii* (TGS7) et *T. atroviride* (TAtC11) ont montré un effet satisfaisant par rapport aux autres isolats étudiés. Une forte odeur de l'arôme de la noix de coco (coconut aroma) a été constatée chez ces deux isolats, ce qui nous mène à supposer que l'efficacité des composés volatils de *T. gamsii* (TGS7) et *T. atroviride* (TAtC11) contre *B. cinerea* peut être due à pyrone 6-pentyl-2H-pyran-2-one 'coconut aroma' communément produite par les souches de *Trichoderma* (Vinale et al., 2008). Cependant, l'activité antifongique de pyrone 6-pentyl-2H-pyran-2-one a été démontrée *in vitro* et *in vivo* contre *B. cinerea* par Pezet et al., (1999) et Poole et al., (1998).

La plus grande activité antifongique des filtrats de culture sur l'inhibition de la germination des spores de *B. cinerea* a été observée chez *T. brevicompactum* (isolat TBS1) cela peut s'expliquer par la capacité de cette espèce à produire en grande quantité la trichodermine et le *harzianum* A. Plusieurs auteurs ont signalé l'activité inhibitrice de ces métabolites secondaires contre les champignons phytopathogènes, ajoutant cette espèce à la liste des agents de lutte biologique (Hermosa et al., 2013 ; Shentu et al., 2014 ; Tijerino et al., 2011). Nous avons constaté aussi que 12 isolats de *Trichoderma* spp. n'ont pas inhibé la germination des spores de *B. cinerea* par les filtrats de cultures, au contraire ils l'ont stimulé. Ces résultats peuvent être expliqués soit par l'incapacité de ces isolats à synthétiser des métabolites ayant un effet fongicide et/ou fongistatique, ou bien par la résistance des isolats de *B. cinerea* vis-à-vis des

métabolites secrétés par ces souches. Des études antérieures ont démontré que *B. cinerea* peut développer des résistances aux antibiotiques produits par les agents de lutte biologique (Ajouz et al., 2010 ; Fillinger et al., 2012).

L'indice de vigueur et le taux de germination des graines de tomate traitées par les suspensions de spore de *Trichoderma* spp. ont été calculés après sept (07) jours d'incubation, une différence hautement significative a été enregistrée, 12 isolats ont montré un indice de vigueur nettement supérieur à celui du témoin, contrairement, aux 3 isolats de *Trichoderma gamsii* (TGS10, TGS11 et TGS13) qui ont montré un indice de vigueur inférieur à celui du témoin. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par l'étude réalisée par Bader et al., (2020), qui a mis en évidence l'effet des suspensions de spore de *T. brevicompactum*, *T. gamsii* et *T. harzianum* sur les plants de tomates. Les résultats révèlent une augmentation d'une manière significative de la longueur des tiges et racines et une meilleure prolifération des racines latérales par rapport aux plantules témoins. De même, pour l'étude réalisée par Azarmi et al., (2011), une augmentation a été constatée au niveau de la taille des plantes (tiges et racines), le poids frais et sec des plantes, la teneur en chlorophylle et de Ca²⁺, Mg²⁺, P et K⁺ chez les plantules traitées par les suspensions de spores de *Trichoderma* spp.

L'effet des filtrats de culture de 15 isolats de *Trichoderma* spp. a été réalisé sur les graines de tomates, après 8 jours d'incubation, les pourcentages de germination des graines ainsi que l'indice de vigueur ont été calculés. Une différence significative de l'effet des filtrats a été constatée, 12 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré un effet biostimulant, donc un indice de vigueur supérieur à celui du témoin. Par contre, Un effet inhibiteur sur la germination des graines et l'élongation de l'hypocotyle et de la radicule des plantules a été enregistré chez les filtrats de culture des isolats de *T. afroharzianum* (TAS8), *T. lixii* (TLiC8) et *T. longibrachiatum* (TLC2). Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par l'étude réalisée par Muthukumar et al., (2011) qui a révélé que les graines de piment traitées par les filtrats de culture des *Trichoderma* rhizosphériques ont montré une augmentation des taux de germination des graines et une induction de la croissance des plantules de piment *in vitro*.

L'effet stimulant des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. sur le taux de germination et la croissance des plantes a été démontré par plusieurs travaux de recherches : (Neelamegam, 2004 ; Jadhav et Ambadkar, 2007 et Azarmi et al., 2011) sur graines et plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) et Rahman et al., en 2012 sur graines et plantules de piment.

Les résultats de l'effet des composés volatils des isolats de *Trichoderma* spp. sur la germination des graines de tomate et l'indice de vigueur des plantules ont révélé une

différence hautement significative, 7 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré un effet biostimulant, avec un indice de vigueur supérieur à celui du témoin, alors que les 8 autres isolats ont montré un effet inhibiteur sur la germination et l'indice de vigueur des plantules de tomate. Des résultats similaires ont été obtenus par Lee et *al.*, (2016), l'étude consiste à évaluer l'effet des VOCs de 20 isolats de *Trichoderma* spp. sur des plantes *Arabidopsis thaliana*, après 14 jours d'exposition aux composés volatils, le poids frais et la teneur totale en chlorophylle des plantules ont été mesurés. Sur les 20 isolats, seulement 9 ont révélé une stimulation de la croissance par rapport au témoin. L'effet des VOCs des 9 isolats sur les graines de tomate a également révélé une stimulation significative de la croissance arrivant jusqu'à 42 % par rapport au témoin. Les études réalisées par Lee et *al.* (2015) et par Vinale et *al.* (2008) ont mis en évidence la capacité des champignons endophytes tels que les espèces de *Trichoderma* à produire des VOCs stimulant la croissance des plantes.

La stimulation de la croissance provoquée par *Trichoderma* pourrait être due à la production de composés semblables à l'auxine dans le milieu de culture (Vey et *al.*, 2001 et Vinale et *al.*, 2006). Par ailleurs, la réduction de la germination des graines par les filtrats de culture peut être attribuée à la présence de certaines mycotoxines, des enzymes libérées par les espèces fongiques (Parveen et *al.*, 2019), ainsi qu'à la concentration élevée des métabolites secondaires qui peut avoir un effet négatif sur la germination des graines.

Les essais *in situ* effectués sur des plantes de tomates « KAWA » inoculés avec une suspension de spore d'un isolat de *B. cinerea* (BCT04) obtenu à partir de tomate et ayant montré une forte agressivité dans le test du pouvoir pathogène et traités par des suspensions de spore de trois isolats de *Trichoderma* spp. (TBS1, TAtC11, TLiC8). L'isolat *T. brevicompactum* (TBS1) a fortement réduit la gravité de la maladie en traitement préventif et en traitement curatif, ces résultats sont très prometteurs. Cependant, cet isolat peut être fortement recommandé pour le développement des bio-fongicides commerciaux pour la gestion intégrée de la pourriture grise. L'isolat TAtC11 de *T. atroviride* s'est montré moins efficace dans le test de biocontrôle *in planta* comparant avec les résultats obtenus dans le test de biocontrôle *in vitro*. Quant à *T. lixii* (TLiC8), les résultats étaient similaires à ceux obtenus dans les tests *in vitro*, cette souche s'est montrée incapable de contrôler la moisissure grise dans les conditions de notre étude.

Les espèces de *Trichoderma* ont montré des résultats très satisfaisants dans le biocontrôle des maladies fongiques des plantes, l'étude menée par Harel et *al.* (2014), a relevé que le traitement des plants de tomate par une suspension de spore (0.4 %) de *Trichoderma harzianum* T39 avait réduit de 84 % la gravité de la maladie de la pourriture grise sur des plantes de tomate. Li et *al.* (2020), ont montré que l'utilisation de *Trichoderma atroviride*

souche CCTCCSBW0199 dans le contrôle de la pourriture grise des tomates a révélé une réduction de la maladie qui varie de 61 à 71 %, des résultats meilleurs ont été obtenus lors de l'application d'un mélange de métabolites de *T. atroviride* CCTCCSBW0199 et le brassinolide, qui est un stéroïde favorisant la croissance des plantes, avec un pourcentage de réduction de la maladie d'environ 74 %.

Conclusion générale

7 Conclusion générale

Cette étude avait commencé par l'isolement et la caractérisation phénotypique de 73 isolats de *Botrytis cinerea* obtenus à partir des parcelles agricoles de vigne, tomate, fraiser, fève et courgette, durant les années 2016 et 2017. A l'issu de ce travail, la diversité phénotypique, morphologique et culturale ont été mises en évidences. Les isolats ont été séparés en deux principaux morphotypes : Sclérotiens (S1, S2, S3, S4, S5) représentés par 33 isolats / 73 et Mycéliens (M1, M, M3 et M4) représentés par 40 isolats / 73.

L'étude du pouvoir pathogène en utilisant la technique d'inoculation sur les demi-pommes nous a permis de révéler une grande variabilité au niveau de l'agressivité au sein de notre collection et elle nous a permis de séparer nos isolats en trois groupes distincts : hautement agressifs, moyennement agressifs, et faiblement agressifs.

L'étude de la sensibilité aux fenhexamides de notre collection de *Botrytis cinerea* a montré une importante variabilité par rapport aux degrés de sensibilité de nos isolats. La plus grande proportion appartient aux isolats de type HS/S sensible à cette matière active avec 40 isolats, 17 isolats de type modérément résistant à résistant (MR/R) et 6 isolats hautement résistants (HR) aux fenhexamides.

Notre étude a porté sur l'isolement, la caractérisation phénotypique et l'identification génétique des espèces appartenant au genre *Trichoderma*. Sur les 15 isolats étudiés, 7 espèces ont été identifiées : *T. afroharzianum* (04 isolats), *T. gamsii* (04 isolats), *T. longibrachiatum* (03 isolats), *T. atroviride* (01 isolat), isolat) et 3 espèces ont été signalés pour la première fois en Algérie : *T. brevicompactum* (01 isolat), *T. breve* (01 isolat) et *T. lixii* (01 isolat).

Les tests de biocontrôle *in vitro* ont révélé de grandes capacités antagonistes chez certains isolats algériens contre *B. cinerea*. L'étude a été réalisée en utilisant trois méthodes :

La première consiste à étudier l'effet mycoparasitisme et compétition (Confrontation directe), les résultats obtenus ont révélé une inhibition considérable de la croissance mycélienne des trois isolats de *B. cinerea* par rapport aux témoins. Les meilleurs résultats d'inhibition ont été enregistrés chez les souches TGS7 ($62,27 \pm 2,75$ %), TAtC11 ($61,97 \pm 2,27$ %), TAS8 ($61,60 \pm 1,94$ %) et TGS10 ($61,36 \pm 2,07$ %).

La seconde consiste à mettre en évidence l'effet des composés volatils sur la croissance mycélienne du pathogène, les résultats obtenus révèlent que les meilleures réductions de la croissance mycélienne ont été enregistrées chez les espèces du clade Viride, TGS7 (*T.*

gamsii) et TAtC11 (*T. atroviride*) qui ont réduit la croissance mycélienne de 64,49 % et de 62,31 %, respectivement.

La troisième a pour objectif d'étudier l'effet antibiose des métabolites secondaires solubles sur la croissance du champignon phytopathogène, les pourcentages d'inhibition les plus élevés, ont été enregistrés chez les filtrats de culture de l'isolat TBS1 (*T. brevicompactum*) avec une moyenne de 90,68 % et de l'isolat TAtC11 (*T. atroviride*) avec une moyenne de 68,72 % d'inhibition, suggérant un fort effet antifongique des filtrats de ces deux isolats.

L'étude de l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur les graines de tomate a été réalisée en utilisant trois méthodes à savoir le traitement des graines par une suspension de spores, par composés volatils et par les filtrats de culture des isolats de *Trichoderma*. Les meilleurs résultats ont été observés chez : i) les isolats TAS2 et TBS1 avec un indice de vigueur de 6520 et 4943, respectivement, dans le cas du test des graines traitées par une suspension de spores. ii) Les isolats TLS6, TAS5, TLC4 et TAS4 dans le cas du test des graines traités par les composés volatils. iii) Les isolats TBS1 et TAS4 dans le cas du test des graines traitées par les filtrats de culture.

Les essais de biocontrôle *in planta* réalisés sur des plants de tomate avec les suspensions de spores de *T. brevicompactum* (TBS1), *T. atroviride* (TAtC11) et *T. lixii* (TLiC8) et l'isolat BCT04 de *B. cinerea* ont montré que *T. brevicompactum* a réduit l'incidence de la maladie de $64,43 \pm 4,34$ % en traitement préventif et de $51,35 \pm 1,56$ % en curatif. Ce qui révèle que l'isolat TBS1 de l'espèce *T. brevicompactum* peut être préconisé pour la lutte biologique contre la pourriture grise de la tomate.

Les résultats révèlent un effet intéressant de certaines souches de *Trichoderma* spp. en lutte biologique pour le contrôle de la maladie de la pourriture grise et dans la biostimulation de la croissance des plants de tomates. Dans le cadre de la continuité de ce travail de recherche et afin de pouvoir valoriser au mieux les résultats obtenus, il serait intéressant d'approfondir les recherches, selon les perspectives ci-dessous :

- Caractérisation des filtrats de culture et des composés volatils, à l'aide des techniques de chimie analytique et biochimique.
- Etude de l'effet de chaque métabolite sur la croissance du champignon phytopathogène (*B. cinerea*) ;
- Etude de l'effet de chaque métabolite sur la biostimulation de la croissance et développement des plants de tomates ;

Conclusion générale

- Etude sur les combinaisons entre les différents métabolites et leurs effets sur la réduction de la croissance du champignon et/ou le développement et la croissance des plants de tomate (ou autre cultures) ;
- Etude sur les conditions (température ; photopériode ; les milieux de cultures...) influençant la biosynthèse de chaque molécule (métabolite secondaire) ;
- Formulation de bio-fongicide à partir des souches ayant montrée un grand potentiel dans le contrôle de la maladie de la pourriture grise.

ملخص

يعتبر العفن الرمادي الذي تسببه *Botrytis cinerea* مرضاً مهم للغاية في البحر الأبيض المتوسط ، ويبدو أن الظروف المناخية مواتية لتطور هذا المرض. صعوبات المعالجة الكيميائية لهذا المرض دفعتنا إلى البحث عن سلالات *Trichoderma* فعالة في المعالجة البيولوجية. تم الحصول على 73 عزلة من *B. cinerea* من مزارع الطماطم ، والكروم ، والفراولة ، والفول ، والقرع. ومنه اختير 3 عزلات الأكثر قوة في اختبارات المكافحة الحيوية هي (BCV02 ، BCT04 و BCFr10) تم دراسة تأثير المادة الفعالة fenhexamid على عزلات *B. cinerea* ، أظهرت معظمها حساسية أو مقاومة معتدلة.

15 عزلة من *Trichodermaspp.* تم عزلها وتحديدها على أنها *T. afroharzianum* (04 عزلات) ، *T. gamsii* (04 عزلات) ، *T. longibrachiatum* (03 عزلات) ، *T. atroviride* (عزل 01) و *T. brevicompactum* (عزل 01) و *T. breve* (عزل 01) و *T. lixii* (عزل 01) على أساس تسلسل الجينات ITS و *tef1* و *rpb2* و *acl1*. في هذا العمل ، تم الإشارة إلى 3 أنواع جديدة من *Trichoderma* لأول مرة في الجزائر وهي: *T. brevicompactum* و *T. breve* و *T. lixii*. أظهرت اختبارات المكافحة الحيوية المختلفة في المختبر قدرات معادية عالية في بعض العزلات الجزائرية ضد *B. cinerea*. سلالة من *Trichodermaspp.* أعاقت بشكل كبير النمو الفطري لعزلات *B. cinerea* الثلاث مقارنة مع مجموعة الشواهد. تم تسجيل أفضل نتائج تثبيط في السلالات 62.27 ± 2.75 TGS7 (،) ، 61.97 ± 2.27 TAtC11 (،) ، 61.60 ± 1.94 TAS8 و 61.36 ± 2.07 TGS10. أدت المواد المتطايرة التي تنتجها سلالات *T. gamsii* (TGS7) و *T. atroviride* (TAtC11) إلى خفض نمو الفطريات بنسبة 64.49% و 62.31% على التوالي. تم تسجيل أفضل النسب المنوية للتثبيط في ترشيح لعزلة *T. brevicompactum* (TBS1) بمتوسط 90.68% وللعزلة *T. atroviride* (TAtC11) بمتوسط تثبيط 68.72% ، مما يشير إلى وجود تأثير مضاد قوي للفطريات من رواشح هاتين العزلتين.

لدراسة تأثير عزلات *Trichodermaspp.* على بذور الطماطم تم استخدام ثلاث طرق ، وهي معالجة بذور الطماطم مع محلول البوغ ، والمركبات المتطايرة وترشحات لعزلات *Trichoderma*. تم حساب نسبة الإنبات ومؤشر القوة لكل اختبار. ولوحظت أفضل النتائج في: (1) العزلات TAS2 و TBS1 بمؤشر قوة 6520 و 4943 على التوالي لاختبار البذور المعالجة بمحلول البوغ. (2) أظهرت عزلات TLS6 و TAS5 و TLC4 و TAS4 مؤشر قوة أعلى من الشواهد في اختبار البذور المعالجة بمركبات متطايرة. (3) عزلات TBS1 و TAS4 بمؤشر قوة أعلى قليلاً من ذلك الخاص بمجموعة الشواهد في حالة اختبار البذور المعالجة بالمرشحات.

أظهرت اختبارات المكافحة البيولوجية التي أجريت على نباتات الطماطم مع محلول الأبواغ من (*TBS1*) *T. brevicompactum* و *T. atroviride* (TAtC11) و *T. lixii* (TLiC8) وعزلة BCT04 من *B. cinerea* أن *T. brevicompactum* قلل من حدوث المرض بنسبة 64.43 ± 4.34 % في العلاج الوقائي وبنسبة 51.35 ± 1.56 % في العلاج بعد المرض. هذا يدل على أن النوع *T. brevicompactum* هو نوع مثير للاهتمام للغاية في المكافحة البيولوجية للعفن الرمادي في الطماطم.

الكلمات الدالة: العفن الرمادي ، *B. cinerea* ، *Trichoderma spp.* ، المكافحة البيولوجية ، التحفيز الحيوي والطماطم.

Abstract :

Grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* is one of the most destructive fungal diseases of Mediterranean crops and the climatic conditions seem to be favorable for the development of this disease. The complexity of chemical control of this disease has led us to search for *Trichoderma* strains that are effective in biological control. In this study, 73 isolates of *B. cinerea* were obtained from tomato, grapevine, strawberry, bean and squash crops. **Phenotypic characterization, pathogenicity test and sensitivity to fenhexamid were carried out on all isolates of *B. cinerea*.** Three most virulent isolates were selected for the different biocontrol tests (BCV02, BCT04 and BCFr10).

15 isolates of *Trichoderma* spp. were isolated and identified as *T. afroharzianum* (04 isolates), *T. gamsii* (04 isolates), *T. longibrachiatum* (03 isolates), *T. atroviride* (01 isolate), *T. brevicompactum* (01 isolate), *T. breve* (01 isolate) and *T. lixii* (01 isolate) on the basis of DNA sequence analysis of four genes (ITS, *tef1*, *rpb2* and *acl1*). The present study revealed the first report of *T. brevicompactum*, *T. breve* and *T. lixii* in Algeria. The different *in vitro* biocontrol tests revealed high antagonistic activity of some Algerian isolates against *B. cinerea*. The *Trichoderma* spp. strains significantly inhibited the mycelial growth of the three *B. cinerea* isolates compared to the controls. The best inhibition results **in direct confrontation** were recorded in strains **T2** ($62.27 \pm 2.75\%$), **Tc11** ($61.97 \pm 2.27\%$), **T3** (61.60 ± 1.94) and **T14** (61.36 ± 2.07). The volatile compounds produced by isolate **T2** (*T. gamsii*) and **Tc11** (*T. atroviride*), reduced mycelial growth by 64.49% and 62.31%, respectively. The best percentages of inhibition were recorded from the filtrates of *T. brevicompactum* (TBS1 isolate) (90.68%) and *T. atroviride* (**Tc11** isolate) (68.72%), indicating a significant antifungal effect of the filtrates of these two isolates.

The study of the effect of *Trichoderma* spp. isolates on tomato seeds was carried out using three methods, which are the treatment of tomato seeds with a spore suspension, with volatile compounds and with the culture filtrates of *Trichoderma* isolates.

Germination percentage and vigor index were calculated for each test. The best results were observed in: i) isolates TAS2 and TBS1 with a vigor index of 6520 and 4943, respectively, for the treatment of tomato seeds with a spore suspension. (ii) Isolates TLS6, TAS5, TLC4 and TAS4 showed a higher vigor index than the control in the treatment of seeds with volatile compounds. (iii) TBS1 and TAS4 isolates **with a vigor index higher** than the control in the case of the seed treated with culture filtrates.

In planta biocontrol assays carried out on tomato plants with spore suspensions of *T. brevicompactum* (TBS1), *T. atroviride* (TAAtC11) and *T. lixii* (TLiC8) and *B. cinerea* isolate (BCT04) showed that *T. brevicompactum* reduced the disease incidence by $64.43 \pm 4.34\%$ in preventive treatment and by $51.35 \pm 1.56\%$ in curative treatment. This reveals that *T. brevicompactum* is a very interesting species in biological control of tomato grey mould.

Keywords: Grey mould, *B. cinerea*, *Trichoderma* spp., biocontrol, biostimulation and tomatoes.

Résumé :

La pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*, est une maladie très redoutable en méditerranée, les conditions climatiques semblent être propice pour le développement de cette maladie. La complexité de la lutte chimique nous a incité à chercher des souches de *Trichoderma* efficace en lutte biologique. Dans cette étude, 73 isolats de *B. cinerea* ont été isolés à partir des cultures de Tomates, Vignes, fraisiers, fèves et courgette. La caractérisation phénotypique, l'étude de la pathogénicité et la sensibilité au fenhexamid ont été réalisés sur l'ensemble des isolats de *B. cinerea*. Trois isolats les plus virulents ont été choisis pour les différents tests de biocontrôle (BCV02, BCT04 et BCFr10).

15 isolats de *Trichoderma* spp. ont été isolés et identifiées comme *T. afroharzianum* (04 isolats), *T. gamsii* (04 isolats), *T. longibrachiatum* (03 isolats), *T. atroviride* (01 isolat), *T. brevicompactum* (01 isolat), *T. breve* (01 isolat) et *T. lixii* (01 isolat) sur la base des séquences des gènes ITS, *tef1*, *rpb2* et *act1*. Ce travail a fait l'objet d'une signalisation de 3 nouvelles espèces de *Trichoderma* pour la première fois en Algérie à savoir : *T. brevicompactum*, *T. breve* et *T. lixii*. Les différents tests de biocontrôle *in vitro* ont révélé de grandes capacités antagonistes chez certains isolats algériens contre *B. cinerea*. Les souches de *Trichoderma* spp. ont inhibé considérablement la croissance mycélienne des trois isolats de *B. cinerea* par rapport aux témoins. Les meilleurs résultats d'inhibition en confrontation directe ont été enregistrés chez les souches TGS7 ($62,27 \pm 2,75\%$), TAtC11 ($61,97 \pm 2,27\%$), TAS8 ($61,60 \pm 1,94$) et TGS10 ($61,36 \pm 2,07$). Les substances volatiles produites par les souches TGS7 (*T. gamsii*) et TAtC11 (*T. atroviride*), ont réduit la croissance mycélienne de 64,49 % et de 62,31 %, respectivement. Les meilleurs pourcentages d'inhibition ont été enregistrés chez les filtrats de culture de l'isolat TBS1 (*T. brevicompactum*) avec une moyenne de 90,68 % et de l'isolat TAtC11 (*T. atroviride*) avec une moyenne de 68,72 % d'inhibition, suggérant un fort effet antifongique des filtrats de ces deux isolats.

L'étude de l'effet des isolats de *Trichoderma* spp. sur les graines de tomate a été réalisée en utilisant trois méthodes à savoir le traitement des graines par une suspension de spores, par composés volatiles et par les filtrats de culture des isolats de *Trichoderma*. Le pourcentage de germination et l'indice de vigueur ont été calculés pour chaque test. Les meilleurs résultats ont été observés chez : i) les isolats TAS2 et TBS1 avec un indice de vigueur de 6520 et 4943, respectivement, pour le test des graines traitées par une suspension de spores. ii) Les isolats TLS6, TAS5, TLC4 et TAS4 ont montré un indice de vigueur supérieur à celui du témoin dans le cas du test des graines traités par les composés volatiles. iii) Les isolats TBS1 et TAS4 avec un indice de vigueur supérieur à celui du témoin dans le cas du test des graines traités par les filtrats de culture.

Les essais de biocontrôle *in planta* réalisées sur des plants de tomate avec les suspensions de spores de *T. brevicompactum* (TBS1), *T. atroviride* (TAtC11) et *T. lixii* (TLiC8) et l'isolat BCT04 de *B. cinerea* ont montré que *T. brevicompactum* a réduit l'incidence de la maladie de $64,43 \pm 4,34\%$ en traitement préventif et de $51,35 \pm 1,56\%$ en curatif. Ce qui révèle que l'isolat TBS1 de l'espèce *T. brevicompactum* peut être préconisé pour la lutte biologique contre la pourriture grise de la tomate.

Mots clés : pourriture grise, *B. cinerea*, *Trichoderma* spp., biocontrôle, biostimulation et tomates.