



HAL
open science

Relation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de la protection biologique conférée par deux agents de lutte biologique

Morgane Comby

► To cite this version:

Morgane Comby. Relation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de la protection biologique conférée par deux agents de lutte biologique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2011. hal-02811116

HAL Id: hal-02811116

<https://hal.inrae.fr/hal-02811116>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Centre d'Angers - Institut National
d'Horticulture et de Paysage**
2, rue André Le Nôtre
49045 ANGERS CEDEX 01
Tél : 02 41 22 54 54

**INRA-Domaine St Maurice
Unité de Pathologie Végétale**
84143 MONTFAVET CEDEX
Tél : 04 32 72 28 55

Mémoire de Fin d'Etudes

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences
Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Spécialité : Horticulture

Option : GDV

**Relation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea*
et l'efficacité de la protection biologique conférée par
deux agents de lutte biologique.**

Par : Morgane COMBY

JURY

Soutenu à Angers, le 13 Septembre 2011

Président : J.C Michel

Maître de stage : M. Bardin

Tutrice : S. Godet

Enseignant responsable de l'option : J.C Michel

Autres membres du jury : V. Caffier et C. Le May

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*



Relation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de la protection biologique conférée par deux agents de lutte biologique de COMBY Morgane est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Diffusion du mémoire

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

Préciser les limites de la confidentialité ⁽¹⁾ :

Mémoire de fin d'études :

Consultable sur place :	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	
Reproduction autorisée :	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	
Prêt autorisé :	<input checked="" type="radio"/> oui	<input type="radio"/> non	
Confidentialité absolue : (ni consultation, ni prêt)	<input type="radio"/> oui	<input checked="" type="radio"/> non	
<i>Si oui</i>	<input type="radio"/> 01 an	<input type="radio"/> 05 ans	<input type="radio"/> 010 ans

Diffusion de la version numérique : oui non

Fiche de résumé du mémoire de fin d'études :

Résumé diffusable : oui non

Si oui, l'auteur complète l'autorisation suivante :

Je soussignée Morgane Comby, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.

Date : 2/09/11

Signature :

Angers, le 13 septembre 2011

Le Maître de stage⁽²⁾,

L'auteur,

L'Enseignant responsable d'option⁽²⁾,

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation du Centre d'Angers d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Cindy Morris, directrice de l'unité de Pathologie Végétale de l'INRA d'Avignon, de m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'études dans cette unité, au sein de l'équipe de Mycologie-Bactériologie.

Merci infiniment à Marc Bardin de m'avoir encadrée durant ce stage, de m'avoir appris tant de choses et d'avoir été toujours disponible et patient à mon égard. Merci pour son précieux soutien et pour toutes les heures passées à discuter et à corriger mon mémoire.

Je souhaite également remercier Stéphanie Godet, d'Agrocampus-Ouest, d'avoir assuré le tutorat de mon stage.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes du laboratoire de Mycologie, en particulier Philippe Nicot, Christel Leyronas, Claire Troulet et Magali Duffaud pour leur aide précieuse, leur disponibilité et leur sympathie.

Merci à Laurent Neu de m'avoir aidé lors de mes inoculations du vendredi et à Laurie Blanchemain d'avoir réalisé pour moi quelques manipulations.

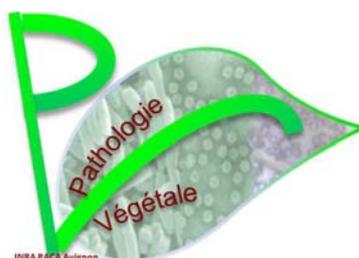
Merci à toute l'équipe du groupe 'culture', Jöel Beraud, Michèle Leplat, Laurent Paradis, Michel Pascal et Nathalie Truglio, pour le travail réalisé en serres en amont de mes manipulations et pour l'entretien de mes plantes. Et merci à Caroline Guilbaud pour la gestion de la salle des milieux.

Je tiens également à remercier Véronique Decognet pour son aide dans la recherche documentaire et Michel Riqueau, toujours très efficace pour régler mes problèmes informatiques.

Un grand merci à tous les membres permanents de l'unité de Pathologie Végétale pour leur accueil chaleureux et leur présence attentionnée. Merci tout particulièrement à Odile Berge, Isabelle Bornard, Patrick Gognalons, Pascale Gros, Claudine Laurent et Hélène Lopusziak pour leur écoute ou simplement leur bonne humeur quotidienne.

Enfin, je remercie les thésardes et les autres stagiaires pour tous les bons moments passés ensemble durant les six mois de mon stage et pour l'entraide que nous avons eue. Merci notamment à Florian, Jimmy et Caroline pour leur présence fidèle lors des quelques week-ends de rédaction.

Et merci à Laure, Guillaume et Charlène pour la relecture attentive de mon mémoire, pour leurs encouragements et leurs précieux conseils.



Glossaire

Agressivité : Composante quantitative du pouvoir pathogène. L'agressivité d'une souche d'un agent pathogène se mesure selon différents critères, par exemple le temps de latence avant l'infection de l'hôte, la taille des lésions, la vitesse de développement des lésions, la sporulation.

Antagoniste : Se dit d'un agent de lutte qui s'oppose à l'action d'un agent pathogène ou entre en compétition avec lui.

Ascospore : Spore formée dans un asque.

Asque : Cellule reproductrice caractéristique des champignons Ascomycètes, à l'intérieur de laquelle se forment en général huit spores (ascospores).

Biosurfactants : Molécules produites par certains microorganismes qui vont modifier la tension superficielle à la surface des feuilles de la plante hôte. Leur nature et leur pouvoir tensioactif sont fortement dépendants du type de microorganismes utilisés (bactéries, levures, champignons). Ces molécules peuvent par exemple avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes.

Cluster (de gènes) : Groupe de gènes qui codent pour des protéines de mêmes fonctions.

Conidie : Spore assurant la reproduction asexuée d'un champignon, formée à l'extrémité d'un conidiophore.

Conidiophore : Hyphe spécialisé sur lequel une ou plusieurs conidies sont produites.

Ectotrophique : Se dit d'un champignon dont le mycélium ne pénètre pas à l'intérieur des tissus du matériel végétal hôte.

Entomopathogène : Se dit d'un microorganisme ou d'une substance luttant contre les insectes.

Fitness : Capacité d'un agent pathogène à survivre et à se reproduire. Dans notre étude, nous considérons que la germination des spores, la croissance mycélienne, la sporulation et l'agressivité sur plantes sont des mesures de fitness pour un champignon phytopathogène.

Hétérocaryotique : Se dit d'une cellule possédant au moins deux noyaux d'origines différentes.

Hydatode : Stomate aquifère : pore spécialisé dans l'excrétion d'eau sous forme de gouttelettes.

Hyphes : Filaments cellulaires qui constituent l'appareil végétatif d'un champignon.

Inoculer : Mettre un agent pathogène en contact d'une plante ou d'un organe hôte.

Inoculum : Agent pathogène (ou partie d'un agent pathogène) qui, mis au contact d'un hôte, peut provoquer une infection.

Isolat : Microorganisme fongique ou bactérien, échantillonné à partir d'un hôte infecté et qui n'a pas été caractérisé.

Microsatellite : Répétition un certain nombre de fois dans le génome d'un motif court, constitué de nucléotides d'ADN. Selon les individus, un microsatellite peut comporter un nombre différent de répétitions de ce motif.

Monospore : Un isolement monospore consiste à obtenir une culture pure d'un champignon à partir d'une seule spore issue d'un échantillon contaminé.

Mouillabilité : Aptitude de la surface d'un matériau (par exemple une feuille) à se laisser mouiller par un liquide.

Mycélium : Appareil végétatif d'un champignon, constitué d'un assemblage d'hyphes.

Nécrotrophe : Se dit d'un microorganisme se nourrissant exclusivement de tissu mort.

Particule « virus-like » : Particule virale sans génome (doubles brins d'ARN) acquise lors de l'infection d'un organisme par un virus mais non infectieuse et non transmissible.

Phyllosphère : Ensemble formé par les différentes composantes aériennes de la plante et par la microflore et la faune microscopique présentes à la surface des feuilles.

Phytoalexines : Métabolites secondaires toxiques synthétisés par une plante en réponse à l'attaque d'un agent pathogène.

Phytoanticipines : Métabolites secondaires toxiques antimicrobiens préexistants dans la plante hôte ; certains de ces composés peuvent n'être activés que suite à l'attaque d'un agent pathogène mais l'attaque en elle-même n'induit pas leur synthèse.

Phytopathogène : Se dit d'un microorganisme capable d'infecter des végétaux et d'y développer une maladie.

Pouvoir pathogène : Capacité d'un agent pathogène à provoquer une maladie. L'agressivité et la virulence sont les deux composantes du pouvoir pathogène.

Prophylaxie : Ensemble des mesures visant à empêcher l'apparition et la propagation d'une maladie.

Pycnide : Fructification asexuée de certains champignons, constituée de conidiophores et produisant des conidies.

Réaction d'hypersensibilité : Sensibilité excessive des tissus végétaux à certains agents pathogènes. Les cellules affectées meurent rapidement, bloquant ainsi la progression des parasites obligatoires.

Résistance multiple (MDR) : Résistance simultanée d'un organisme à plusieurs composés toxiques.

Rhizosphère : Ensemble comprenant la partie du sol pénétrée par les racines des plantes et les microorganismes associés.

Saprophyte : Se dit d'un organisme capable de se nourrir de matière organique morte. Sa survie et son développement ne dépendent alors pas d'un autre organisme vivant.

Sidérophore : Molécule chélatrice du fer, synthétisée notamment par les microorganismes, capable de former des complexes avec l'ion ferrique et ainsi d'internaliser le fer nécessaire au fonctionnement des cellules.

Souche : Microorganisme fongique ou bactérien échantillonné sur un hôte infecté et qui a été caractérisé génétiquement et/ou phénotypiquement.

Transposon (ou élément transposable) : Segment d'ADN qui peut se déplacer dans le génome et s'insérer à différents endroits sur les chromosomes.

Virulence : Composante qualitative du pouvoir pathogène, c'est l'aptitude ou non d'un agent pathogène à infecter un hôte.

Liste des abréviations

AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve (Aire en dessous de la courbe de progression de la maladie)

ABC : ATP-Binding Cassette

ADE : Autorisation de Distribution pour Expérimentation

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

cfu : colonie formant unité

DON : Déoxynivalénol

EC50 : Concentration efficace à 50%

FR : Facteur de résistance

HCN : Cyanure d'hydrogène

Ia : Indice d'attaque

MDR: MultiDrug Resistance

MSF: Major Facilitators Superfamily

PCA : Phénazine-1-Acide Carboxylique

PCN : Phénazine-1-carboxamide

PDA : Potato Dextrose Agar

P_{L13} : Taux de protection conféré par *Microdochium dimerum* souche L13

UV : Ultraviolets

2,4-DAPG : 2,4-DiAcétylPhloroGlucinol

Sommaire

Contexte scientifique de l'étude	1
Synthèse bibliographique	2
Chapitre 1: La protection biologique contre les maladies des plantes	2
<u>I. Modes d'action des agents de lutte biologique</u>	2
1) Antibiose	2
2) Hyperparasitisme	2
3) Compétition nutritive	3
4) Interférence avec le pouvoir pathogène	3
5) Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante.....	4
6) Stimulation des défenses de la plante	4
7) Combinaison de mécanismes d'action	4
<u>II. Utilisation en pratique du contrôle biologique</u>	5
1) Produits commercialisés	5
2) Difficultés identifiées liées à la fluctuation d'efficacité des agents de lutte biologique	5
3) Risques liés à l'intensification de l'utilisation des agents de lutte biologique	7
4) Vers une protection biologique durable ?.....	7
Chapitre 2: Durabilité de la protection biologique	8
<u>I. Cas de perte d'efficacité en pratique de la protection biologique</u>	9
<u>II. Risques d'érosion de l'efficacité des agents de lutte biologique</u>	9
1) Différence de sensibilité aux agents de lutte biologique dans les populations naturelles d'agents pathogènes	9
1.1) <i>Spécificité d'action des agents de lutte biologique</i>	9
1.2) <i>Diversité intra-spécifique de la sensibilité des agents pathogènes aux agents de lutte biologique</i>	10
2) Capacité d'adaptation des agents pathogènes à la protection biologique	10
<u>III. Mécanismes impliqués dans la résistance aux agents de lutte biologique</u>	11
1) Résistance des agents pathogènes aux composés toxiques produits par des agents de lutte biologique	11
2) Résistance des agents pathogènes aux agents de lutte biologique hyperparasites.....	13
3) Moindre sensibilité des agents pathogènes à la compétition nutritive	13
4) Résistance des agents pathogènes aux composés de défense produits par la plante	14

Chapitre 3 : Modèle d'étude : protection biologique contre <i>Botrytis cinerea</i>	15
<u>I. Présentation de <i>Botrytis cinerea</i>, agent de la pourriture grise</u>	15
<u>II. Gamme d'hôtes de <i>Botrytis cinerea</i></u>	15
<u>III. Méthodes de lutte contre <i>Botrytis cinerea</i></u>	16
<u>IV. Diversité et capacité d'adaptation de <i>Botrytis cinerea</i></u>	17
Objectifs spécifiques de l'étude	18
Matériel et méthodes	19
<u>I. Matériel fongique et bactérien</u>	19
1) Collection de souches de <i>Botrytis cinerea</i>	19
2) Production d'inoculum de <i>Botrytis cinerea</i>	19
3) Agents de lutte biologique étudiés	19
<u>II. Matériel végétal</u>	20
<u>III. Mesure de la croissance mycélienne et de la sporulation des souches de <i>B. cinerea</i> in vitro</u>	20
<u>IV. Agressivité de <i>B. cinerea</i> et efficacité de <i>M. dimerum</i> sur plantes entières de tomate</u>	21
<u>V. Agressivité de <i>B. cinerea</i> et efficacité de <i>M. dimerum</i> sur tronçons de tiges de tomate</u>	22
<u>VI. Agressivité de <i>B. cinerea</i> et efficacité de Serenade® Max sur organes foliaires détachés</u>	23
<u>VII. Agressivité de <i>B. cinerea</i> sur différents organes végétaux</u>	24
Résultats	25
<u>I. Etude de l'agressivité des souches de <i>Botrytis cinerea</i></u>	25
1) Agressivité de <i>B. cinerea</i> sur plantes de tomate	25
1.1) <i>Infection des tiges</i>	25
1.2) <i>Sporulation des souches de <i>B. cinerea</i> sur tiges de tomate</i>	25
1.3) <i>Lien entre le niveau d'agressivité sur plantes des souches de <i>B. cinerea</i> et leur capacité de croissance et de sporulation in vitro sur milieu PDA</i>	27
2) Agressivité de <i>B. cinerea</i> sur feuilles de tomate	27
3) Lien entre l'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> sur plantes de tomate et sur d'autres espèces végétales	28
3.1) <i>Agressivité de <i>B. cinerea</i> sur feuilles de laitue</i>	28
3.2) <i>Agressivité de <i>B. cinerea</i> sur différentes espèces végétales</i>	28

II. Efficacité de la lutte biologique	30
1) Sensibilité des souches de <i>B. cinerea</i> à <i>M. dimerum</i>	30
<i>1.1) Diversité de la protection conférée par l'agent de lutte biologique</i>	30
<i>1.2) Lien entre l'agressivité des souches de B. cinerea et la protection conférée par M. dimerum</i>	31
2) Sensibilité de <i>B. cinerea</i> au produit à base de <i>B. subtilis</i> , Serenade® Max	31
<i>2.1) Agressivité de B. cinerea sur feuilles de tomate et sensibilité au produit Serenade® Max</i>	31
<i>2.2) Agressivité de B. cinerea sur feuilles de laitue et sensibilité au produit Serenade® Max</i>	32
<i>2.3) Relation entre le niveau de protection conféré par M. dimerum et celui conféré par Serenade® Max vis-à-vis de B. cinerea</i>	32
Discussion	33
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	39
Sitographie	41
Annexe I	42
Annexe II	44

Contexte scientifique de l'étude

Depuis quelques années la protection biologique connaît un regain d'intérêt, de par une prise de conscience généralisée de la nécessité d'une meilleure protection de l'environnement et en raison d'un souci croissant de la qualité des produits imposée par les consommateurs. Le parlement européen a approuvé en janvier 2009 une nouvelle législation¹ en matière de pesticides pour la protection des cultures en Europe, en remplacement de la directive EC-91/414. Ces directives vont conduire à des réductions marquées du type de produits phytosanitaires utilisables et à des restrictions sévères sur la façon de les utiliser. Parallèlement, le ministère français de l'agriculture a lancé le plan Ecophyto-2018² visant à promouvoir une agriculture plus durable, en particulier en réduisant de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires dans les cultures d'ici 2018.

Une des conséquences de cette demande pour une réduction des pesticides est une augmentation des besoins en outils 'non chimiques' de protection des cultures. Compte tenu de l'importance des investissements nécessaires pour le développement de ces méthodes de protection dites 'non chimiques', une connaissance de leur durabilité potentielle constitue un élément clé à leur développement afin de limiter les risques d'apparition rapide de résistances chez les agents pathogènes.

Ainsi la durabilité de la protection biologique, méthode de lutte qui utilise des organismes vivants ou leurs produits pour lutter contre les insectes ravageurs ou les agents pathogènes, doit être étudiée.

L'érosion de l'efficacité de la protection biologique pourrait résulter de l'émergence, sous pression de sélection, de mutants résistants et/ou de la préexistence d'isolats moins sensibles de l'agent pathogène dans les populations naturelles.

Au niveau scientifique, malgré la grande quantité d'articles publiés sur la protection biologique contre les maladies des plantes, la diversité de sensibilité et le potentiel évolutif des agents pathogènes vis-à-vis des agents de lutte biologique restent des domaines de connaissance très parcellaires. La plupart des études réalisées sur le domaine concernent des agents de lutte biologique producteurs d'antibiotiques. A notre connaissance, la durabilité de l'efficacité d'agents de protection biologique agissant par d'autres modes d'action (tels que la compétition nutritive ou l'induction des mécanismes de défense des plantes) n'a pas encore réellement été étudiée.

Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude est d'estimer le potentiel de contournement d'agents de lutte biologique au sein des populations naturelles d'un agent pathogène. Le modèle d'étude est le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, qui constitue une menace économique récurrente sur de nombreuses cultures et pour lequel un manque ou des pertes d'efficacité des méthodes de lutte utilisées en pratique sont régulièrement observés.

Ainsi, l'évaluation de la sensibilité de *B. cinerea* à des agents de lutte biologique agissant selon d'autres modes d'action que l'antibiose sera menée afin d'estimer les risques de perte de leur efficacité. L'objectif spécifique majeur de ce travail est d'évaluer si le niveau de protection conféré par un agent de lutte biologique agissant par compétition nutritive dépend du niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea*. L'agent de lutte biologique étudié est le champignon *Microdochium dimerum*. Pour ce faire, l'agressivité des souches de *B. cinerea* sera étudiée afin de voir si toutes les souches considérées appartiennent à la même gamme d'agressivité. Un second objectif est d'évaluer si une moindre sensibilité à un agent de lutte biologique confère une moindre sensibilité à un autre agent de lutte biologique. Pour ce faire, un produit à base de *Bacillus subtilis*, dont l'activité est liée à une combinaison de mécanismes d'action sera testé.

¹Directives 2009-127-EC and 2009-128-EC, and Regulations EC-1107-2009 and EC-1185-EC

²Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. PLAN ECOPHYTO 2018 de réduction des usages de pesticides 2008-2018

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La protection biologique contre les maladies des plantes

La protection biologique, ou 'lutte' biologique, est définie par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique et intégrée contre les animaux et les plantes nuisibles) comme 'l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs aux productions végétales' (1971). Nous élargirons ici cette définition en considérant comme agents de lutte biologique les microorganismes (bactéries, champignons, virus), les composés organiques tels que les extraits de plante ainsi que les substances minérales d'origine naturelle qui permettent le contrôle d'agents pathogènes. Le contrôle biologique offre une alternative prometteuse pour suppléer ou compléter les méthodes conventionnelles de lutte contre les maladies des plantes. En effet le recours aux agents de lutte biologique semble peu nocif pour l'environnement et leurs modes d'action complexes devraient réduire les risques d'apparition de résistances (Duffy *et al.*, 2003).

I) Modes d'action des agents de lutte biologique

Les modes d'action impliqués dans la protection biologique des plantes contre l'attaque d'agents pathogènes par des agents de lutte biologique sont divers. L'implication de plusieurs de ces mécanismes est souvent observée chez les agents de lutte biologique dont les modes d'action sont connus.

1) Antibiose

L'antibiose est l'un des modes d'action les plus étudiés chez les agents de lutte biologique microbiens, notamment chez les bactéries et les champignons (Jacobsen, 2006). Il s'agit de la production par un microorganisme de métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène qui vont inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes. Certaines de ces substances ont été précisément identifiées et caractérisées, comme la gramicidine sécrétée par *Brevibacillus brevis* qui inhibe la germination et la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Edwards & Seddon, 2001). La pyrrolnitrine, antibiotique isolé chez plusieurs bactéries et notamment chez *Pseudomonas cepacia*, inhibe la croissance de *B. cinerea* et de *Penicillium expansum* en bloquant le système respiratoire de ces champignons responsables de pourritures post-récolte sur pommes et poires (Janisiewicz *et al.*, 1991).

2) Hyperparasitisme

Le parasitisme des agents pathogènes par d'autres microorganismes repose sur la production d'enzymes dégradant les parois cellulaires des agents pathogènes. Le parasite pénètre dans les cellules de sa cible et le détruit *via* la colonisation de ses organes. Le parasitisme des champignons a été largement étudié, notamment avec *Trichoderma*, *Gliocladium* et *Pythium* spp. qui figurent parmi les principaux parasites reconnus. Le champignon *Coniothyrium minitans* parasite l'agent pathogène *Sclerotinia sclerotiorum* en produisant des enzymes qui dégradent les parois cellulaires de l'agent pathogène cible. Cette méthode de protection s'est avérée efficace au champ sur tournesol et en serre sur laitue après incorporation dans le sol de *C. minitans* avant plantation (Whipps & Gerlagh, 1992). *Gliocladium roseum* colonise les hyphes et les conidies de *B. cinerea* (Yu & Sutton, 1997). *Pythium periplocum* s'avère efficace pour parasiter le mycélium de *B. cinerea* (Elad & Stewart, 2004). Le parasitisme des oïdiums par *Ampelomyces quisqualis* est un exemple très classique de contrôle biologique par parasitisme (Jacobsen, 2006). Etant donné le cycle principalement ectotrophique des oïdiums, on peut penser qu'ils sont des cibles faciles pour les hyperparasites : *A. quisqualis* est capable de coloniser les hyphes et les conidiophores de nombreuses espèces d'oïdium, formant des pycnides dans les conidiophores de l'hôte (Hashioka and Nakai, 1980).

3) Compétition nutritive

Les microorganismes peuvent inhiber les agents pathogènes en entrant en compétition pour les nutriments du milieu. La compétition pour le fer est un exemple de compétition nutritive bien connu (Handelsman & Stabb, 1996), qui serait notamment un facteur clé du contrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* par *Trichoderma asperellum* T34. En effet, dans un milieu pauvre en fer *P. asperellum* T34 produit des sidérophores, chélateurs du fer, et entre ainsi en compétition ferrique avec *F. oxysporum* (Segarra *et al.*, 2010).

La réduction de la concentration en nutriments dans le milieu conduit généralement à un taux réduit de spores germées de l'agent pathogène et à un ralentissement de sa croissance mycélienne, limitant ainsi l'infection et l'expansion des lésions (Elad & Stewart, 2004). Plusieurs études démontrent que des levures appliquées en post-récolte agissent par compétition nutritive pour protéger les blessures sur fruits. C'est le cas de *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces roseus* et *Candida spp.*, dont *Candida oleophila*, qui protègent les pommes principalement contre *B. cinerea* et *Penicillium expansum* (Elad & Stewart, 2004). La bactérie *Pseudomonas sp.* utilise les acides aminés plus vite que les conidies de *B. cinerea*. Il a été montré que l'inhibition de la germination des conidies de ce champignon est corrélée à la quantité d'acides aminés prélevés par la bactérie (Brodie & Blakeman, 1975). Le champignon *Trichoderma harzianum* T39 inhiberait également la germination des conidies de *B. cinerea* en entrant en compétition nutritive avec ce dernier (Elad & Stewart, 2004). Le champignon *Ulocladium atrum* agirait par compétition nutritive pour lutter contre les agents pathogènes nécrotrophes tels que *B. cinerea*. Il permet de réduire de 90% la sporulation de *B. cinerea* sur feuilles nécrotiques de lys (Kohl *et al.*, 1995). De plus, l'application de spores d'*U. atrum* sous serre sur plants de tomate, cyclamens, géraniums et roses réduit significativement l'infection par *B. cinerea* (Paulitz & Belanger, 2001). Le champignon *Microdochium dimerum* qui utilise efficacement les ressources nutritives du milieu permettrait également de lutter contre *B. cinerea* par compétition nutritive, notamment pour protéger les plaies d'effeuillage des plants de tomate (Decognet *et al.*, 1997). Dans le sol une compétition nutritive pour le carbone peut être observée ; c'est le cas entre les souches pathogènes et non pathogènes de *Fusarium oxysporum*. C'est un des modes d'action principaux de l'agent de lutte biologique *F. oxysporum* contre la flétrissure provoquée par les souches pathogènes de cette même espèce (Alabouvette *et al.*, 2009).

4) Interférence avec le pouvoir pathogène

Les agents de lutte biologique peuvent interférer avec les facteurs du pouvoir pathogène en inhibant ou en dégradant certaines enzymes hydrolytiques (cutinases, pectinases) produites par les agents pathogènes. Ainsi l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* est réduite en présence de *T. harzianum*, entraînant une pénétration réduite du champignon dans les tissus de l'hôte et donc une infection réduite (Kapat *et al.*, 1998). Certains microorganismes peuvent avoir un effet indirect sur la mise en place de la pathogénèse, par exemple en modifiant le pH du milieu ; c'est le cas de *Bacillus pumilus* et *Pseudomonas fluorescens* (Swadling & Jeffries, 1998) qui limitent le pouvoir pathogène de *B. cinerea* sur fraise en élevant le pH du milieu de 6 à 8,5. Des pH alcalins entraînent en effet une réduction de l'efficacité des enzymes de dégradation des tissus de la plante produites par *B. cinerea*, en particulier des pectinases (Schoonbeek *et al.*, 2007).

Schoonbeek *et al.* (2007) ont étudié le potentiel de bactéries à dégrader l'acide oxalique afin de contrôler *B. cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum*, deux agents pathogènes sécrétant de l'acide oxalique pour infecter leurs plantes hôtes. La dégradation de ce composé permet d'interférer avec le processus d'infection. L'étude mentionne quatre souches bactériennes capables de dégrader l'acide oxalique et qui permettent une protection de 30 à 70% contre *B. cinerea* sur *Arabidopsis thaliana*, concombre, tomate et vigne.

5) Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante

Certains microorganismes peuvent changer les propriétés de surface des feuilles en produisant des biosurfactants. Ainsi, la bactérie *Pseudomonas* spp. est capable de modifier la mouillabilité de la surface des feuilles du blé *Triticum aestivum* (Bunster *et al.*, 1989). La production de biosurfactants entraîne un assèchement de la surface foliaire et gênerait le processus d'attachement et la croissance des agents pathogènes sur les feuilles. La bactérie *Brevibacillus brevis* produit un biosurfactant isoforme de la surfactine (Wang *et al.*, 2010) qui stimule l'étalement et donc le séchage des gouttes d'eau sur feuilles de chou. Cette propriété permet de réduire la période d'humidité des feuilles, ce qui est défavorable au développement du champignon pathogène *B. cinerea* (Edwards & Seddon, 1992).

6) Stimulation des défenses de la plante

Les agents de lutte biologique tels que les microorganismes, les composés organiques et les substances minérales d'origine naturelle peuvent induire une résistance chez la plante hôte par l'activation de ses systèmes de défense. Ces défenses peuvent entre autres impliquer la production de substances antibiotiques par la plante (type phytoalexines) ou le renforcement des parois cellulaires pour ralentir la progression de l'agent pathogène (Jacobsen, 2006).

Des composés organiques tels que certains extraits de plante peuvent être inducteurs de défenses. C'est le cas de l'extrait de feuilles de la renouée géante *Fallopia (Reynoutria) sachalinensis* qui, pulvérisé à une concentration de 2% sur des plantes de concombre, permet le contrôle de l'oïdium, *Podosphaera xanthii*, en réduisant la sévérité de l'attaque sur feuilles de 50% à 100%. Cet extrait de plante induit l'accumulation de composés phénoliques fongitoxiques dans les feuilles soumises au traitement (Daayf *et al.*, 1995). Le composé chitosan, forme soluble de chitine issue des coquilles de crustacés, s'avère avoir des propriétés d'induction des réactions de défense chez de nombreuses espèces horticoles et permet le contrôle de nombreuses maladies de pré ou post-récolte dont notamment *B. cinerea*. Le chitosan entraîne l'accumulation de chitinases, de glucanases, de composés phénoliques et induit la lignification et la synthèse de phytoalexines dans les tissus infectés (Bautista-Banos *et al.*, 2006). Le silicium soluble est utilisé en productions de concombres et de roses pour offrir une meilleure protection notamment contre l'oïdium. Cet élément agit dans les tissus du concombre en affectant les signaux entre l'hôte et l'agent pathogène, ce qui entraîne une activation rapide et intense des mécanismes de défense de la plante (Belanger *et al.*, 1995).

7) Combinaison de mécanismes d'action

Ces différents modes d'action ne sont pas incompatibles, ils peuvent au contraire être complémentaires et une même espèce voire une même souche d'un agent de lutte biologique peut posséder plusieurs de ces modes d'action. Ainsi, chez les espèces de *Trichoderma*, tous les modes d'action précédemment cités seraient impliqués (Jacobsen, 2006). La bactérie *Bacillus subtilis* souche QST713, formulée dans le produit Serenade®, est présumée agir par antibiose, parasitisme, compétition et par induction de défenses chez la plante hôte pour contrôler de nombreux agents pathogènes tels que *B. cinerea*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et les agents pathogènes responsables de l'oïdium (Paulitz & Belanger, 2001). Dans certains cas les agents de lutte biologique ont néanmoins un mode d'action dominant. *Pseudomonas cepacia*, et *Pseudomonas fluorescens* agissent principalement par antibiose mais peuvent occasionnellement agir par compétition et parasitisme (Guetsky *et al.*, 2002). *Pichia guilhermondii* et *Candida famata* agissent surtout par compétition nutritive et spatiale mais aussi par l'induction de défenses en stimulant la synthèse de phytoalexines par la plante hôte (Guetsky *et al.*, 2002). L'extrait de feuilles de *F. sachalinensis*, dont le mode d'action principal est l'induction de défenses de la plante, a également un effet direct contre l'oïdium du blé, *Blumeria graminis*, en inhibant la germination de ses spores (Randoux *et al.*, 2006).

II) Utilisation en pratique du contrôle biologique

Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les agents de lutte biologique utilisés contre les agents phytopathogènes à dissémination aérienne, auxquels appartient *B. cinerea* qui est l'objet principal de notre étude.

1) Produits commercialisés

La majorité des succès de protection biologique qui ont été rapportés met en jeu des microorganismes tels que des bactéries, des champignons ou des virus antagonistes. Cependant de plus en plus de publications font référence à l'utilisation d'autres types d'agents de lutte biologique, par exemple des extraits de plante ou des substances minérales. Une étude bibliographique menée dans le cadre du projet européen ENDURE (European Network for Durable Exploitation of crop protection strategies) fait référence à 157 espèces de microorganismes permettant un contrôle significatif d'agents pathogènes. Ils appartiennent à 36 genres de champignons ou oomycètes, 13 de levures et 25 de bactéries. Parmi ces microorganismes référencés, 29 espèces de champignons/oomycètes et 18 espèces de bactéries se sont avérées efficaces en plein champ pour contrôler au moins l'une des cinq maladies aériennes principales faisant l'objet de l'étude (*Botrytis*, oïdiums, rouilles, mildious dont *Phytophthora infestans*, Moniliose) (Nicot *et al.*, 2011).

Aux USA, les substances autorisées dans le cadre du contrôle biologique sont très nombreuses (US Environmental Protection Agency) et depuis 2006 plusieurs nouveaux produits sont homologués chaque année, dont onze en 2011 (annexe I).

Les substances autorisées pour le contrôle biologique au sein de l'Union Européenne sont répertoriées à l'annexe 1 de la directive européenne 91/414. Parmi ces substances, 15 microorganismes et 4 extraits de plante sont homologués pour contrôler des agents phytopathogènes (tab. 1, p 6). A ce jour, seulement douze produits sont homologués en France pour lutter contre des agents phytopathogènes et la plupart fait intervenir des microorganismes comme agents de lutte biologique (tab. 1, p 6). Un autre produit est actuellement en cours d'homologation par la société Agrauxine qui dispose d'une ADE (Autorisation de Distribution pour Expérimentation) afin de développer le produit AntiBot à base du champignon *Microdochium dimerum* pour lutter contre la pourriture grise de la tomate.

2) Difficultés identifiées liées à la fluctuation d'efficacité des agents de lutte biologique

La protection biologique contre les maladies des plantes à l'aide d'agents de lutte biologique appliqués dans la phyllosphère est assez difficile, en premier lieu car la surface des feuilles est un environnement hostile pour les microorganismes introduits. En effet les ressources en nutriments y sont pauvres, les agents de lutte biologique sont soumis à des flux d'eau, des fluctuations de température et de pression de vapeur, une exposition directe aux radiations UV et infrarouges, et sont en compétition avec d'autres microorganismes de la phyllosphère (Jacobsen, 2006). Tous ces facteurs varient selon l'âge de la feuille, les flux de l'environnement physique et la génétique de la plante hôte et vont affecter la survie, l'établissement et l'activité des microorganismes introduits. Etant données ces inconstances de l'environnement biologique et physique, la recherche d'agents de lutte biologique introduits dans la phyllosphère a été privilégiée pour les cultures sous serres ou en conditions de stockage post-récolte où l'environnement peut être contrôlé. Ainsi la plupart des études qui rapportent une bonne efficacité d'agents de lutte biologique ont été réalisées en conditions contrôlées. L'efficacité à l'échelle commerciale de ces microorganismes est plus problématique et certains microorganismes ayant une bonne efficacité en conditions contrôlées peuvent s'avérer moins efficaces voire totalement inefficaces lorsqu'ils sont introduits dans la phyllosphère en conditions commerciales (Guetsky *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Substances actives autorisées dans certains pays de l'Union Européenne pour lutter contre des agents phytopathogènes (à partir de *EU Pesticide Database* ; Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

	Micro-organisme	Date d'inclusion	Pays	Produit (société)	Cultures	Agents pathogènes cibles	Modes d'action
F	<i>Ampelomyces quisqualis</i> souche AQ10	01/04/2005	BG, CY, DE, EL, ES, FR , IT, SI	AQ10 (Intrachem)	Vigne, cultures maraichères et florales	Différentes espèces d'oïdium	HYP
	<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	01/02/2007	DE, FR , IE, IT, SI, UK	Serenade WP (AgraQuest)	Blé, triticales, vigne, cultures maraichères et florales, arbres fruitiers	<i>Venturia inaequalis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Monilia</i> , <i>Septoria</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	COMP, ISR, fongistatique et fongitoxique: perturbation des hyphes après contact avec le champignon pathogène
	<i>Candida oleophila</i> souche O	15/11/2008	FR	Nexy (Bionext)	Traitement post-récolte des Pomaceae	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	
	<i>Coniothyrium minitans</i>	01/01/2004	AT, BE, CZ, DE, DK, EL, ES, FR , IE, IT, LU, NL, PL, SE, SK, UK	Contans WG (Prophyta GmbH)	Colza, laitue, décontamination du sol	<i>Sclerotinia Sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia minor</i>	HYP
	<i>Gliocladium catenulatum</i> souche J1446	01/04/2005	BE, EE, FI, SE, UK	PreStop Mix (Verdera Oy)	Semences : légumes, plantes ornementales, aromates	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i>	HYP, COMP Production d'enzymes lytiques
	<i>Paecilomyces lilacinus</i> souche 251	01/08/2008	BG, IT	PBP-01001-I (Prophyta)	Tomate, tabac, céleri, laitue, cucurbitacées, carotte, vigne, plantes ornementales	<i>Pratylenchus</i> , <i>Globodera</i> , <i>Meloidogyne</i>	HYP
	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	01/01/2009	DK, EE, FI, LV, PL, SE, UK	Rotstop (Verdera Oy)	Pins et épicéas	<i>Heterobasidion annosum</i> , <i>Heterobasidion parviporum</i>	COMP
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> souche MA342	01/10/2004	AT, BE, DE, DK, ES, FI, FR , IT, LT, LU, NL, SE, UK	Cedomon, Cerall (Belchim)	Monocotylédones : seigle, avoine, orge, blé, triticales	<i>Tilletia caries</i> , <i>Tilletia foetida</i> , <i>Fusarium nivale</i>	COMP, HYP, ATB
	<i>Pythium oligandrum</i> souche M1	01/01/2009	CZ, PL, SK	Polyversum (Biopreparáty Co.)	Colza	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i>	HYP, ATB, COMP, ISR
	<i>Streptomyces</i> K61 (ex- <i>S. griseoviridis</i>)	01/01/2009	BE, EE, EL, ES, FI, HU, IT, LT, NL, SE	Mycostop (Verdera Oy)	Semences de légumes, aromates, plantes ornementales, bulbes, fleurs coupées	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>	HYP Colonisation des racines

	<i>Verticillium albo-atrum</i> (ex- <i>V. dahliae</i>) souche WCS850	01/01/2009	FR, NL	DutchTrig (BTL Bomendienst B.V.)	Orme (<i>Ulmus</i> sp.)	<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	ISR
	Virus ZYMV-WK	22/06/2006	FR	AgroguardZ (Bio-Oz Biotechnologies)	Parties aériennes du concombre, melon, courgette	Virus ZYMV	
	<i>Trichoderma polysporum</i> souche IMI 206039	01/01/2009	SE	Binab TF WP (BINAB Bio-Innovation AB)	Arbres d'ornement, fraises	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i>	HYP, ATB, ISR COMP
	<i>Trichoderma gamsii</i> (ex- <i>T. viride</i>) souche ICC080 = <i>T. asperellum</i> T11 et TV1	01/01/2009	CY, ES, SI	Virisan, Remedier	Tomate	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Phoma</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Fusarium</i>	COMP, HYP, ISR Sécrétion d'enzymes lysant les parois cellulaires, de substances antifongiques, stimulation croissance, solubilisation des nutriments
	<i>Trichoderma atroviride</i> (ex- <i>T. harzianum</i>) souche T11 = <i>T. asperellum</i> ICC012	01/01/2009	ES, IT, SE, FR	Trianum (Koppert) Esquive (Agrauxine)	Cultures légumières et florales / Vigne	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i>	
P	Extrait d'arbre à thé	01/09/2009	LV	Timorex (Biomor Latvija)	Cultures maraichères	Différentes espèces d'oïdium, <i>Alternaria solani</i>	
	Extrait de fenugrec	15/04/2010	FR	Stifenia (S.O.F.T.)	Parties aériennes de la vigne	<i>Erysiphe necator</i>	
	Extrait d'ail	01/09/2009	DK, IE, PL, UK	Non défini	Bé, seigle, orge	<i>Puccinia graminis</i> , <i>Pyrenophora teres</i> , <i>Erysiphe graminis</i> ,	
	Huile de clou de girofle	01/09/2009	Northern and Southern Europe	Bioxeda (Xeda International)	Pommes, poires, pêches	<i>Gloeosporium</i> , <i>Penicillium</i>	
A	Acibenzolar-s-méthyl	01/09/2010	FR	Bion 50 WG (Syngenta agro)	Blé ; Tomate	<i>Erysiphe graminis</i> , Diverses bactérioses	
	Laminarine	28/07/2008	FR	Iodus 2 (Goemar)	Parties aériennes du blé, de l'orge, fraises, Pomaceae	<i>Septoria tritici</i> , <i>Septoria nodorum</i> , <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>	
	Phosphonates de potassium	15/06/2010	FR	LBG-01F34 (Luxembourg Pamol : CYPRIS)	Vigne	<i>Plasmopara viticola</i>	

M=Microorganisme, P = Extrait de Plante, A = Autres

AT: Autriche ; BE: Belgique ; BG : Bulgarie ; CY : Chypre ; CZ : République Tchèque ; DE : Allemagne ; DK : Danemark ; EE: Estonie ; EL: Grèce ; ES : Espagne ; FI : Finlande ; FR : France ; HU : Hongrie ; IE : Irlande ; IT : Italie ; LT : Lituanie ; LU: Luxembourg ; LV : Lettonie ; NL: Pays-Bas ; PL: Pologne; SE: Suède ; SI: Slovénie ; SK: Slovaquie ; UA : Ukraine ; UK : Royaume-Uni.

COMP: compétition nutritive, HYP: hyperparasitisme, ATB: antibiose, ISR: Induction des défenses de la plante

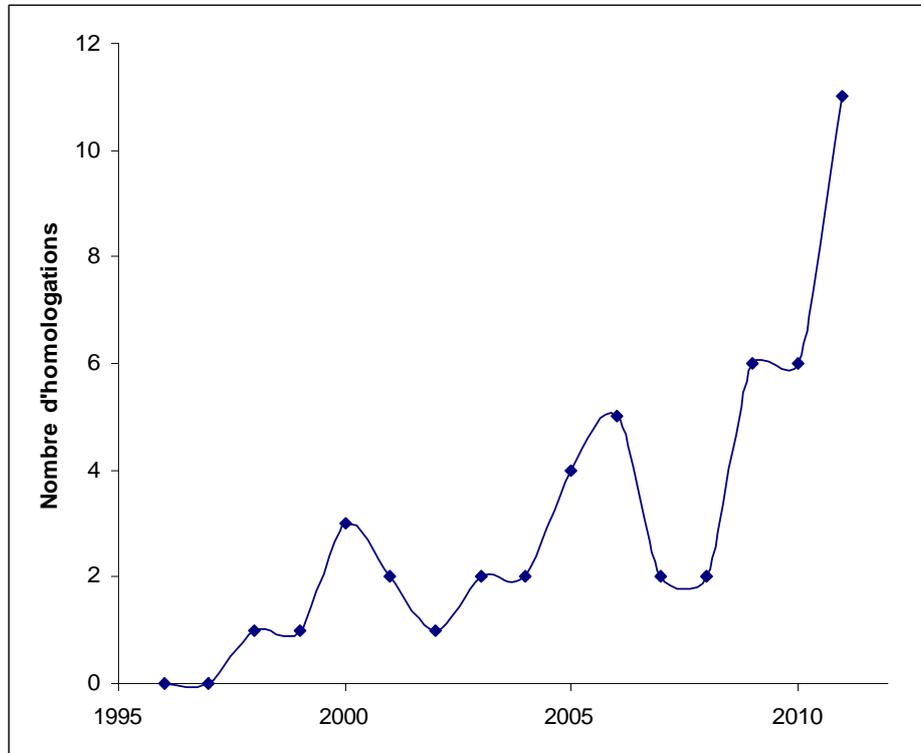


Figure 1 : Evolution du nombre de nouveaux microorganismes homologués aux USA contre les agents phytopathogènes, entre 1996 et 2011 (à partir de *US Environmental Protection Agency*).

Cette efficacité variable au champ pourrait être due en partie à une différence de sensibilité des agents pathogènes aux agents de lutte biologique, avec l'existence d'isolats moins sensibles au sein des populations naturelles d'agents pathogènes. Souvent, lors des étapes de sélection des agents de lutte biologique, un nombre très restreint de souches de l'agent pathogène est testé. La variabilité de sensibilité, observable au champ, des agents pathogènes aux agents de lutte biologique n'est alors pas prise en compte.

3) Risques liés à l'intensification de l'utilisation des agents de lutte biologique

Depuis ces dernières années, de nombreuses recherches ont été menées afin d'identifier de nouveaux agents de lutte biologique et le nombre de produits à base de microorganismes homologués est en constante augmentation, par exemple aux USA (fig. 1), pour atteindre onze nouveaux microorganismes homologués en 2011. On pourrait craindre que la généralisation du contrôle biologique, en particulier dans le cas d'une application massive d'agents de lutte biologique de même mode d'action, puisse nuire à leur efficacité en favorisant l'apparition de souches pathogènes résistantes comme dans le cas de l'utilisation massive de fongicides.

Notons qu'actuellement les microorganismes homologués comme agents de lutte biologique semblent être relativement variés en termes de modes d'action, ce qui devrait limiter les risques de pressions de sélection trop fortes sur les populations d'agents pathogènes (tab. 1, p 6). En effet, d'après Duffy *et al.* (2003) l'apparition de résistances aux agents de lutte biologique est moins probable que l'apparition de résistances aux fongicides du fait de l'intervention de plusieurs modes d'action ; or la résistance multiple à divers caractères d'un microorganisme devrait être peu fréquente.

De plus, lorsque l'acquisition de résistance à un agent de lutte biologique est associée à un coût de fitness important des souches de l'agent pathogène, le risque de perte totale d'efficacité de l'agent de lutte biologique reste limité. Ainsi la résistance de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par divers agents de lutte biologique, est systématiquement associée à une réduction de la croissance mycélienne des souches et de leur sporulation ainsi qu'à une diminution de leur agressivité sur plantes et fruits (Ajouz *et al.*, 2010). Cependant l'acquisition d'une résistance n'entraîne pas toujours un coût de fitness chez l'agent pathogène. Schoustra *et al.* (2005) ont mis en évidence chez des mutants d'*Aspergillus nidulans* résistants au fludioxonil, analogue structural de la pyrrolnitrine, des mutations compensatoires qui permettent aux souches mutées de restaurer leur fitness en absence de pression de sélection sans perdre leur résistance au fongicide. Etant donné que le fludioxonil possède une structure et un mode d'action semblables à ceux de la pyrrolnitrine, on peut imaginer qu'un tel phénomène puisse exister dans le cas de l'utilisation d'agents de lutte biologique producteurs de pyrrolnitrine.

4) Vers une protection biologique durable ?

Le choix des agents de lutte biologique doit prendre en compte leurs mécanismes d'action, afin de veiller à varier les pressions de sélection et ainsi améliorer leur durabilité.

Il est également indispensable de prendre en compte la diversité de sensibilité aux agents de lutte biologique pour assurer une protection biologique efficace et durable. Dans la plupart des travaux qui étudient l'efficacité du contrôle biologique, une seule souche de l'agent pathogène est testée. Ces études ne tiennent pas compte de la diversité naturelle des agents pathogènes pour évaluer l'efficacité des agents de lutte biologique sélectionnés. Sur 251 références, résultats d'une recherche bibliographique sur le contrôle biologique de *B. cinerea*, seulement une publication mentionne une étude sur différentes souches de l'agent pathogène.

Or, comme le soulignent Schouten *et al.* (2008) ainsi que Buck et Jeffers (2004), les variations de sensibilité aux agents de lutte biologique et l'observation que certains isolats n'y sont pas sensibles indiquent que le test d'une seule souche est inadapté pour déterminer l'efficacité de cette méthode de lutte. L'établissement d'une gamme de sensibilité d'un agent pathogène cible à un nouveau fongicide est essentiel pour estimer le risque d'apparition de résistance à ce fongicide ; il devrait en être de même dans le cas d'agents de lutte biologique. Yang *et al.* (2008) présentent la démarche à suivre pour évaluer les risques de moindre sensibilité à un agent de lutte biologique en établissant une gamme de sensibilité au physcion (composé actif de l'extrait de rhubarbe) parmi 262 isolats de *Sphaerotheca fuliginea* et 116 isolats de *Pseudoperonospora cubensis*, agents responsables respectivement de l'oïdium et du mildiou des cucurbitacées. Leurs résultats montrent très peu de variabilité de la sensibilité des isolats de ces deux champignons à cet extrait de plante. D'autre part, la réalisation de générations successives de ces agents pathogènes en présence de physcion ne révèle pas de perte de sensibilité : les valeurs d'EC50 (concentration en physcion efficace pour réduire de 50% la germination des spores des agents pathogènes, par rapport au témoin) restent stables après quinze générations. D'après les auteurs, malgré le taux de reproduction élevé de ces agents pathogènes, le risque de développement de résistance au physcion semble relativement faible. Inversement, Ajouz *et al.* (2011) ont montré l'existence parmi 204 isolats de *B. cinerea* de souches significativement moins sensibles à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par la bactérie *Pseudomonas chlororaphis*. La réalisation de générations successives de cet agent pathogène en présence de l'antibiotique aboutit à une résistance forte (FR > 1000) à l'antibiotique et à une moindre sensibilité à *P. chlororaphis* (Ajouz *et al.*, 2010). Une telle démarche doit être menée dans le cas de l'utilisation d'agents de lutte biologique et notamment de microorganismes antagonistes, afin d'évaluer le risque d'apparition de résistance ou de moindre sensibilité, qui sera d'autant plus important que la variation de sensibilité au sein de la population d'agents pathogènes est élevée.

Chapitre 2 : Durabilité de la protection biologique

La durabilité d'une méthode de protection des plantes se définit comme la persistance dans le temps et l'espace de son efficacité. Elle dépend de la pression de sélection exercée par la méthode de lutte sur les populations d'agents pathogènes et également de la capacité de ces agents pathogènes à s'adapter à cette méthode de lutte.

L'érosion de l'efficacité des méthodes de protection des plantes est une problématique déjà étudiée, par exemple dans le cas de la lutte génétique. McDonald et Linde (2002) estiment que les populations d'agents pathogènes ayant un fort potentiel d'évolution sont plus à même de contourner une résistance variétale. Ils précisent que les agents pathogènes ayant le plus de risques de contourner un gène de résistance sont ceux ayant un système de reproduction mixte (sexué et asexué), un flux de gènes important, une grande taille de population et un fort taux de mutations.

La durabilité de la lutte chimique a également été largement étudiée du fait de l'apparition fréquente et récurrente de résistances des agents pathogènes en particulier aux fongicides. Parmi le nombre limité des produits antifongiques existants, tous seraient compromis par l'émergence de résistances chez les champignons pathogènes, notamment dans le domaine médical (Cowen, 2001).

Face aux cas reconnus d'acquisition de résistance à des méthodes de lutte, on peut s'interroger sur la durabilité de la protection biologique et précisément sur les risques de perte d'efficacité des agents de lutte biologique. Notons qu'à ce jour, très peu d'études existent sur l'érosion de l'efficacité de cette méthode de protection des plantes.

I) Cas de perte d'efficacité en pratique de la protection biologique

Le recours à des microorganismes entomopathogènes pour réguler les populations d'insectes ravageurs a été proposé par plusieurs scientifiques dès la fin du 19^{ème} siècle et depuis les agents de lutte biologique utilisés contre ces ravageurs ont été largement utilisés (Sanchis & Bourguet, 2008). Des cas de résistance à *Bacillus thuringiensis*, le bio-insecticide microbien le plus largement utilisé, ont pu être observés plusieurs années après sa mise sur le marché (Tabashnik, 1994). Le premier cas de résistance à *B. thuringiensis* a été constaté par McGaughey (1985) chez le lépidoptère *Plodia interpunctella*, la teigne des fruits secs, ravageur majeur des grains en stockage. Après plusieurs générations soumises au traitement, le niveau de résistance augmente de trente fois après seulement deux générations et il est cent fois plus élevé par rapport à celui du témoin après quinze générations. Tabashnik (1994) a également montré des cas de résistance à cette bactérie chez de nombreux insectes et des pertes d'efficacité au champ ont été observées après son utilisation massive pendant plus de 20 ans.

D'autres cas de résistance d'insectes ravageurs à des agents de lutte biologique ont été mis en évidence. Par exemple, le virus de la granulose du carpocapse a été utilisé pendant 15 ans comme bio-insecticide contre le carpocapse des pommes, *Cydia pomonella*, avec deux à trois millions d'hectares de vergers traités chaque année à travers le monde. En 2004, les premiers cas de populations de carpocapses résistantes au champ à ce virus ont été rencontrés en France et en Allemagne dans des vergers de Pomaceae (Berling *et al.*, 2009 ; Asser-Kaiser *et al.*, 2007)

Contrairement au cas des ravageurs invertébrés, la durabilité de la protection biologique contre les agents phytopathogènes a jusqu'ici été très peu étudiée et il n'existe pas de publication démontrant leur perte d'efficacité en pratique. Cependant plusieurs travaux mettent en évidence des différences de sensibilité aux agents de lutte biologique et à des composés qu'ils synthétisent ou qui sont synthétisés lors de leur interaction avec les plantes.

II) Risques d'érosion de l'efficacité des agents de lutte biologique

1) Différence de sensibilité aux agents de lutte biologique dans les populations naturelles d'agents pathogènes

Dans la littérature, plusieurs études mentionnent une variabilité de la sensibilité des agents pathogènes aux agents de lutte biologique ou à des composés qu'ils synthétisent. Cette variabilité de sensibilité est, selon les études, inter ou intra spécifique. La quasi-totalité des études réalisées dans ce domaine concerne des agents de lutte biologique agissant par antibiose, avec une sensibilité variable des agents pathogènes aux antibiotiques produits par l'antagoniste.

1.1) Spécificité d'action des agents de lutte biologique

La variabilité interspécifique de sensibilité des agents pathogènes à des composés antibiotiques produits par des agents de lutte biologique va dicter leur spectre d'efficacité.

Gurusiddaiah *et al.* (1986) ont étudié la sensibilité à la phénazine-1-acide carboxylique (PCA) produite par la bactérie *Pseudomonas* spp. chez plusieurs champignons et oomycètes, notamment parmi plusieurs espèces de *Pythium*. Certaines telles que *P. ultimum* var. *sporangiferum* s'avèrent relativement peu sensibles à cet antibiotique. Des résultats comparables, obtenus par De Souza *et al.* (2003), montrent une diversité de sensibilité au 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG) parmi treize espèces de *Pythium*, *P. volutum* étant très sensible tandis que *P. deliense* est relativement résistante. La variation de sensibilité parmi les espèces du genre *Pythium* ainsi que le fait que différentes espèces pourront se trouver simultanément au même endroit vont avoir un fort impact sur le succès ou du moins sur la régularité du contrôle biologique conféré par les souches de *Pseudomonas* productrices de 2,4-DAPG.

Milner *et al.* (1996) rapportent également une variation *in vitro* de la sensibilité à la kanosamine, antibiotique produit par *Bacillus cereus*, chez trois espèces de *Pythium*.

Enfin, Belanger et Deacon (1996) et Benyagoub *et al.* (1996) ont montré que les croissances de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* et d'*Idriella bolleyi* ne sont pas inhibées par le champignon antagoniste *Sporotrix flocculosa*, alors que cet agent de lutte biologique s'avère très efficace contre *B. cinerea* et *Cladosporium cucumerinum*. Cela suggère que la sensibilité aux antibiotiques produits par cet agent de lutte biologique, identifiés comme étant des acides gras, dicte la gamme cible de l'antagoniste. Les antibiotiques ainsi produits par *S. flocculosa* ne sont pas des composés génériques et affectent de façon sélective un nombre restreint de champignons.

1.2) Diversité intra-spécifique de la sensibilité des agents pathogènes aux agents de lutte biologique

La diversité intra-spécifique de sensibilité des agents pathogènes aux agents de lutte biologique risque d'entraîner l'émergence de génotypes moins sensibles à ces agents de lutte biologique au sein des populations naturelles d'agents pathogènes. Mazzola *et al.* (1995) ont montré une sensibilité variable de 71 isolats de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* aux antibiotiques PCA et 2,4-DAPG produits par *Pseudomonas* spp, bactéries reconnues comme potentiellement efficaces comme agents de lutte biologique. Schouten *et al.* (2004) ont montré que 17% des souches de *F. oxysporum* testées sont naturellement tolérantes au 2,4-DAPG produit par *Pseudomonas fluorescens* ; cette tolérance pouvant être de dix fois la dose létale pour les souches sensibles. Ces résultats suggèrent une possible résistance des souches aux antagonistes producteurs de cet antibiotique, d'autant plus que la tolérance au 2,4-DAPG est largement distribuée dans le monde au sein de différentes populations de *F. oxysporum*. Ajouz *et al.* (2011) ont étudié 204 isolats de *B. cinerea* et ont montré que ce champignon possède un large spectre de sensibilité *in vitro* à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par diverses bactéries antagonistes, et que certaines souches de l'agent pathogène ont une sensibilité significativement moindre à cet antibiotique. Buck et Jeffers (2004) ont montré que 29 isolats de *B. cinerea* ont une sensibilité variable à *Rhodotorula glutinis* PM4, levure agissant par compétition nutritive et productrice d'acide rhodotorulique (Sansone *et al.*, 2005). Les diamètres des lésions causées par différents isolats de *B. cinerea* sur disques foliaires de géranium varient de 0,2 à 13,1 mm en présence de la levure antagoniste. Certains isolats sont totalement insensibles à cet agent de lutte tandis que d'autres sont significativement moins agressifs en sa présence, ce qui se traduit par un moindre développement des lésions sur disques foliaires.

Cette variation de sensibilité intra-spécifique aux composés produits par des agents de lutte biologique pourrait contribuer à une moindre efficacité de ces antagonistes au champ, de part l'existence de génotypes relativement moins sensibles de l'agent pathogène. D'autre part, Mazzola *et al.* (1995) suggèrent que l'utilisation massive d'agents de lutte biologique producteurs d'antibiotiques pourrait sélectionner une population d'agents pathogènes résistante à cette méthode de lutte.

2) Capacité d'adaptation des agents pathogènes à la protection biologique

Par des expériences d'évolution expérimentale en conditions de laboratoire, Ajouz *et al.* (2010) ont démontré que *B. cinerea* peut devenir moins sensible à la pyrrolnitrine en développant une résistance à cet antibiotique. Cette acquisition de résistance est accompagnée d'une perte d'efficacité *in vitro* de l'antagoniste producteur de pyrrolnitrine. Cette adaptation a été observée après vingt générations successives sous pression de sélection *in vitro* avec des doses sub-létales et croissantes de pyrrolnitrine.

Des résultats similaires ont été observés pour cinq souches de *B. cinerea*, quel que soit leur phénotype initial. Cependant, l'acquisition de cette résistance est accompagnée d'un fort coût de fitness, qui réduit la croissance mycélienne et la sporulation du champignon.

Les travaux de Li et Leifert (1994) suggèrent que *B. cinerea* est capable de développer une résistance à la bactérie *Bacillus subtilis* après traitements répétés sur plantes d'*Astilbe hybrida*. Cet agent de lutte biologique produit différents composés, dont un antibiotique qui semble efficace contre *B. cinerea*. L'efficacité de l'agent de lutte biologique a fortement chuté après huit traitements successifs et cette méthode de lutte est devenue totalement inefficace à l'issue du dixième traitement.

Ces deux exemples illustrent la capacité des agents pathogènes, et de *B. cinerea* en particulier, à contourner l'effet d'un agent de lutte biologique agissant par antibiose. On peut donc craindre qu'en cas de forte pression de sélection due à la généralisation de cette méthode de lutte il y ait apparition de résistances, comme dans le cas de l'application de fongicides.

D'autres pressions de sélection entraînent des résistances aux agents de lutte biologique. En particulier, l'utilisation de pesticides pourrait nuire à l'efficacité des agents de lutte biologique. Ainsi, Ajouz (2009) a mis en évidence que la pression exercée par le fongicide iprodione (dicarboximide) sur la population de *B. cinerea* entraîne l'apparition d'une résistance de cet agent pathogène à la pyrrolnitrine produit par un agent de lutte biologique et analogue structural des phénylpyrroles. Ces résultats suggèrent que l'utilisation en parallèle des méthodes de lutte chimique et biologique peut avoir un impact sur la durabilité d'un agent de lutte biologique.

III) Mécanismes impliqués dans la résistance aux agents de lutte biologique

Bien que peu d'études mentionnent l'existence de résistances à des agents de lutte biologique chez les agents pathogènes, les mécanismes de résistance à des composés toxiques synthétisés par des microorganismes ou par des plantes ont été assez largement étudiés. Ainsi dans la littérature scientifique, plusieurs mécanismes de résistance sont mentionnés. Ces mécanismes sont variés et correspondent aux différents modes d'action des agents de lutte biologique.

1) Résistance des agents pathogènes aux composés toxiques produits par des agents de lutte biologique

Les champignons possèderaient comme première ligne de défense contre des composés toxiques des transporteurs membranaires ABC (ATP-Binding Cassette) dont l'énergie provient de l'hydrolyse d'ATP, ou des transporteurs MSF (Major Facilitators Superfamily) qui utilisent pour leur fonctionnement le gradient électrochimique des membranes. Ces protéines membranaires peuvent transporter une grande variété de composés, naturels ou synthétiques et permettent d'excréter hors de la cellule divers métabolites toxiques (Van Baarlen *et al.*, 2007). La tolérance conférée par ces transporteurs est en général relativement faible mais non négligeable puisqu'elle donne à l'agent pathogène le temps nécessaire à l'activation des mécanismes de détoxification (Schouten *et al.*, 2008). Il semblerait que les transporteurs ABC soient davantage impliqués que les MSF dans la protection des champignons à l'égard des composés antifongiques (De Waard *et al.*, 2006).

Le phénomène de résistances multiples (MDR) qui pose des problèmes majeurs en médecine en nuisant à l'efficacité de certains traitements anti-cancer, a souvent été corrélé à l'activité de tels transporteurs membranaires à faible spécificité de substrat. Ce phénomène est émergent chez les champignons phytopathogènes soumis à de fortes pressions de sélection et entraîne le développement d'individus résistants à des composés très variés, par surexpression des transporteurs membranaires (Kretschmer *et al.*, 2009).

Schoonbeek *et al.* (2002) ont démontré le rôle de pompes à efflux dans la résistance de *B. cinerea* à des antibiotiques produits par *Pseudomonas*. Les résultats indiquent que plusieurs

antibiotiques du type phenazines (PCN) induisent l'expression du gène BcatrB qui code pour un transporteur ABC. Cette étude démontre pour la première fois le rôle d'un transporteur ABC dans les interactions microbiennes, en particulier pour protéger un agent pathogène contre un antibiotique produit par un agent de lutte biologique. La surexpression de transporteurs membranaires pourrait être l'un des mécanismes majeurs de résistance aux antagonistes agissant par antibiose. Burse *et al.* (2004) ont découvert un transporteur membranaire (NorM) qui confère à *Erwinia amylovora* une résistance à des toxines produites par les bactéries antagonistes *P. fluorescens* et *Panthoea agglomerans*, grâce à un efflux actif.

D'autres mécanismes de résistance à des agents de lutte biologique ont été mis en évidence. Certains mécanismes vont empêcher l'action des microorganismes, par la dégradation ou l'inhibition de la synthèse des composés qu'ils produisent et qui sont toxiques pour l'agent pathogène. Par exemple Levy *et al.* (1992), qui sont les premiers à étudier les mécanismes de résistance des agents pathogènes aux antibiotiques produits par la bactérie *Pseudomonas*, montrent qu'une dose létale de 1-hydroxyphenazine chez *Mycosphaerella graminicola* entraîne une augmentation des catalases, peroxidases, et superoxyde-dismutases et la synthèse accrue de mélanine, permettant une protection de l'agent pathogène ainsi que la dégradation de l'antibiotique. Crowe et Olsson (2001) ont montré que lorsque la bactérie *P. fluorescens* est utilisée comme agent de lutte biologique contre *Rhizoctonia solani*, la synthèse de laccases est induite en réponse aux métabolites bactériens. Ces laccases agissent sur les parois cellulaires du champignon en les rendant moins perméables aux composés toxiques et peuvent détoxifier les composés antifongiques émis par la bactérie. L'acide fusarique, toxine produite par des souches de *F. oxysporum*, inhibe la production de 2,4-DAPG chez *P. fluorescens* CHA0 utilisée comme agent de lutte biologique. Cet effet suppressif de l'acide fusarique peut affecter la performance des bactéries sensibles à ce composé pour lutter contre certains agents pathogènes, en particulier dans un environnement où des producteurs d'acide fusarique seraient présents (Notz *et al.*, 2002).

Un autre mécanisme vise à inhiber la synthèse des enzymes produites par l'agent de lutte biologique, qui peuvent attaquer les cellules de l'agent pathogène. Ainsi Lutz *et al.* (2003) ont constaté que la mycotoxine DON, produite par les espèces *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*, inhibe l'expression de gènes codant pour des chitinases chez l'agent de lutte biologique *Trichoderma atroviridae* P1.

Un agent pathogène peut également agir pour diminuer la production d'antibiotiques par un agent de lutte biologique en altérant l'environnement physique des microorganismes. Ainsi l'oxalate sécrété par *Sclerotinia sclerotiorum* acidifie le milieu, ce qui nuit notamment à l'activité de la bactérie antagoniste *P. fluorescens* en diminuant significativement sa production d'antibiotiques (Duffy *et al.*, 2003).

Stockwell *et al.* (1996) mentionnent un cas particulier de perte d'efficacité de la protection biologique. Ils montrent que le transfert du plasmide pAgK84 de l'agent de lutte biologique *Agrobacterium radiobacter* K84 vers l'agent pathogène *Agrobacterium tumefaciens* entraîne l'échec de la protection par l'agent de lutte biologique car l'agent pathogène *A. tumefaciens* devient résistant à l'antibiotique agrocin 84 produit par la bactérie antagoniste. En effet le plasmide transféré contient le gène contrôlant la production d'agrocin 84 et également le gène de résistance à cet antibiotique. L'établissement de larges populations d'*Agrobacterium* portant le plasmide pAgK84 pourrait menacer l'efficacité d'*A. radiobacter* K84 comme agent de lutte biologique. Pour minimiser le risque d'acquisition de ce plasmide par *A. tumefaciens*, un dérivé de K84 (K1026) qui produit de l'agrocin84 mais ne possède pas la région permettant le transfert du plasmide pAgK84 a été développé. L'utilisation judicieuse des agents de lutte biologique et notamment de cette nouvelle souche devrait diminuer le

risque de transfert de plasmide dans les souches pathogènes d'*Agrobacterium* et ainsi préserver l'efficacité d'*A. radiobacter* comme agent de lutte biologique.

2) Résistance des agents pathogènes aux agents de lutte biologique hyperparasites

La plupart des agents de lutte biologique agissant par parasitisme produisent des enzymes telles que des chitinases et des glucanases. La capacité de ces enzymes à lyser les cellules des agents pathogènes est moindre en cas de fort contenu cellulaire de l'agent pathogène en mélanine. En effet, la mélanine confère une protection contre ces enzymes microbiennes. Par exemple, la présence de mélanine chez *Aspergillus nidulans* inhibe l'activité *in vitro* des glucanases, chitinases et cellulases (Bell & Wheeler, 1986).

La formation de structures semblables aux chlamydospores et l'apparition de portions plus vacuolées de mycélium permettent au champignon pathogène du pois cajan, *Fusarium udum*, de continuer à croître lentement et de former des conidies en présence de la bactérie hyperparasite *Bacillus subtilis* AF1 et seraient donc des moyens mis en place par le champignon pour se protéger de l'effet de cette bactérie (Harish *et al.*, 1998).

3) Moindre sensibilité des agents pathogènes à la compétition nutritive

D'un point de vue écologique, il est avantageux pour les agents pathogènes de réduire la compétition avec des agents de lutte biologique potentiels. Certains agents pathogènes peuvent réduire significativement la taille de la population de l'agent de lutte biologique en exploitant plus rapidement les ressources du milieu et ainsi affecter l'efficacité de l'antagoniste.

Mazzola et Cook (1991) ont étudié l'effet de plusieurs champignons phytopathogènes racinaires sur la capacité de l'agent de lutte biologique *P. fluorescens* 2-79 et Q72a80 à persister dans la rhizosphère du blé. En effet, les agents pathogènes racinaires sont des colonisateurs efficaces de la rhizosphère de l'hôte et entrent en compétition avec d'autres microorganismes du milieu, telles que les bactéries introduites comme agents de lutte biologique. Il semblerait que la colonisation racinaire du blé par *P. fluorescens* puisse être favorisée par la disponibilité accrue en nutriments suintant des lésions causées par la présence des agents pathogènes *R. solani* et *G. graminis*. Cependant, la population de *P. fluorescens* diminue en présence d'espèces de *Pythium*. Contrairement à *R. solani* et *G. graminis*, les *Pythium* n'augmenteraient pas significativement la quantité d'exsudats disponibles et seraient plus efficaces que *P. fluorescens* dans l'utilisation des ressources disponibles. De plus, l'infection par *Pythium* entraîne une diminution du chevelu racinaire, ce qui réduit la surface racinaire disponible pour la colonisation bactérienne et limite donc la population d'antagonistes potentiels de cet agent pathogène. Fedi *et al.* (1997) ont montré que l'agent pathogène *P. ultimum* peut altérer l'expression des gènes de l'agent de lutte biologique *P. fluorescens* F113, entraînant une diminution de la taille de la population de cet agent de lutte biologique. Cette diminution de la taille de la population permet de limiter la compétition pour les nutriments issus des lésions causées par *P. ultimum* sur les racines de betteraves. Cinq clusters de gènes inhibés en présence de *P. ultimum* ont été identifiés chez *P. fluorescens*.

4) Résistance des agents pathogènes aux composés de défense produits par la plante

L'induction de résistance chez une plante implique la production ou l'activation de composés de défense suite à l'action d'un agent de lutte biologique. Certains agents pathogènes sont capables de dégrader ces composés de défense et ainsi peuvent être résistants face à l'action des agents de lutte biologique agissant par induction de défenses des plantes.

Botrytis cinerea serait ainsi capable de contourner l'alpha-tomatine, phytoanticipine constitutivement produite par la tomate (Osbourn, 1996) en détoxifiant ce composé. Une étude de Quidde *et al.* (1998) montre que sur treize isolats de *B. cinerea* testés, douze sont capables de dégrader l'alpha-tomatine par une activité xylase, qui empêche cette saponine de se complexer avec la membrane du champignon et supprime donc son activité fongitoxique. La capacité de *B. cinerea* à contourner la phytoalexine resveratrol, dont la production est induite chez la vigne, a également été démontrée par Sbaghi *et al.* (1996), qui établissent une corrélation entre la capacité de huit isolats de *B. cinerea* à détoxifier le resveratrol et leur pouvoir pathogène sur feuilles de vigne. Certains agents pathogènes tels que le champignon *Microcyclus ulei* sont tolérants au cyanure d'hydrogène (HCN), composé produit par la plante en réponse à des dégâts mécaniques et chimiques sur ses cellules ou à l'attaque de microorganismes. Cette tolérance peut être liée à un métabolisme respiratoire résistant au cyanure. Les champignons pourraient également détoxifier ce composé par transformation en formamide *via* des cyanure-hydratases (Osbourn, 1996). Denny *et al.* (1987) estiment que l'activité des transporteurs ABC peut expliquer la tolérance à la pisatine, une phytoalexine de *Pisum sativum*, chez *Nectria haematococca*, sur la base d'un efflux dépendant d'énergie. La pisatine induirait également un fort niveau de transcription du gène BcatrB (gène codant pour un transporteur ABC) chez des isolats sauvages de *B. cinerea*.

Des recherches récentes ont montré que les transporteurs ABC contribuent à la virulence des champignons phytopathogènes en réduisant l'effet toxique des phytoalexines (Del Sorbo *et al.*, 2000). Schoonbeek *et al.* (2001) ont montré chez *B. cinerea* que des mutants BcatrB sont plus sensibles au resveratrol. Il semblerait que le transporteur membranaire serve de 'première aide' pour conférer une protection immédiate contre la toxine, laissant ainsi le temps à l'activation des laccases qui vont dégrader cette molécule. Fleissner *et al.* (2002) ont montré que le transporteur Gpabc1 chez *Gibberella pulicaris* est indispensable pour la tolérance à la phytoalexine rhisitin et que cette tolérance est nécessaire à la virulence de *G. pulicaris* sur tubercules de pommes-de-terre.

Govrin et Levine (2000) ont montré que la réaction d'hypersensibilité induite par la présence de microorganismes tels que *P. syringae*, qui peuvent être utilisés comme agents de lutte biologique, faciliterait la colonisation de la plante par des agents pathogènes nécrotrophes comme *B. cinerea* ou *S. sclerotiorum*. Ces champignons pourraient donc exploiter un mécanisme de défense particulier de la plante et le contourner pour leur propre pouvoir pathogène.

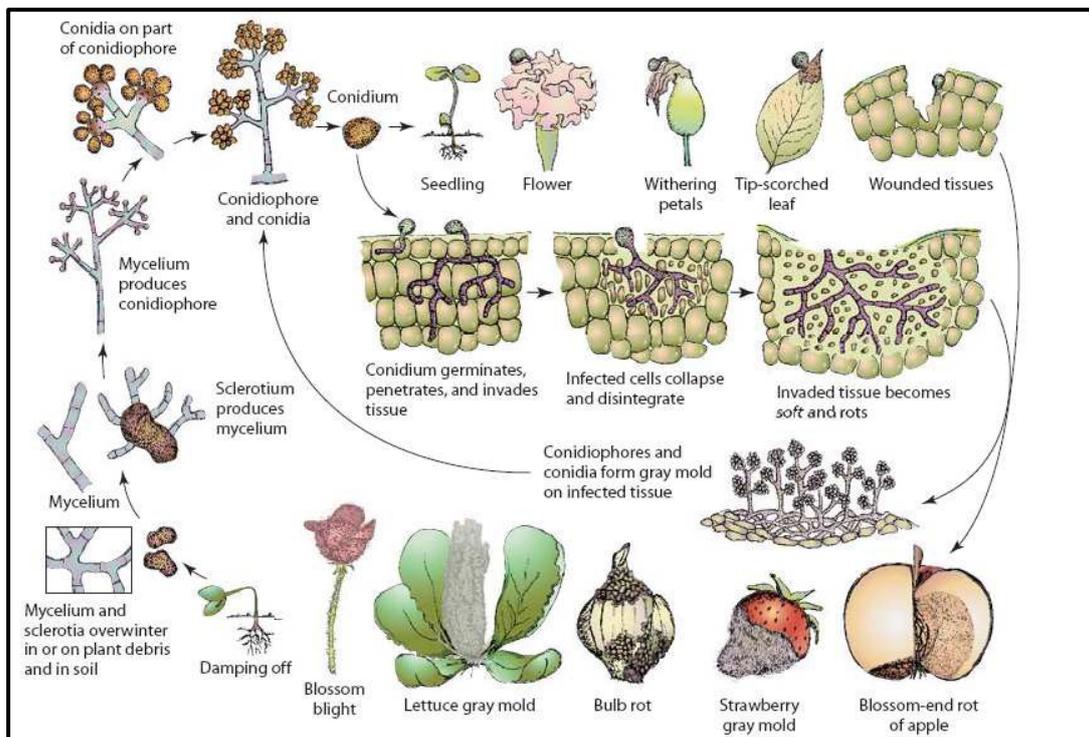


Figure 2 : Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (Source : Agrios, 2005).



Figure 3 : Dégâts causés par *B. cinerea* dans une serre de tomate et chancre développé sur tige de tomate suite à un effeuillage (Source : INRA, 2010).

Chapitre 3 : Modèle d'étude : protection biologique contre *Botrytis cinerea*

L'objectif général de ce travail est d'évaluer la durabilité de l'efficacité des agents de lutte biologique utilisés pour lutter contre les maladies des plantes. L'étude est focalisée sur le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise, responsable de lourdes pertes de rendement sur de nombreuses cultures d'importance économique et contre lequel les moyens de lutte actuels sont insuffisants pour garantir une protection totale des cultures.

I) Présentation de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise

Botrytis cinerea appartient à la classe des Deutéromycètes, à l'ordre des Moniliales et à la famille des Moniliaceae. Cette espèce possède une forme sexuée classée dans les Ascomycètes, connue sous le nom de *Botryotinia fuckeliana* (Farr *et al.*, 1989). Cette forme sexuée est rarement observée dans le milieu naturel mais peut être obtenue au laboratoire. C'est la forme asexuée, *B. cinerea*, qui est prédominante et associée à la pourriture grise.

Botrytis cinerea est un champignon parasite saprophyte qui se conserve l'hiver sur les débris végétaux sous forme de conidies, de mycélium ou de sclérotés (fig. 2). Lorsque les conditions climatiques deviennent favorables (humidité relative proche de 95% et température de 20 à 22°C), ces formes de conservation vont constituer l'inoculum primaire. Les conidies vont alors être disséminées par le vent, la pluie ou les insectes et les spores vont germer : l'infection va se propager (Holz *et al.*, 2004).

Le champignon dispose de plusieurs voies pour entrer dans le végétal : les ouvertures naturelles (hydatodes, stomates) ou les blessures au niveau des feuilles, les plaies d'effeuillage sur tige, les sépales des fleurs ou des fruits, qui servent de bases nutritives au champignon (Holz *et al.*, 2004). L'entrée par les plaies d'effeuillage reste la voie prépondérante, notamment sur cultures de tomates sous serres (Nicot & Baille, 1996). Une fois pénétré à l'intérieur des tissus végétaux, *B. cinerea* va lyser les parois végétales par l'intermédiaire d'enzymes pectinolytiques et induire la mort des cellules. Cette mort cellulaire entraîne l'apparition des différents symptômes de la maladie, que sont les lésions nécrotiques sur feuilles, le développement de chancre sur tige, l'avortement des fleurs ou la chute prématurée des jeunes fruits, la formation sur fruits de halos jaunâtres en « tâches fantômes » ou de pourriture molle. Le développement de chancre sur tiges peut entraîner la mort de la plante, ce qui engendre d'importantes pertes de rendement (fig. 3).

Le développement de *B. cinerea* est dépendant des conditions environnementales. De façon générale, les fortes humidités relatives, la présence d'eau à la surface des feuilles et des températures modérées sont les principaux facteurs reconnus comme favorisant le développement de la pourriture grise (Blakeman, 1980). Outre ces conditions climatiques, le développement de *B. cinerea* dépend notamment de la disponibilité en nutriments dans le milieu et de la qualité de la lumière pour la sporulation (Jarvis, 1992).

II) Gamme d'hôtes de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea possède une large gamme d'hôtes et peut infecter plus de 230 espèces végétales dont la majorité serait des dicotylédones (Farr *et al.*, 1989). Parmi ces espèces, certaines comme les cultures maraîchères, horticoles et viticoles ont une importance économique. Ce champignon est donc responsable de lourdes pertes économiques puisqu'il peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte et donc dans certains cas de la récolte. Par exemple, les risques d'attaque sont permanents pour les cultures sous abris telles que tomate, poivron, laitue, fraise (Jarvis, 1992). La pourriture grise est d'ailleurs l'une des maladies causant le plus de dommages en production de tomates sous serres (Jarvis, 1992).

Tableau 2 : Produits homologués dans le monde pour le contrôle de *B. cinerea* dans le cadre de la protection biologique (Source : Ajouz, 2009).

Produit	Antagoniste	Utilisation
Trichodex	<i>Trichoderma harzianum</i>	Vigne et cultures sous serres
Binab	<i>Trichoderma harzianum</i> et <i>Trichoderma polysporum</i>	Cultures de fraises
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	En serre sur concombre, tomate, poivron, laitue, plantes ornementales
Plantshield	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cultures sous serre
Botry-Zen	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Vigne
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	Fruits après récolte
Yield Plus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Fruits après récolte
Bio-Save	<i>Pseudomonas syringae</i>	Fruits après récolte
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i>	Cultures sous serre et plein champ

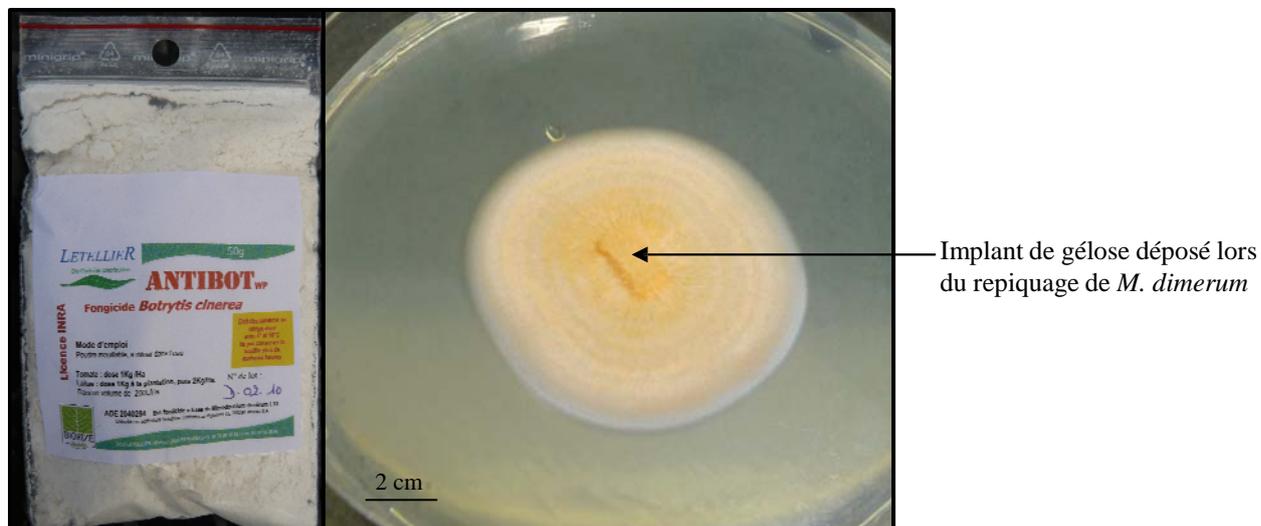


Figure 4 : Culture de *Microdochium dimerum* souche L13 sur milieu LPGa en boîte de Pétri (stade de développement 15 jours après repiquage par dépôt d'un implant mycélien) et présentation du futur produit commercial AntiBot (Source : INRA, 2011).

Cependant la question de la spécificité d'hôte demeure car on ignore si les souches de *B. cinerea* attaquent de la même manière tous les hôtes. On peut se demander si la virulence d'une souche, c'est-à-dire sa capacité à parasiter un grand nombre d'espèces végétales, est proportionnelle à son agressivité ; en particulier les niveaux d'agressivité d'une souche sont-ils identiques sur des hôtes différents ? Des études de génétique des populations ont montré qu'il existe une différenciation génétique entre les souches de *B. cinerea* prélevées sur des hôtes différents (Decognet *et al.*, 2007; Fournier & Giraud, 2008). Cela suggère que des souches de *B. cinerea* auraient une préférence pour certains hôtes, mais à notre connaissance aucune étude n'a été réalisée pour identifier la gamme d'hôte précise d'une souche donnée de ce champignon.

III) Méthodes de lutte contre *Botrytis cinerea*

Aucune variété commerciale de plante résistante n'existe à ce jour pour lutter contre *B. cinerea*. La lutte repose principalement sur l'utilisation de traitements chimiques mais également sur des stratégies de lutte culturale dont les principales sous abris sont la lutte climatique (contrôle de l'humidité et de la température pour éviter la formation de film d'eau à la surface des plantes, défavoriser *B. cinerea* en gardant une température constante relativement élevée de 20°C) et la prophylaxie (toutes les mesures permettant de réduire la source d'inoculum : retirer les plantes malades, réduire la densité des cultures etc...). Aujourd'hui aucune de ces méthodes ne permet de garantir une protection totale des cultures contre cet agent pathogène.

De nombreux travaux sont menés pour développer des méthodes de lutte biologique efficaces. Un nombre élevé d'agents de protection biologique contre *B. cinerea* a été identifié au laboratoire au cours des dernières années et actuellement neuf produits de protection biologique sont commercialisés dans le monde pour lutter contre cet agent pathogène (tab. 2). En France, seul le produit Serenade® dont la substance active est la souche QST 713 de *Bacillus subtilis* est homologué depuis août 2010 comme stimulateur de défenses des plantes sur diverses cultures dont la tomate (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

Cette bactérie, isolée du sol, appartient à la famille des Bacillaceae, parmi le groupe des Eubactéries Gram+. Son mode d'action est peu connu. Elle aurait des fonctions bactéricides et fongicides et agirait par compétition nutritive et spatiale par colonisation du milieu, par sécrétion de lipopeptides ayant une action antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes et induirait des résistances systémiques chez la plante, se traduisant par une synthèse accrue de peroxidases (Paulitz & Bélanger, 2001 ; Levasseur *et al.*, 2005). Le risque d'apparition de résistance à cette bactérie est actuellement considéré comme relativement faible. En effet l'intervention de différents modes d'action, qui impliquent plusieurs sites d'action cibles, rendrait plus difficile le contournement de cet agent de lutte par des agents pathogènes.

Un autre agent de lutte biologique, le champignon *Microdochium dimerum*, est en cours d'homologation sous la spécialité commerciale AntiBot (Agrauxine, fig. 4) qui dispose actuellement d'une Autorisation de Distribution pour Expérimentation (ADE) et serait le deuxième bio-fongicide homologué sur le marché français pour lutter contre *B. cinerea* sur cultures de tomate, après Serenade®. La souche L13 de *Microdochium dimerum* a été isolée de la microflore naturelle de plaies d'effeuillage saines de plants de tomate issus d'une serre du Vaucluse infestée par *B. cinerea* (Nicot *et al.*, 1996). Ce champignon appartient à la classe des Deutéromycètes, à l'ordre des Moniliales et à la famille des Tuberculariaceae. Il présente un mycélium ras de couleur orange (fig. 4).

L'efficacité de *M. dimerum* pour protéger les plaies d'effeuillage contre les attaques de *B. cinerea* a été mise en évidence au cours d'essais réalisés depuis 1995 à l'INRA d'Avignon puis en conditions proches de situations commerciales au CTIFL de Balandran (30).

Les résultats montrent un effet de la dose appliquée sur l'efficacité de la protection des plaies d'effeuillage, avec une efficacité moindre de l'agent de lutte biologique lorsque sa concentration diminue (Decognet *et al.*, 1997). De plus, les effets du microclimat sur l'efficacité de l'agent de lutte biologique seraient influencés par la dose appliquée sur la plante. Lorsque la dose de *M. dimerum* appliquée est de dix fois supérieure à celle de *B. cinerea*, la protection des plaies d'effeuillage sur plants de tomate est fortement améliorée et la température n'influe plus sur l'efficacité de l'agent de lutte biologique (Nicot *et al.*, 2002).

Le mode d'action de cet agent de protection est peu connu mais les travaux menés par l'équipe de mycologie de l'INRA d'Avignon n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse d'hyperparasitisme vis-à-vis de *B. cinerea* et aucune toxine n'a pu être mise en évidence *in vitro*. L'hypothèse actuellement privilégiée concernant l'activité de ce champignon contre *B. cinerea* est celle de la compétition nutritive. *Botrytis cinerea* a besoin d'une source exogène de nutriments (tels que du glucose ou fructose) pour se développer et en particulier pour la germination de ses spores (Blakeman, 1975). Cette dépendance nutritive laisse penser que les microorganismes qui utilisent efficacement les nutriments et sont donc de bons compétiteurs pourraient être des agents de lutte biologique efficaces contre cet agent pathogène (Elad & Stewart, 2004). *Microdochium dimerum* semble capable de métaboliser plus rapidement les composés nécessaires à la germination des spores de *B. cinerea*, présents par exemple au niveau des plaies d'effeuillage des plants de tomate, et ainsi d'inhiber ou de ralentir la germination des spores de l'agent pathogène (Ladvie, 2003).

L'alcalinisation du milieu, qui est une conséquence du métabolisme de *M. dimerum*, pourrait également avoir un effet sur le pouvoir pathogène de *B. cinerea* et donc assurer une meilleure protection des plaies d'effeuillage (Ladvie, 2003). En effet l'activité des enzymes du pouvoir pathogène de *B. cinerea*, telles que les endopolygalacturonases impliquées dans la dégradation des composés pectiques des parois cellulaires, est d'autant plus faible que le pH tend à être basique (Prins, 2001). Une augmentation du pH en présence de *M. dimerum* pourrait donc gêner la progression de *B. cinerea* dans les tissus de la plante hôte.

IV) Diversité et capacité d'adaptation de *Botrytis cinerea*

Les populations de *B. cinerea* présentent une importante diversité phénotypique et génétique.

Les niveaux de sensibilité aux fongicides et d'agressivité sur plantes sont par exemple deux caractéristiques phénotypiques très étudiées. *Botrytis cinerea* est considéré comme un agent pathogène à haut risque en termes de résistance aux fongicides (Leroux, 2004). Des études rapportent le développement de souches résistantes par exemple au cyprodinil (anilinopyrimidine), aux dicarboximides et aux benzimidazoles. Le niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea* est également très variable sur une plante hôte donnée ; ainsi une différence d'agressivité d'isolats a été mise en évidence sur haricot vert (Tiedemann, 1997), sur tomate (Decognet *et al.*, 2009) et sur vigne (Martinez *et al.*, 2003).

Diverses études ont également mis en évidence une forte diversité génétique (Beever & Weeds, 2004). Par exemple, sur 184 isolats de *B. cinerea* échantillonnés sur vigne et sur ronces dans six régions de France, 180 génotypes ont pu être différenciés à l'aide de marqueurs microsatellites (Fournier & Giraud, 2008). Cette grande diversité pourrait s'expliquer par la nature multi-nucléée et hétérocaryotique du champignon, la présence de transposons dans son génome, l'existence de particules 'virus-like' et le recours possible à la reproduction sexuée (Beever & Weeds, 2004).

D'après McDonald et Linde (2002), le fait d'avoir un grand nombre d'individus différents dans la population serait un facteur clé d'érosion de l'efficacité des méthodes de lutte.

De plus, plusieurs essais au laboratoire ont montré que ce champignon peut évoluer rapidement sous une pression de sélection. Nicot *et al.* (2001) ont montré qu'une souche de *B. cinerea* cultivée *in vitro* sous film UV-sélectif (filtrant les UV proches, ce qui inhibe la sporulation du champignon) pendant plusieurs générations s'adapte progressivement aux conditions d'incubation, avec une production de spores multipliée par cent après cinq à six générations de cette souche. Un autre exemple est celui de l'adaptation *in vitro* de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine au cours de générations successives sous pression de sélection (Ajouz *et al.*, 2010).

Objectifs spécifiques de l'étude

L'étude réalisée au cours de ce stage s'inscrit dans le cadre du projet européen PURE (Pesticide Use-and-risk Reduction in European farming systems with Integrated Pest Management) dont l'un des objectifs est d'évaluer la durabilité de la protection biologique contre les maladies des plantes. Le modèle d'étude actuel est *Botrytis cinerea*. L'étude menée jusqu'à présent sur la capacité d'adaptation de ce champignon à un antibiotique produit par certains antagonistes bactériens est élargie à des agents de protection biologique agissant par d'autres modes d'action que l'antibiose. L'objectif finalisé à plus long terme est de pouvoir orienter les efforts de sélection d'agents de protection biologique vers ceux présentant des modes d'actions les moins sujets à contournement par l'agent pathogène.

Aucune étude ne fait état de résistance en pratique aux agents agissant par compétition nutritive ou par induction des mécanismes de défense des plantes. Or ces modes d'action sont souvent cités dans la littérature comme des modes d'action principaux des agents de lutte biologique, particulièrement contre *B. cinerea*. Le but de cette étude est donc d'évaluer le niveau de sensibilité de *B. cinerea* à des agents de lutte biologique agissant selon ces modes d'action, *Microdochium dimerum* et *Bacillus subtilis*.

Une des hypothèses de départ que nous testons est que des souches très agressives seraient moins sensibles à un agent de lutte biologique agissant par compétition nutritive que des souches d'agressivité moindre. En effet, on peut supposer que ces souches très agressives seraient capables de métaboliser plus rapidement les nutriments du milieu et donc de se développer plus rapidement sur leur hôte. De même, des souches très agressives seraient-elles davantage capable de contourner les défenses de la plante, éventuellement induites par un agent de lutte biologique ?

Les questions inhérentes à cette étude sont :

L'agressivité des souches de *B. cinerea* influe-t-elle sur leur sensibilité à ces agents de lutte biologique ?

Existe-t-il dans les populations naturelles de *B. cinerea* des isolats moins sensibles à ces agents de lutte biologique ?

Afin de répondre à ces questions, 41 souches de *B. cinerea* ont été caractérisées pour leur niveau d'agressivité sur plantes de tomate. Différentes composantes de leur agressivité (temps de latence, vitesse de progression dans la tige, niveau d'infection de la plante hôte et de sporulation sur tige) ont été évaluées. Le niveau d'agressivité sur tiges de tomate a été comparé à celui obtenu sur feuilles de tomate et de laitue pour 20 souches, et sur sept autres espèces végétales pour 10 souches.

Le niveau de sensibilité des souches à *M. dimerum* et à *B. subtilis* (respectivement 41 et 20 souches) a ensuite été évalué afin d'établir une ligne de base de sensibilité (« baseline ») à ces agents de lutte biologique et de comparer le niveau de sensibilité de *B. cinerea* aux deux agents de lutte biologique ayant recours à des modes d'action différents.

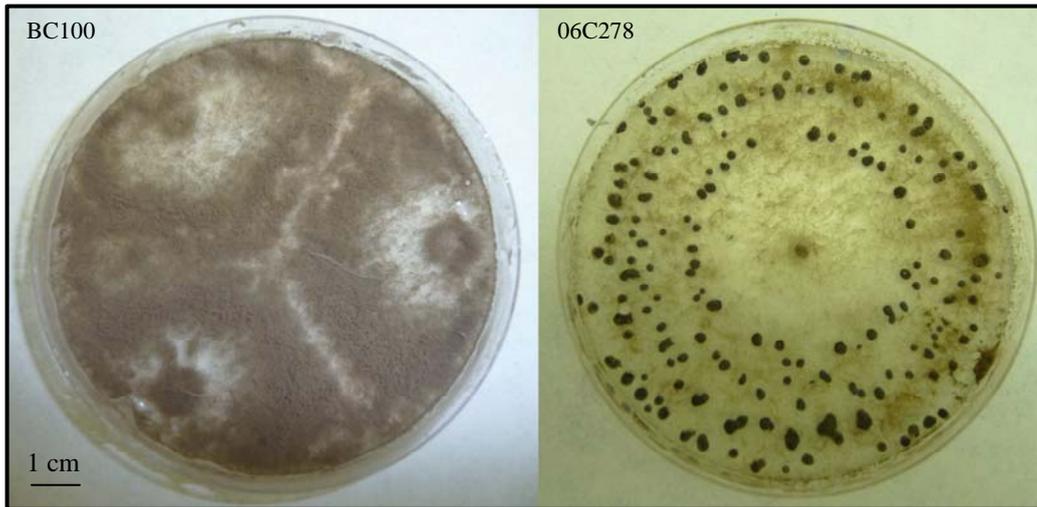


Figure 5 : Sporulation des souches BC100 et 06C278 de *Botrytis cinerea* sur milieu PDA (Source : INRA, 2011).

Matériel et méthodes

I) Matériel fongique et bactérien

1) Collection de souches de *Botrytis cinerea*

Les 41 souches de l'agent pathogène *B. cinerea* utilisées dans cette étude ont été échantillonnées entre 1987 et 2010 sur différentes plantes hôtes (dont tomate et vigne principalement) et dans des écosystèmes en dehors du contexte agricole (précipitations et neige ; annexe II). Ces souches ont été monosporees et sont conservées à -20°C sous forme de suspensions de spores concentrées ($>10^7$ spores/ml) dans un tampon phosphate mono-potassique contenant 20% de glycérol.

2) Production d'inoculum de *Botrytis cinerea*

Production d'implants mycéliens

Les implants mycéliens sont obtenus par repiquage de *B. cinerea* sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, 39 g/l, Difco) à raison de 5 µl de suspension issue de la collection de souches déposés au centre d'une boîte de Pétri. Après trois jours d'incubation en enceinte climatisée (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse $114 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) des implants mycéliens calibrés (2 mm de diamètre) sont prélevés en bordure de colonie pour inoculer des feuilles détachées ou des disques foliaires.

Production de suspensions de spores

Le repiquage des souches de la collection s'effectue par répartition de 5 µl de suspensions de spores concentrées ($>10^7$ spores/ml) en trois dépôts sur une boîte de Pétri. Après incubation des boîtes en enceinte climatisée pendant 14 jours (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse $114 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), les spores produites (fig. 5) sont récupérées par ajout de 4 ml d'eau distillée par boîte de Pétri. Les boîtes sont ensuite raclées avec une spatule de Drigalski afin de décrocher les spores. Chaque solution obtenue est transférée dans un flacon contenant des billes de verre (3 mm de diamètre), vortexée 10 secondes puis filtrée à l'aide d'une unité de filtration munie d'un filtre millipore de 30 µm afin de ne récupérer que les spores et d'éliminer les fragments mycéliens et les conidiophores. Les filtrats de *B. cinerea* sont ajustés à la concentration désirée après comptage sur cellule de Malassez sous microscope (x100).

Afin de vérifier la viabilité des spores récupérées, 100 µl d'une suspension de spores dosée à 10^5 spores/ml sont étalés à l'aide d'une spatule de Drigalski sur un milieu de culture PDA dans une boîte de Pétri. Le pourcentage de germination est estimé sur 100 spores sous un microscope (x100), 24 h après étalement sur le milieu gélosé.

3) Agents de lutte biologique étudiés

La souche L13 de *Microdochium dimerum* a été isolée en 1992 sur des plaies d'effeuillage saines de plants de tomate d'une serre infestée par *B. cinerea* dans le Vaucluse (Nicot *et al.*, 1996). Elle est conservée sous forme de mycélium sur rondelles de gélose LPGA (Levure 7 g/l, Difco ; Peptone 7 g/l, Difco ; Glucose D+ 7 g/l, Prolabo ; Agar 15 g/l, Difco) dans de l'azote liquide à -196°C. Une fois sortie de l'azote, la souche est repiquée de façon hebdomadaire par dépôt d'un implant mycélien sur boîte de Pétri contenant du milieu LPGA.

L'inoculum de *M. dimerum* provient de la culture de la souche L13 sur milieu LPGA, incubée en enceinte climatisée (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse $114 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant quinze jours. Les spores sont ensuite récupérées de la même manière que pour les souches de *B. cinerea* mais sans filtration de la suspension. L'inoculum est ajusté aux concentrations voulues après comptage sur cellule de Malassez sous microscope (x100).

Tableau 3 : Caractéristiques des espèces végétales utilisées pour estimer l'agressivité des souches de *B. cinerea* en absence et présence des agents de lutte biologique *M. dimerum* et Serenade® Max, et types de mesures effectuées.

Espèce végétale	Cultivar	Obtenteur	Age des plantes utilisées	Organes testés	Mesure de l'agressivité
Tomate	Monalbo	PV	7-10 semaines	Plantes entières	Lésions sur tige -7 AUDPC à 7 jours
				Tronçons de tige	
	Raissa	Syngenta	7-10 semaines	Disques foliaires	Surface lésée à 48 h
Laitue	Mantilia	PV	5 semaines	Feuilles entières	Surface lésée à 72 h
				Disques foliaires	Surface lésée à 48 h
Tabac	Benthamiana	PV	5-7 semaines	Disques foliaires	Surface lésée à 48 h
Pomme-de-terre	King Edward	Baumaux	12 semaines	Disques foliaires	Surface lésée à 48 h
Basilic	Latino	Gauthier	5-7 semaines	Feuilles entières	Surface lésée à 48 h
Fraise	Gariguette	Marionnet	15 semaines	Disques foliaires	Surface lésée à 72 h
			2 stades de maturité	Fruits	Lésions sur fruits -7 AUDPC à 5 jours
Pomme	Golden delicious	-	-	Fruits	Lésions sur fruits -7 AUDPC à 7 jours
Cerisier	Hedelfingen	-	-	Pétales	Surface lésée à 48 h
Pêcher	S8533, pêcher jaune à floraison tardive	R. Monteux-Caillet	-	Pétales	Surface lésée à 24 h

PV : Pathologie végétale (INRA Avignon).

Comme dans le cas de *B. cinerea*, la viabilité des spores de *M. dimerum* est vérifiée en réalisant un test de germination sur milieu LPGA à 24 h.

La souche QST 713 de *Bacillus subtilis* est utilisée sous forme du produit formulé Serenade® Max (AgraQuest) distribué par Intrachem (Italie). Des solutions à 0,2% (masse/Volume) et à 0,8% (m/V) sont préparées à partir du produit formulé Serenade® Max, utilisé sous forme de poudre hydrosoluble contenant 100 g/kg (soit 5.10^9 cfu/g) de l'agent de lutte biologique. Les doses utilisées correspondent aux doses homologuées sur tomate et laitue en France (2 kg/ha) et en Italie (4 kg/ha) pour des volumes pulvérisés compris entre 500 l/ha et 1000 l/ha (gamme de volumes classiquement utilisée en serre).

II) Matériel végétal

Les graines des espèces végétales utilisées dans cette étude (tab. 3) sont semées dans du terreau (Klasmann, spécial semis 0,80) en serre de production puis repiquées au bout d'une semaine dans un autre terreau (Klasmann, TS3-404) en pots individuels (9x9x8 cm) et transférées en serre de culture. Les tubercules de pommes-de-terre et les micro-plants de fraisiers sont plantés dans du terreau (Klasmann, TS3-404), dans des pots respectivement de 17 cm de diamètre et de 11x11x12 cm. En serre de culture, toutes les plantes sont fertilisées avec une solution nutritive N, P, K (équilibre 1-1,6-0,66) et l'arrosage est manuel, soumis à l'appréciation de l'opérateur, en général une fois par jour et deux fois par jour en période très chaude.

Les pommes utilisées sont achetées dans le commerce. Les fraises sont produites à l'unité de pathologie végétale (INRA Avignon). Les cerisiers et pêchers proviennent de vergers non traités, respectivement de Venasque (84) et Montfavet (84).

III) Mesure de la croissance mycélienne et de la sporulation des souches de *B. cinerea* *in vitro*

La mesure de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* est réalisée à partir de 10 µl d'une suspension de spores dosée à 10^5 spores/ml déposés au centre de boîtes de Pétri avec milieu PDA (trois boîtes sont utilisées par souche), incubées en enceinte climatisée (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse $114 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La taille du développement mycélien de chaque souche est mesurée au 3^{ème} et 4^{ème} jour après dépôt de la suspension de spores sur milieu PDA (mesure du diamètre en mm, entre deux points de la boîte définis au préalable), puis une vitesse moyenne de croissance mycélienne entre le 3^{ème} et 4^{ème} jour est calculée (en mm/jour) pour chacune des souches de *B. cinerea*.

Pour mesurer *in vitro* la sporulation des souches de *B. cinerea*, ces dernières sont repiquées sur boîtes de Pétri avec milieu PDA. Cinq microlitres de suspensions de spores issues de la collection de souches sont répartis en trois dépôts par boîte de Pétri. Après quinze jours d'incubation en enceinte climatisée (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse $114 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) les spores sont récupérées par ajout dans chaque boîte de 4 ml d'eau distillée stérile. Les boîtes sont raclées avec une spatule de Drigalski, la solution obtenue est vortexée en présence de billes de verre puis filtrée (comme pour la préparation des suspensions de spores) et le nombre de spores produit est compté sur cellule de Malassez sous microscope (x100).

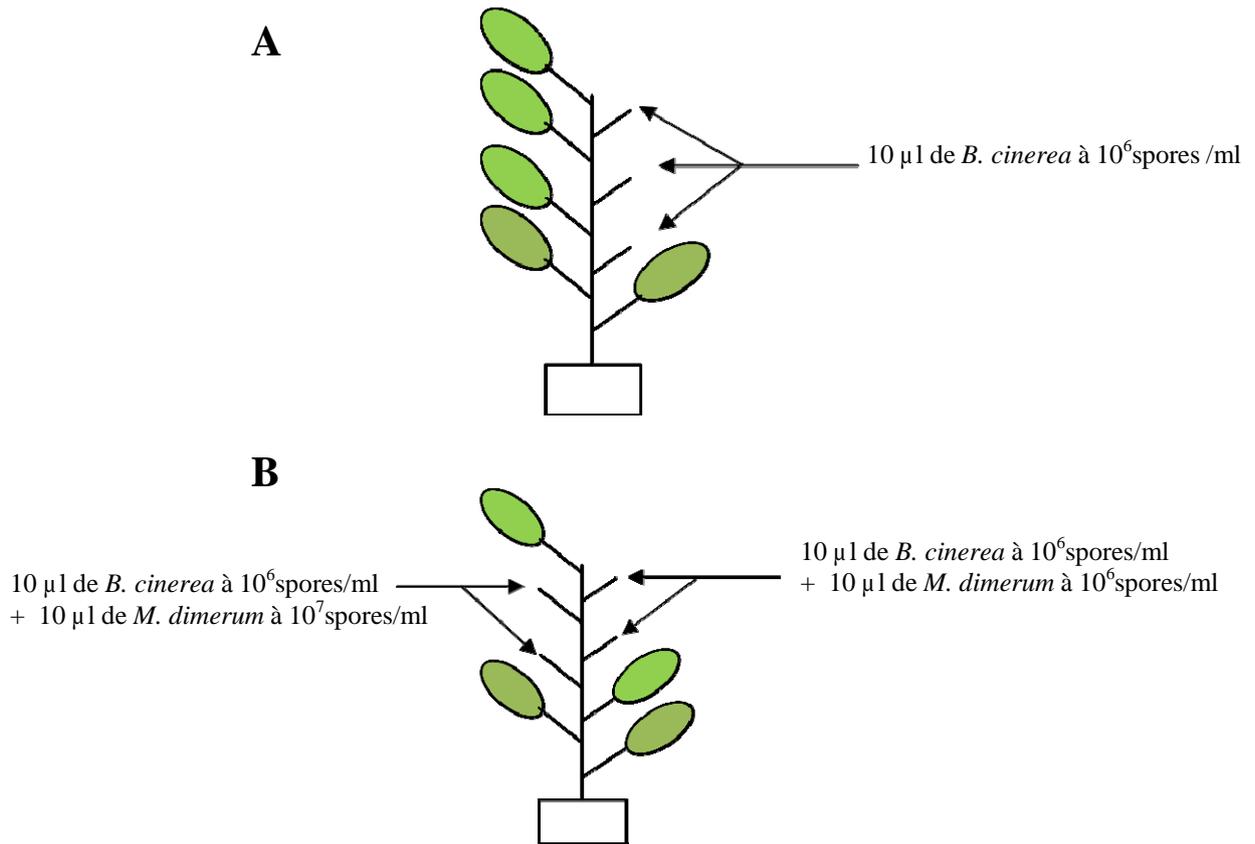


Figure 6 : Schémas d'inoculation de *B. cinerea* et de *M. dimerum* sur plants de tomate pour évaluer l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de l'agent de lutte biologique.



Figure 7 : Mesure quotidienne de la taille (en mm) des chancres développés sur tiges de plants de tomate suite à l'inoculation de *B. cinerea* sur plaie d'effeuillage (Source : INRA, 2011).

IV) Agressivité de *B. cinerea* et efficacité de *M. dimerum* sur plantes entières de tomate

Pour évaluer l'agressivité des 41 souches de *B. cinerea* et l'efficacité de *M. dimerum*, cinq séries de tests sont réalisées, au cours desquelles 5 ou 10 souches de *B. cinerea* sont simultanément testées (annexe II).

Des effeuillages sont réalisés aux ciseaux sur plants de tomate 'Monalbo', au dessus de la 3^{ème} feuille, laissant des pétioles d'environ 1 cm sur la tige. Ces pétioles sont inoculés avec 10 µl d'une suspension de spores de *B. cinerea* dosée à 10⁶ spores/ml (fig. 6A). Trois plantes sont utilisées par souche testée de *B. cinerea*, avec inoculation de trois pétioles par plante. Les plantes sont ensuite randomisées et incubées en chambre climatique (20°C, humidité saturante, photopériode de 16 h, intensité lumineuse 162 µmol.m⁻².s⁻¹) pendant toute la durée du test. Deux à trois répétitions indépendantes des tests sont réalisées pour chacune des souches.

Environ cinq minutes après l'application de *B. cinerea*, selon la même procédure que pour le test d'agressivité précédemment cité, 10 µl d'une suspension de spores de *M. dimerum* sont déposés sur la plaie. Par plante, quatre pétioles sont inoculés avec *M. dimerum* en alternant les deux doses de 10⁶ et 10⁷ spores/ml (fig. 6B). Trois plantes par souches sont ainsi traitées. La totalité des plantes sont randomisées et incubées en chambre climatique (20°C, humidité saturante, photopériode de 16 h, 162 µmol.m⁻².s⁻¹). Deux à trois répétitions indépendantes des tests sont réalisées pour chacune des souches.

La taille quotidienne des chancres développés sur tiges est mesurée en millimètres du 3^{ème} au 7^{ème} jour après l'inoculation (fig. 7).

A l'issue de ces différents tests, les valeurs de l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve) sont calculées pour chacune des lésions au 7^{ème} jour après inoculation. Cinq observations sont donc effectuées, avec un intervalle de temps journalier et identique entre chacune des observations. Le calcul de l'AUDPC à 7 jours est donc le suivant :

$$AUDPC = Y_3/2 + Y_4 + Y_5 + Y_6 + Y_7/2$$

Où Y_j est la taille de la lésion lors de la $j^{ème}$ observation.

Pour chaque répétition du test un indice d'attaque (Ia) est calculé par souche à partir des moyennes des valeurs d'AUDPC pour cette souche, de la façon suivante:

$$Ia = (AUDPC_{BC} / AUDPC_{BCI}) * 100$$

Où $AUDPC_{BC}$ est la valeur moyenne d'AUDPC de la souche testée et $AUDPC_{BCI}$ la valeur moyenne d'AUDPC de BCI qui est la souche de référence.

Le taux de protection conféré par L13 (P_{L13}) est également déterminé pour chaque souche et chaque répétition de test à partir des valeurs moyennes d'AUDPC par souche :

$$P_{L13} = [(AUDPC_{BCseul} - AUDPC_{BC+L13}) / AUDPC_{BCseul}] * 100$$

Où $AUDPC_{BCseul}$ est la valeur moyenne d'AUDPC pour la modalité témoin sans *M. dimerum* de la souche testée et $AUDPC_{BC+L13}$ est la valeur moyenne d'AUDPC pour la modalité en présence de *M. dimerum*.

La vitesse de développement de chaque chancre est déterminée, comme le taux d'accroissement journalier de la taille du chancre calculé entre l'apparition du chancre sur la tige et jusqu'à sept jours après l'inoculation.

Le temps de latence est également estimé pour chaque plaie inoculée. Il correspond à la durée nécessaire avant l'apparition d'un chancre sur la tige ; il n'est donc déterminé qu'en cas

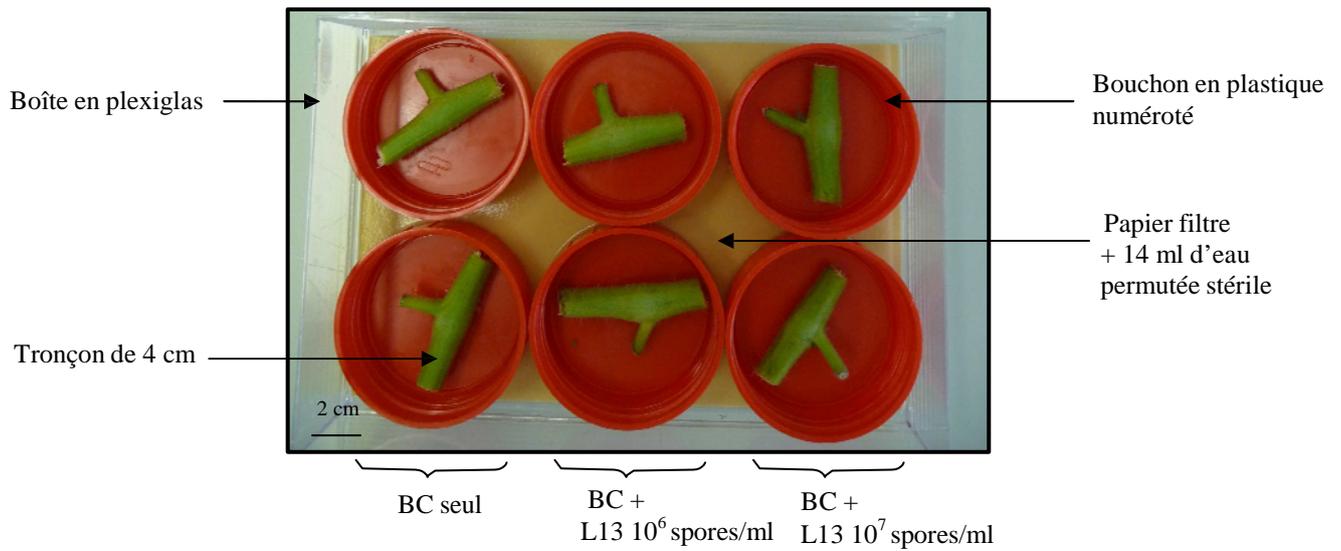


Figure 8 : Disposition des tronçons de tige de tomate dans une boîte en plexiglas pour le test d'agressivité de *B. cinerea* et d'efficacité de *M. dimerum in vitro* (Source : INRA, 2011).

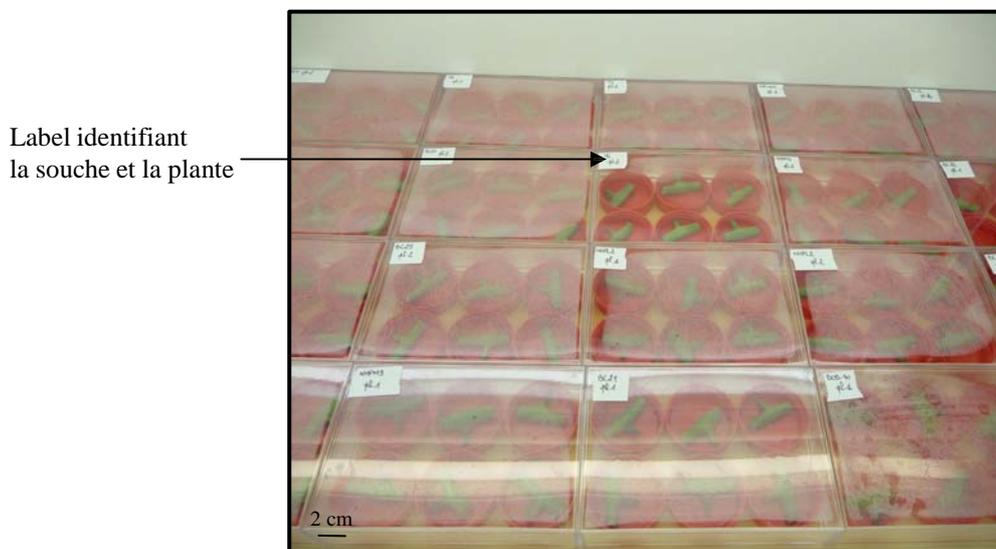


Figure 9 : Incubation des tronçons de tige de tomate en enceinte climatisée pour le test d'agressivité de *B. cinerea* et d'efficacité de *M. dimerum in vitro* (Source : INRA, 2011).

d'attaque de la tige. Dans le cas où la tige n'est pas attaquée, un temps de latence de huit jours a été attribué afin de pouvoir réaliser les tests statistiques.

Afin de voir si les 41 souches de *B. cinerea* étudiées appartiennent ou non à la même gamme d'agressivité et si elles sont identiquement contrôlées par *M. dimerum*, l'effet souche est testé sur le niveau d'infection (estimé par les indices d'attaque) en utilisant le module ANOVA du logiciel STATISTICA. L'effet souche sur les taux de protection conférés par l'agent de lutte biologique à 10^6 spores/ml est également testé avec ce module ANOVA. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis du logiciel STATISTICA est utilisé pour étudier l'effet du traitement par *M. dimerum* sur la latence et la vitesse de développement des lésions. La comparaison deux à deux des traitements est réalisée grâce au test de Kolmogorov-Smirnov de ce même logiciel. A l'aide du test de corrélation par rang de Spearman, les relations entre les différents paramètres de l'agressivité des souches de *B. cinerea* sont étudiées, ainsi que le lien entre l'agressivité de ces souches et les croissances mycéliennes (tailles des colonies à 4 jours) et entre l'agressivité des souches et les taux de protection conférés par *M. dimerum*. La relation entre les vitesses de développement mycélien sur plantes entières et sur milieu PDA est également étudiée.

V) Agressivité de *B. cinerea* et efficacité de *M. dimerum* sur tronçons de tiges de tomate

Afin de miniaturiser les tests d'agressivité de *B. cinerea* et d'efficacité de *M. dimerum*, classiquement réalisés sur plantes entières, des tests sur tronçons de tige sont effectués. Les tronçons sont issus de plantes provenant du même lot que celles du test sur plantes entières. La même procédure d'inoculation que pour le test sur plantes entières est suivie, pour l'application de *B. cinerea* seul ou de *B. cinerea* avec *M. dimerum*.

Après l'inoculation des plantes et leur incubation pendant environ 2 h en chambre climatique, des tronçons de 4 cm sont découpés, comprenant chacun un pétiole inoculé. Après découpage et pesée, chaque tronçon est déposé dans un bouchon plastique désinfecté (55 mm de diamètre) puis disposé dans une boîte plexiglas transparente (125x185 mm) au fond de laquelle est placé un papier filtre imbibé de 14 ml d'eau stérile. Six tronçons sont ainsi disposés par boîte (fig. 8) et deux boîtes sont réalisées par souche, soit quatre tronçons de chaque modalité par souche pour chaque répétition du test. Les boîtes sont fermées afin de limiter les contaminations extérieures et conférer des conditions d'humidité favorables au développement de la maladie (humidité saturante, fig. 9) et elles sont incubées en chambre climatisée pendant toute la durée du test (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse $114 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A chaque série de tests réalisée, cinq ou dix souches de *B. cinerea* sont testées. Deux ou trois répétitions indépendantes des tests sont réalisées pour chacune des souches.

La taille quotidienne des chancre sur la tige est mesurée en millimètres du 3^{ème} au 7^{ème} jour après inoculation, permettant le calcul de l'AUDPC à 7 jours. L'indice d'agressivité de chaque souche est déterminé, par rapport à la souche BC1, ainsi que le taux de protection conféré par *M. dimerum*, selon les formules précédemment exposées.

Afin d'obtenir des données quantitatives de sporulation pour chaque souche de *B. cinerea* sur organe végétal, chaque bouchon contenant un tronçon est vissé sur un flacon contenant 5 ml de solution d'eau (80%), d'éthanol (20%) et de l'agent mouillant tween 80 (300 μl pour 1 l de solution), au 10^{ème} jour après inoculation. Les flacons sont ensuite vortexés pendant 20 s puis conservés à 4°C avant le comptage des spores sur cellule de Malassez sous microscope (x100). Le nombre de spores produit par gramme de tissu frais peut alors être déterminé pour chacun des tronçons.

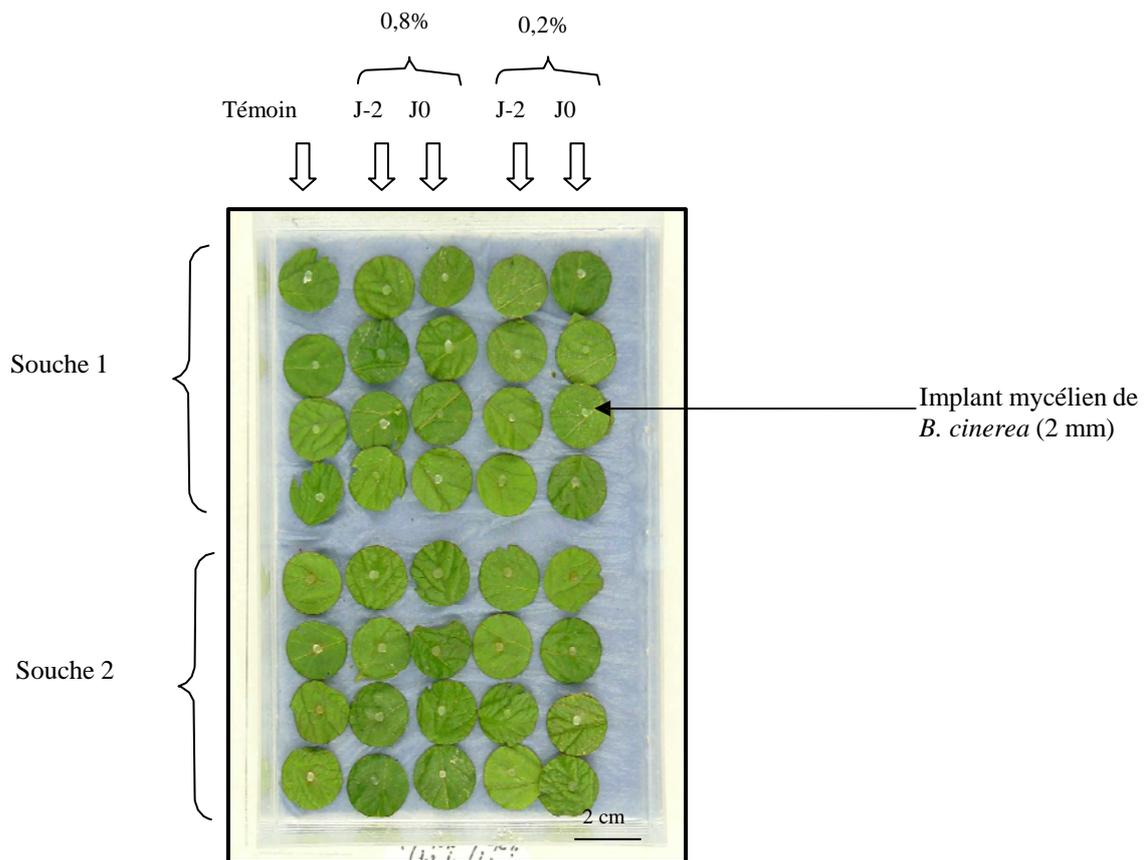


Figure 10 : Test d'agressivité de *B. cinerea* et d'efficacité de Serenade® Max sur disques foliaires de tomate (Source : INRA, 2011).

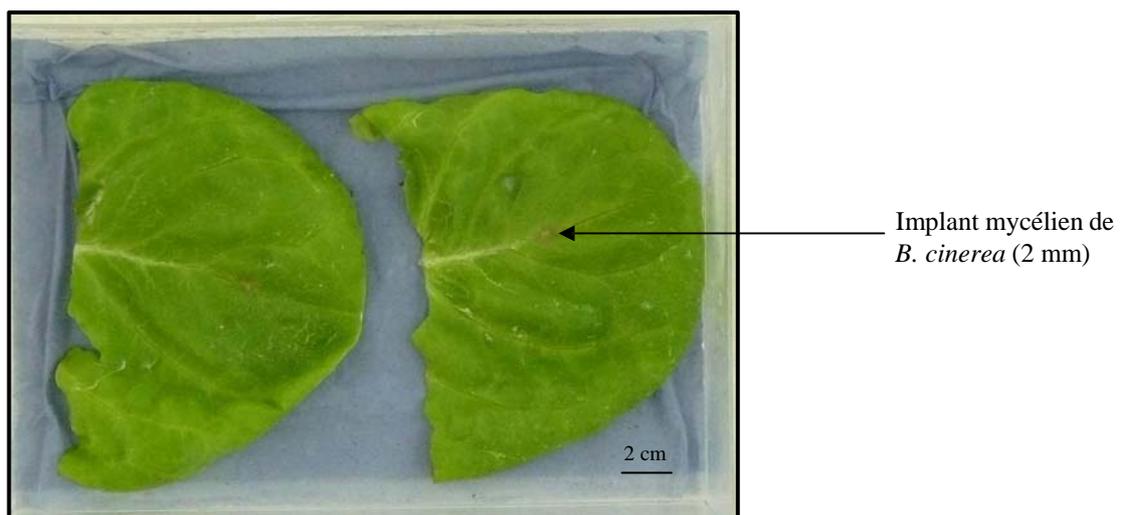


Figure 11 : Test d'agressivité de *B. cinerea* et d'efficacité de Serenade® Max sur feuilles de laitue (Source : INRA, 2011).

Une ANOVA est réalisée pour tester l'effet souche sur les indices d'attaque. Le test de Kruskal-Wallis est utilisé afin d'étudier l'effet souche sur la sporulation pour chacune des cinq séries de souches testées et l'effet traitement global sur la sporulation. Le test de corrélation par rang de Spearman est utilisé pour voir s'il existe un lien entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* sur tronçons de tige et sur plantes entières de tomate ainsi que pour étudier les relations entre la sporulation des souches sur plantes et leur sporulation *in vitro*, leur capacité d'infection des plantes et le niveau de protection conféré par *M. dimerum*.

VI) Agressivité de *B. cinerea* et efficacité de Serenade® Max sur organes foliaires détachés

Des tests d'agressivité des souches de *B. cinerea* et d'efficacité du biofongicide Serenade® Max ont été réalisés sur feuilles de laitue et de tomate. Pour ces tests, 20 souches de *B. cinerea* ont été évaluées parmi les 41 souches de la collection étudiées sur tiges de tomate (annexe II). Des traitements par pulvérisation des plantes entières de tomate cv. 'Raissa' et des laitues cv. 'Mantilia' sont effectués avec le biofongicide Serenade® Max selon quatre modalités : traitement deux jours avant le test (J-2) et le jour même (J0) avec deux concentrations, 0,8% et 0,2% (fig. 10). Le traitement à J-2 permet d'évaluer l'effet inducteur de défenses, Serenade® Max étant homologué comme produit stimulateur des défenses naturelles des plantes (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). Le traitement à J0 permet d'estimer l'effet direct du produit sur l'agent pathogène. Un lot de plante n'est pas traité, il permet d'évaluer l'agressivité des souches de *B. cinerea*.

Pour la laitue cv. 'Mantilia', deux morceaux de feuilles sont déposés dans une boîte en plexiglas (125 x 185 mm) fermée dont le fond est recouvert d'un papier absorbant imbibé de 10 ml d'eau stérile (fig. 11). Pour la tomate cv. 'Raissa', des disques foliaires (2 cm de diamètre) sont prélevés à l'emporte-pièce sur les feuilles 4 à 7 de chaque plante, puis mélangés et tirés aléatoirement pour être disposés dans des boîtes en plexiglas, à raison de quarante disques de feuilles par boîte (fig. 10).

Au centre de ces organes foliaires sont déposés les implants mycéliens des souches de *B. cinerea* testées, le mycélium contre la surface de la feuille.

Pour la laitue, six feuilles sont inoculées par souche et par traitement, à raison de deux feuilles par boîte. Pour la tomate, trois boîtes sont réalisées par souche, avec pour chacune quatre disques de feuilles par traitement, et deux souches sont inoculées par boîte. Les boîtes contenant les feuilles sont ensuite placées en chambre climatisée (21°C, photopériode de 14 h, intensité lumineuse 114 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Des photographies des boîtes sont prises à 48 h pour la tomate et à 72 h pour la laitue. La surface attaquée par l'agent pathogène est mesurée (en mm^2) sur chacun des organes foliaires grâce au logiciel d'analyse d'images Assess 2 (APS Press). Par souche et pour chaque traitement, une moyenne des valeurs de surfaces lésées est calculée. A partir de ces moyennes, un indice d'attaque est calculé selon la formule :

$$I_a = 100 * (SL_{\text{souche X}} / SL_{\text{BCI}})$$

Où SL = surface de lésion nécrotique.

Pour chaque souche, un taux de protection conféré par *M. dimerum* (P_{L13}) est également calculé, selon la formule précédemment exposée.

Les niveaux d'agressivité sur feuilles de tomate puis de laitue de 20 souches de *B. cinerea* sont comparés à l'aide d'une ANOVA. Le test de Newman-Keuls est utilisé, si besoin, pour la comparaison deux à deux des souches de *B. cinerea*.



Figure 12 : Disposition des fraises sur des caillebottis en plastique pour le test d'agressivité des souches de *B. cinerea*. Sur chaque rangée verticale de fraises, une souche différente est testée (Source : INRA, 2011).



Figure 13 : Disposition des pommes sur des plateaux porte-pots pour le test d'agressivité des souches de *B. cinerea*. Sur chaque rangée verticale de pommes, une souche différente est testée (Source : INRA, 2011).

Le test de Kruskal-Wallis permet d'étudier l'effet traitement par Serenade® Max sur la taille des lésions causées par *B. cinerea* sur feuilles de tomate et de laitue, puis la comparaison deux à deux des modalités de traitement est effectuée grâce au test de Kolmogorov-Smirnov.

Le test de corrélation par rang de Spearman permet d'étudier les relations entre les indices d'attaque des souches sur différents organes qui sont la tige ou la feuille de tomate d'une part et les feuilles de tomate ou de laitue d'autre part. Ce test de corrélation permet également de tester le lien entre l'agressivité de 20 souches de *B. cinerea* (sur feuilles de tomate ou de laitue) et le contrôle de ces souches par le produit Serenade® Max et de comparer les taux de protection conférés par les deux agents de lutte biologique étudiés : *M. dimerum* et Serenade® Max.

VII) Agressivité de *B. cinerea* sur différentes espèces végétales

Pour compléter les précédents tests d'agressivité nous avons comparé l'agressivité de dix souches de *B. cinerea*, choisies parmi les 41 souches étudiées (annexe II), sur différents tissus végétaux (en plus des tiges et des feuilles de tomate) qui sont les pétales de pêcher et de cerisier, les feuilles de basilic, les disques foliaires (20 mm de diamètre) de pomme-de-terre, de tabac, de laitue et de fraise et deux fruits : la fraise et la pomme.

Les organes foliaires et les pétales sont disposés dans des boîtes en plexiglas transparentes (125x185 mm) à raison de 8x5 (Longueur x largeur) disques foliaires ou pétales par boîte et 5x4 (L x l) feuilles par boîte pour le basilic. Les fruits de fraise sont disposés sur des caillebotis en plastique (5x3 fraises par souche ; fig. 12) et les pommes sur des plateaux porte-pots (3x3 pommes par souche ; fig. 13).

Les organes foliaires sont inoculés à partir d'implants mycéliens des souches de *B. cinerea*. Pour chaque souche quatre organes foliaires sont inoculés par boîte et chaque souche est inoculée dans trois boîtes distinctes. Les pétales et les fruits sont inoculés à partir de suspensions de spores dosées à 10⁶ spores/ml. Les volumes inoculés sont respectivement de 2 µl, 5 µl et 10 µl pour les pétales de fleurs, les fraises et les pommes. Avant l'inoculation des fruits, une blessure (de 5 mm à l'extrémité des fraises et de 10 mm sur deux côtés opposés d'une pomme) est réalisée à l'aide d'un cône jaune de pipette afin de favoriser l'attaque par l'agent pathogène. Les organes végétaux sont ensuite incubés en chambre climatisée (21°C, photopériode de 14 h).

Pour les organes foliaires et les pétales, des photographies des boîtes sont prises selon les tissus végétaux 24, 48 ou 72 h après l'inoculation (tab. 3). Elles sont analysées par le logiciel Assess 2.0 (APS Press) afin de déterminer la surface attaquée par les différentes souches (en mm²). Par souche, la moyenne des quatre valeurs de surfaces attaquées est calculée pour chaque boîte. A partir de ces moyennes un indice d'attaque est calculé, selon la formule précédemment exposée pour l'agressivité des souches de *B. cinerea* sur feuilles de tomate et de laitue.

Pour les fruits, la taille de la lésion (en mm) est mesurée quotidiennement jusqu'à cinq ou sept jours après inoculation. L'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) est ensuite calculée et permet d'estimer un indice d'attaque selon la formule suivante :

$$I_a = 100 * (AUDPC_{souche X} / AUDPC_{BCI})$$

Pour chaque souche et chaque espèce végétale, trois répétitions indépendantes du test sont réalisées. Des moyennes des indices d'attaque sont donc calculés.

Le test de Kruskal-Wallis permet de comparer les niveaux d'agressivité des 10 souches de *B. cinerea* sur différents organes végétaux, en considérant la composante 'niveau d'infection' de l'agressivité, estimée par les indices d'attaque des différentes souches. La concordance entre les niveaux d'agressivité de ces 10 souches sur tous les organes végétaux est étudiée par le test de concordance de rang de Kendall (STATISTICA).

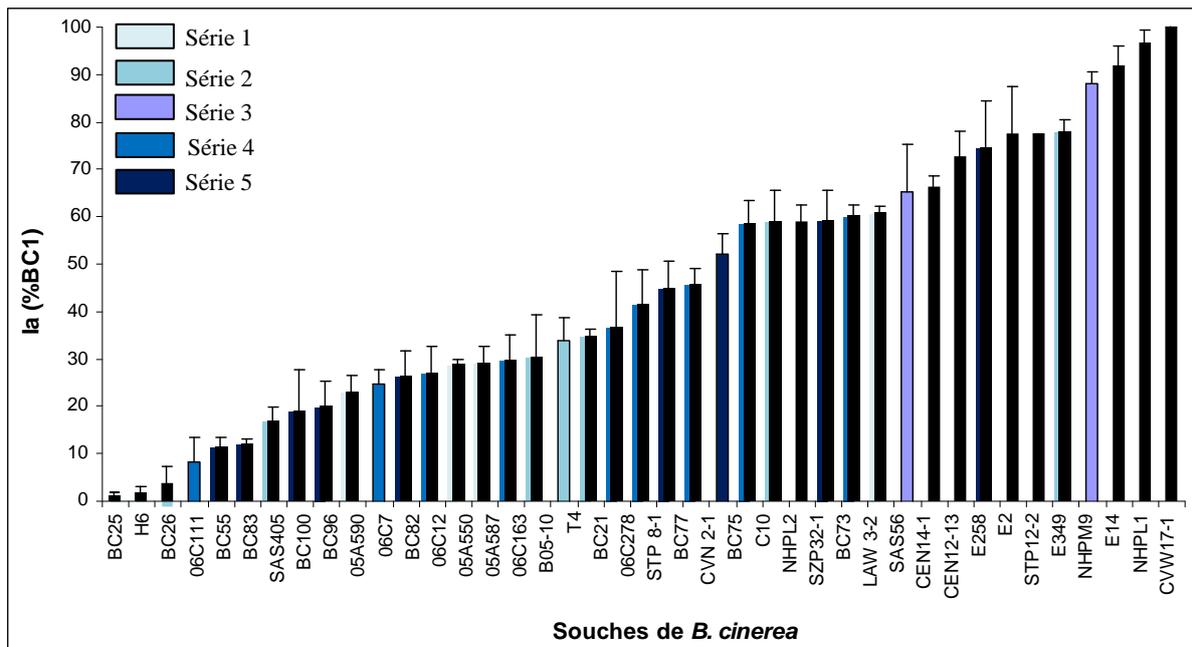


Figure 14 : Indices d'attaque sur plantes de tomate de 41 souches de *B. cinerea*. Pour chaque souche l'indice d'attaque est mesuré par rapport à BC1 et exprimé en pourcentage. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard. Chaque série de tests est représentée par une couleur différente. La souche BC1 est testée dans chaque série de tests.

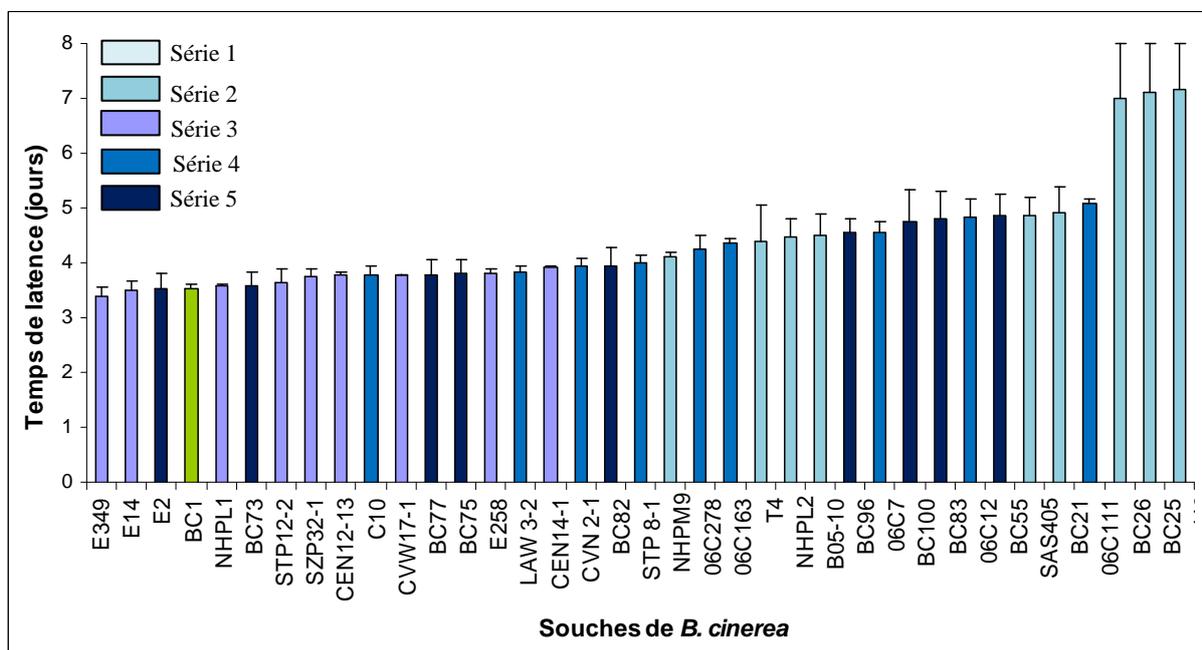


Figure 16 : Temps de latence avant l'infection des tiges de tomate de 37 souches de *B. cinerea*. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard. Chaque série de tests est représentée par une couleur différente. La souche BC1 est testée dans chaque série de tests.

Résultats

I) Étude de l'agressivité des souches de *Botrytis cinerea*

1) Agressivité de *B. cinerea* sur plantes de tomate

L'agressivité de 41 souches de *B. cinerea* est étudiée en considérant quatre composantes qui sont le temps de latence avant l'infection de l'hôte, le niveau d'infection causé par la souche, la vitesse de développement des lésions sur plante et la sporulation.

1.1) Infection des tiges

Le niveau d'infection des tiges par une souche donnée est estimé par un indice d'attaque (Ia). Cet indice d'attaque est calculé à partir des valeurs d'AUDPC obtenues pour chaque souche testée lors de deux ou trois répétitions indépendantes, en utilisant BC1 comme souche de référence ($Ia_{BC1} = 100\%$).

La distribution des indices d'attaque, sur plantes entières, des 41 souches étudiées suit une loi normale (test de Shapiro-Wilks, $W = 0,96$, $p = 0,16$) et l'égalité des variances est respectée (test de Bartlett, $p = 0,39$). Une analyse de variance révèle que les souches de *B. cinerea* étudiées ont des capacités très variables d'infection des tiges des plants de tomate (fig. 14 ; ANOVA sur les indices d'attaque, $p = 3,56 \cdot 10^{-24}$). Leurs indices d'attaque varient de 1 à 96,6% en couvrant de façon continue toute la gamme d'agressivité. Certaines souches ont une agressivité proche de BC1, qui reste cependant la souche la plus agressive.

En parallèle à ces tests sur plantes entières, des tests sur tronçons de tiges détachés ont été réalisés. Les souches de *B. cinerea* ont des indices d'attaque significativement différents également sur tronçons de tige (ANOVA sur les indices d'attaque, $p = 1,27 \cdot 10^{-17}$). Les niveaux d'infection sur plantes entières et sur tronçons de tiges sont fortement corrélés (fig. 15 ; test de corrélation par rang de Spearman, $R = 0,92$; $p < 0,0001$), suggérant que le classement des souches selon leurs niveaux d'agressivité est équivalent entre ces deux tests. Ainsi le test sur tronçons de tiges de tomate peut également être utilisé pour tester l'agressivité des souches de *B. cinerea*.

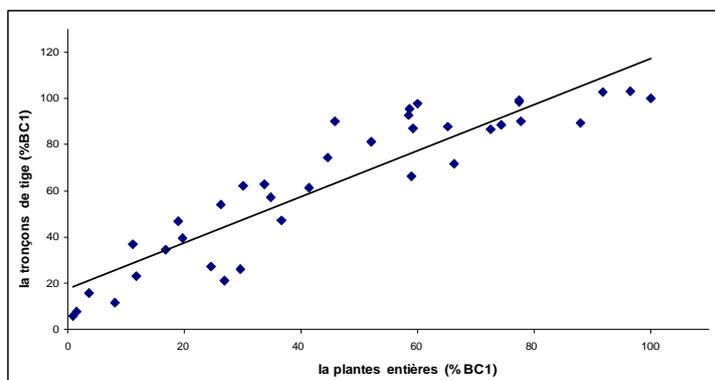


Figure 15 : Corrélation entre les indices d'attaque sur tronçons de tiges et sur plantes entières de tomate de 41 souches de *B. cinerea*. Chaque point correspond à la moyenne des indices d'attaque obtenus par souche avec 2 ou 3 répétitions indépendantes. Les points sont distribués autour d'une droite de régression avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,84$.

L'indice d'attaque d'une souche se calcule à partir d'une valeur moyenne de l'aire sous la courbe de progression de la maladie obtenue pour cette souche et traduit donc plusieurs composantes simultanément, telles que le temps de latence avant l'infection de la plante et la vitesse de développement des lésions. En étudiant séparément ces deux composantes, on constate que le temps de latence avant l'apparition des symptômes sur tiges de tomate varie selon la souche de *B. cinerea* considérée (fig. 16). On obtient deux groupes distincts de souches homogènes pour leurs temps de latence. Les souches BC25, BC26 et H6 forment

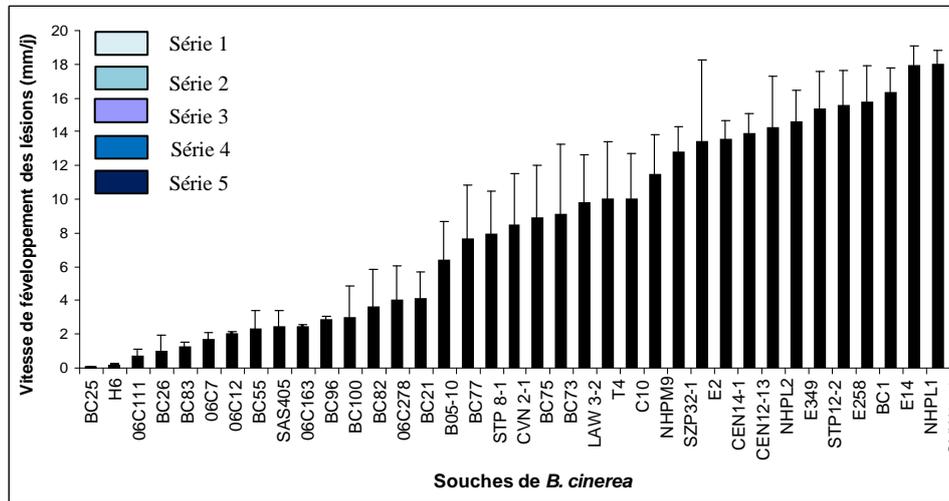


Figure 17 : Vitesses de développement des lésions sur tiges de tomate de 37 souches de *B. cinerea*, exprimées en millimètres par jour. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard. Chaque série de tests est représentée par une couleur différente. La souche BC1 est testée dans chaque série de tests.

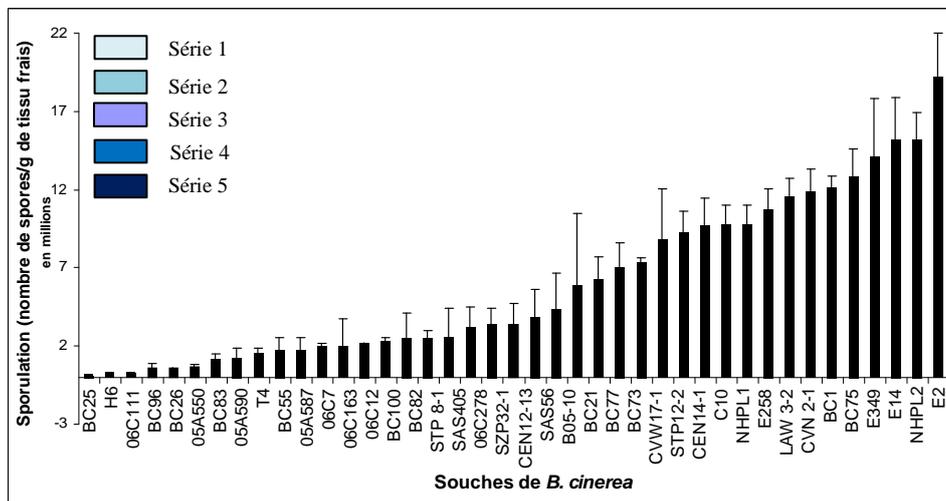


Figure 18 : Sporulation sur tronçons de tomate de 41 souches de *B. cinerea*, exprimée en nombre de spores produit par gramme de tissu frais. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard. Chaque série de tests est représentée par une couleur différente. La souche BC1 est testée dans chaque série de tests.

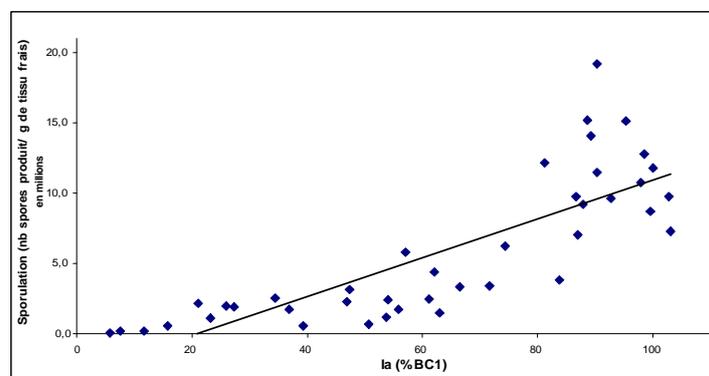


Figure 19 : Corrélation entre l'agressivité de 41 souches de *B. cinerea* sur tronçons de tiges de tomate (représentée par l'indice d'attaque, exprimé en pourcentage) et leur niveau de sporulation, exprimé en nombre de spores produit par gramme de tissu frais. Chaque point correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les points sont distribués autour d'une droite de régression avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,66$.

un groupe et se distinguent des autres souches par un fort temps de latence. Notons que ces trois souches possèdent une faible capacité d'infection de la tige (fig. 14). On observe effectivement une corrélation négative hautement significative entre l'indice d'attaque des souches et leur temps de latence avant l'infection des plants de tomate (test de corrélation par rang de Spearman, $R = -0,89$; $p < 0,0001$), suggérant que les souches ayant un fort temps de latence sont celles qui attaquent le plus difficilement leur hôte. Les autres souches ont des temps de latence très proches.

On observe également des différences entre les souches de *B. cinerea* au niveau de la vitesse de développement des lésions provoquées sur plantes entières de tomate (fig. 17), qui varie de 0,1 mm/j pour la souche BC25, à 18 mm/j pour la souche CVW17-1. Les souches ayant une vitesse élevée de développement des chancres sur tiges sont celles globalement qui ont un temps de latence court (test de corrélation par rang de Spearman, $R = -0,85$; $p < 0,0001$) et un fort niveau d'infection des tiges ($R = 0,96$; $p < 0,0001$).

1.2) Sporulation des souches de *B. cinerea* sur tiges de tomate

Il existe une forte diversité de la capacité de sporulation des souches de *B. cinerea* sur tronçons de tige de tomate (fig. 18). La distribution des données de sporulation n'étant pas normale, nous ne pouvons pas effectuer de test paramétrique d'analyse de variance. Un test de Kruskal-Wallis de comparaison des moyennes est donc effectué afin de détecter un éventuel effet souche sur la sporulation. En raison de la limite imposée par l'outil statistique, les 41 souches de *B. cinerea* ne peuvent être analysées conjointement, le test de comparaison des moyennes est donc réalisé pour chacune des cinq séries de tests au cours desquelles différentes souches de *B. cinerea* sont testées.

Nous observons des différences significatives de sporulation parmi les souches de *B. cinerea* pour les cinq séries de souches testées (tab. 4), ce qui suggère l'existence d'un effet souche global sur le niveau de sporulation de cet agent pathogène.

Tableau 4 : Résultats de la statistique de Kruskal-Wallis réalisée pour étudier l'effet souche sur le niveau de sporulation de *B. cinerea*, pour chaque série de tests. L'effet souche est significatif au seuil de 5%.

Séries de tests	Nombre de souches	Significativité du test de Kruskal-Wallis
1	10	$p < 0,0001$
2	10	$p < 0,0001$
3	10	$p < 0,0001$
4	10	$p < 0,0001$
5	5	$p = 0,0002$

D'autres parts, les souches de *B. cinerea* ayant une forte sporulation sont celles qui ont les indices d'attaque les plus élevés sur tiges de tomate (fig. 19 ; test de corrélation par rang de Spearman, $R = 0,87$; $p < 0,0001$).

Nous observons donc une grande diversité de comportements des souches de B. cinerea sur plantes de tomate. Ces souches présentent-elles également une diversité de développement in vitro sur milieu PDA, en absence de l'effet lié à l'interaction avec la plante ?

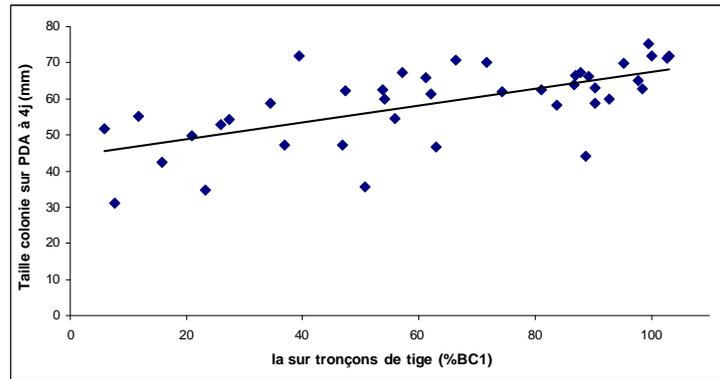


Figure 20: Corrélation entre la taille du développement mycélien *in vitro* des souches de *B. cinerea*, exprimée en millimètres, et leur agressivité (représentée par les indices d'attaque, exprimés en pourcentage). Chaque point correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les points sont distribués autour d'une droite de régression avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,42$.

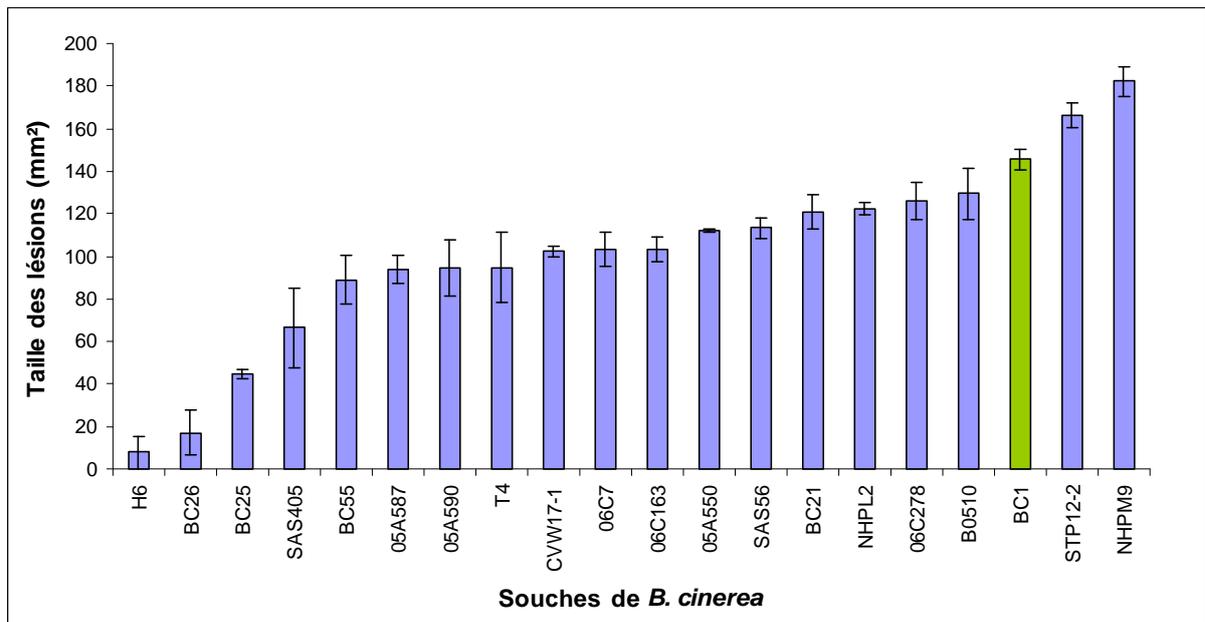


Figure 21: Tailles des lésions, à 48 h après inoculation, occasionnées sur feuilles de tomate par 20 souches de *B. cinerea* et exprimées en mm^2 . Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne de 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard.

1.3) *Lien entre le niveau d'agressivité sur plantes des souches de B. cinerea et leur capacité de croissance et de sporulation in vitro sur milieu PDA*

Les indices d'attaque des souches de *B. cinerea* sur tiges de tomate sont corrélés à la taille des colonies à 4 jours sur milieu PDA : les souches se développant le plus *in vitro* sont celles qui ont les indices d'attaque les plus élevés sur plantes (fig. 20 ; test de corrélation par rang de Spearman, $R = 0,67$; $p < 0,0001$). On observe une corrélation moins bonne, quoique significative, entre les vitesses de croissance des souches *in vitro* sur milieu PDA et la vitesse de développement des lésions sur tiges de tomate (test de corrélation par rang de Spearman, $R = 0,44$; $p = 0,007$), suggérant que certaines souches ne sont pas affectées dans leur croissance par le passage sur plante.

Une corrélation significative entre le niveau de sporulation sur milieu PDA et sur les tronçons de tige est également mise en évidence ($R = 0,49$; $p = 0,002$).

Les 41 souches de B. cinerea testées présentent des niveaux d'agressivité très divers sur tiges de tomate ; les souches considérées comme les plus agressives ont un temps de latence court, des indices d'attaque élevés ainsi qu'une vitesse élevée de développement des lésions sur tiges et une forte sporulation sur tissu végétal. De plus, ces souches sont celles qui se développent le plus rapidement sur un milieu de culture riche. Une telle diversité d'agressivité entre souches de B. cinerea est-elle également observée sur feuilles de tomate ?

2) Agressivité de *B. cinerea* sur feuilles de tomate

L'agressivité de *B. cinerea* sur feuilles de tomate est étudiée sur un sous échantillon de 20 souches parmi les 41 souches testées sur tiges. Sur feuilles de tomate les 20 souches ont des niveaux d'agressivité proches (fig. 21). Le niveau d'infection des feuilles est estimé par la mesure de la surface attaquée 48 h après l'inoculation et un indice d'attaque par rapport à la souche BC1 est calculé. On observe une forte corrélation entre l'agressivité de ces 20 souches sur tiges et sur feuilles de tomate : plus la souche est agressive sur plante et plus elle l'est sur feuille (fig.22; test de corrélation par rang de Spearman, $R = 0,83$; $p < 0,0001$). Comme sur tiges de tomate, on observe une grande diversité d'agressivité entre les souches (ANOVA sur la taille des lésions, $p < 0,0001$).

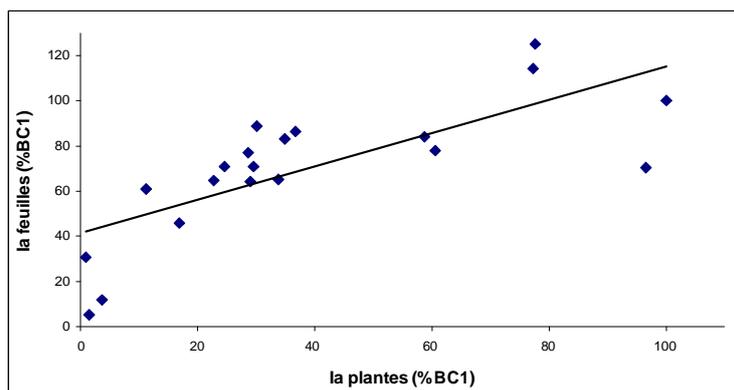


Figure 22: Corrélation entre l'agressivité de 20 souches de *B. cinerea* (représentée par les indices d'attaque, exprimés en pourcentage) sur feuilles et sur tiges de tomate. Chaque point correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les points sont distribués autour d'une droite de régression avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,56$.

Les souches les plus agressives sur tomates sont-elles également les plus agressives sur d'autres espèces végétales ? Pour répondre à cette question, nous avons dans un premier temps testé 20 souches de B. cinerea sur la laitue et dans un deuxième temps 10 souches sur sept autres espèces végétales.

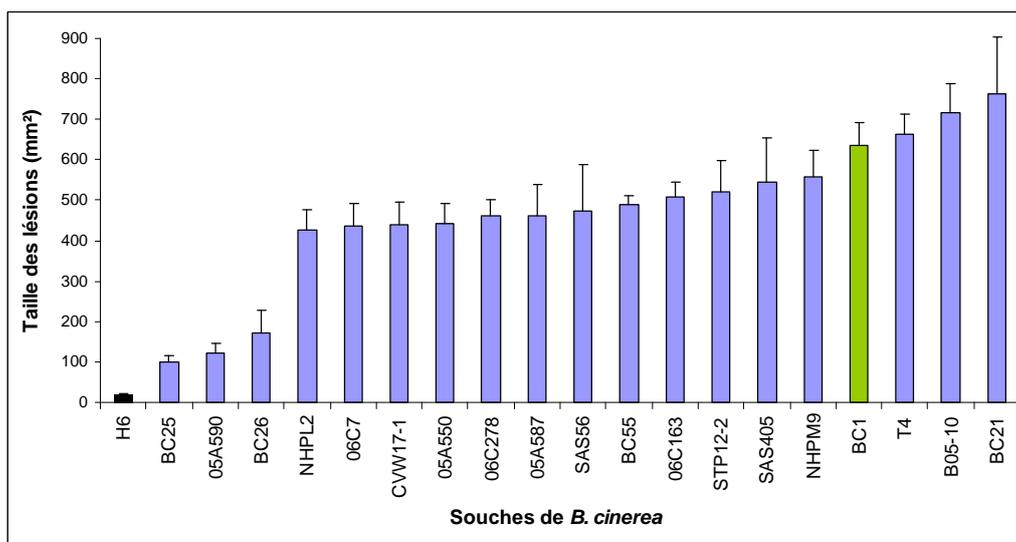


Figure 23: Tailles des lésions, à 72 h après inoculation, occasionnées sur feuilles de laitue par 20 souches de *B. cinerea* et exprimées en mm². Chaque barre de l’histogramme correspond à la moyenne de 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l’erreur standard.

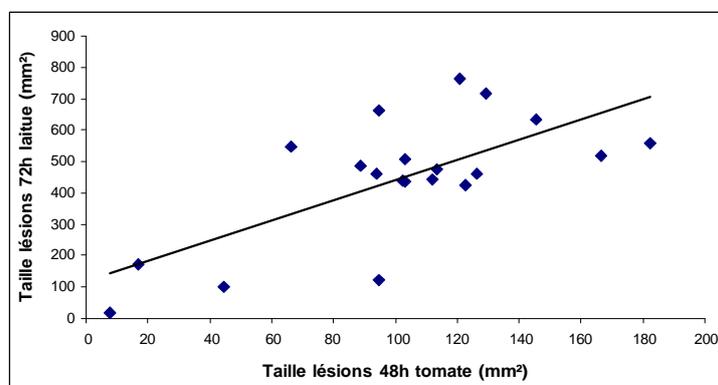


Figure 24: Corrélation entre les tailles des lésions (exprimées en mm²) occasionnées par 20 souches de *B. cinerea* à 72 h après inoculation sur feuilles de laitue et à 48 h sur disques foliaires de tomate. Chaque point correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les points sont distribués autour d’une droite de régression avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,48$.

3) Lien entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* sur plantes de tomate et sur d'autres espèces végétales

3.1) ***Agressivité de B. cinerea sur feuilles de laitue***

L'agressivité sur feuilles de laitue est estimée pour 20 souches de *B. cinerea* par la taille des lésions (en mm²) à 72 h.

Remarquons que sur feuilles de laitue les 20 souches ont également des niveaux d'agressivité très proches (fig. 23), on obtient cependant un effet souche significatif (ANOVA sur la taille des lésions, $p = 1,51.10^{-16}$). Deux groupes de souches se distinguent et le test de Newman-Keuls indique que les souches H6, BC25, 05A590 et BC26 forment un groupe significativement distinct des autres souches. Globalement, les souches les plus agressives sur feuilles de tomate le sont également sur feuilles de laitue (fig. 24 ; test de corrélation par rang de Spearman, $R = 0,69$; $p = 0,0098$).

Cependant cette corrélation est plus faible et non significative ($R = 0,26$; $p = 0,24$) si on ôte de l'analyse les souches BC25, BC26 et H6 qui sont des souches très peu agressives.

Cela suggère que l'agressivité des souches est moins différenciée sur feuilles de laitue que sur feuilles de tomate.

3.2) ***Agressivité de B. cinerea sur différentes espèces végétales***

L'agressivité de 10 souches de *B. cinerea* est estimée sur sept espèces végétales en plus de la tomate et de la laitue. Pour la fraise, deux organes sont testés : feuille et fruit.

Les 10 souches testées présentent des niveaux d'agressivité significativement différents sur chacun des tissus végétaux testés (tab. 5). Leurs niveaux d'agressivité sont plus semblables sur certains organes, notamment sur fruits (fraises et pommes) et sur pétales (cerisier et pêcher) (fig. 25, p 29). Remarquons que ces quatre organes sont globalement plus sensibles aux souches de *B. cinerea* testées, avec des niveaux d'agressivité relativement plus élevés que sur les autres organes.

On observe également un effet significatif du tissu végétal hôte sur le niveau d'agressivité d'une souche donnée (Ia mesuré par rapport à BC1), quelque soit la souche (tab. 5), suggérant que la capacité d'infection d'une souche diffère selon la plante hôte.

Une association significative des niveaux d'agressivité des 10 souches de *B. cinerea* sur les différents tissus hôtes est mise en évidence (test de concordance de rang de Kendall entre les niveaux d'agressivité des 10 souches sur les différents tissus végétaux : $R_{\text{moyen}} = 0,66$, $W = 0,69$; $p < 0,001$). Cela suggère que la distribution des niveaux d'agressivité des souches est globalement équivalente sur tous les tissus végétaux testés. On observe en effet que les souches très agressives sur un organe donné le sont également sur un autre organe (ex. BC1, B0510). De même, les souches peu agressives le sont sur tous les organes (ex. H6, BC25, BC26) (fig. 26, p 29).

Les souches de B. cinerea étudiées ont donc des niveaux d'agressivité très variables sur les différents hôtes testés. Le niveau de protection conféré par des agents de lutte biologique est-il variable selon les souches et corrélé à leur niveau d'agressivité ?

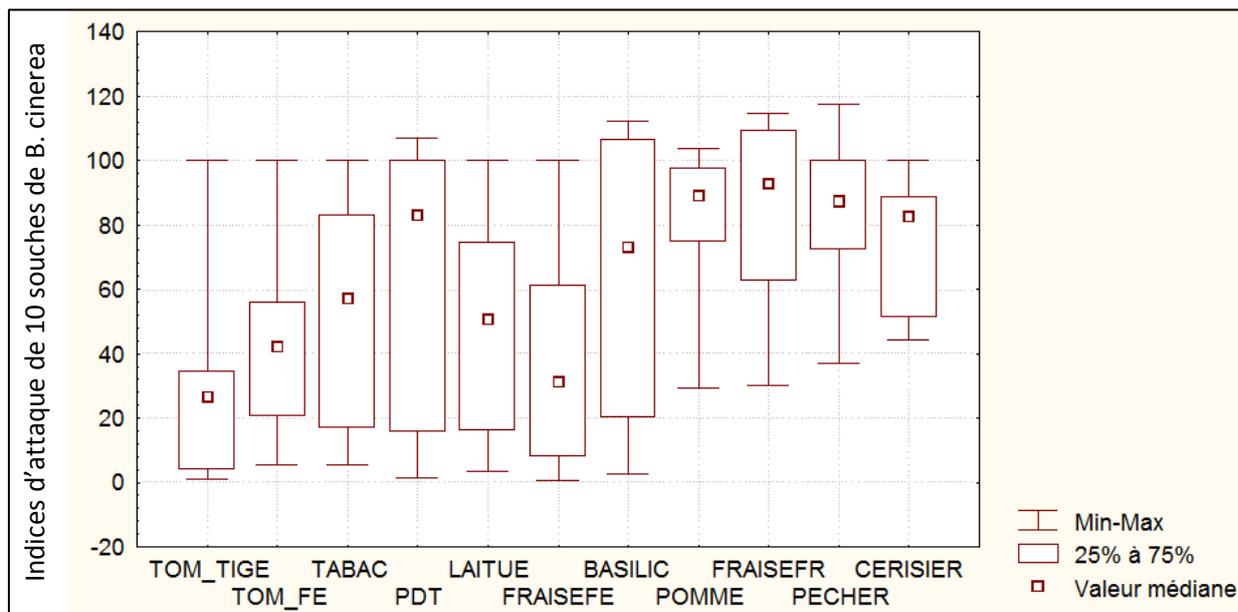


Figure 25: Distribution des niveaux d'agressivité (valeurs minimum, maximum et médiane) par espèce végétale pour les 10 souches de *B. cinerea* testées. Les « moustaches » représentent les valeurs maximales et minimales non aberrantes. La valeur du 1^{er} quartile (25% des effectifs) correspond au trait inférieur de la boîte. La valeur médiane (50% des effectifs) est représentée par un carré à l'intérieur de la boîte. La valeur du 3^{ème} quartile correspond au trait supérieur de la boîte.

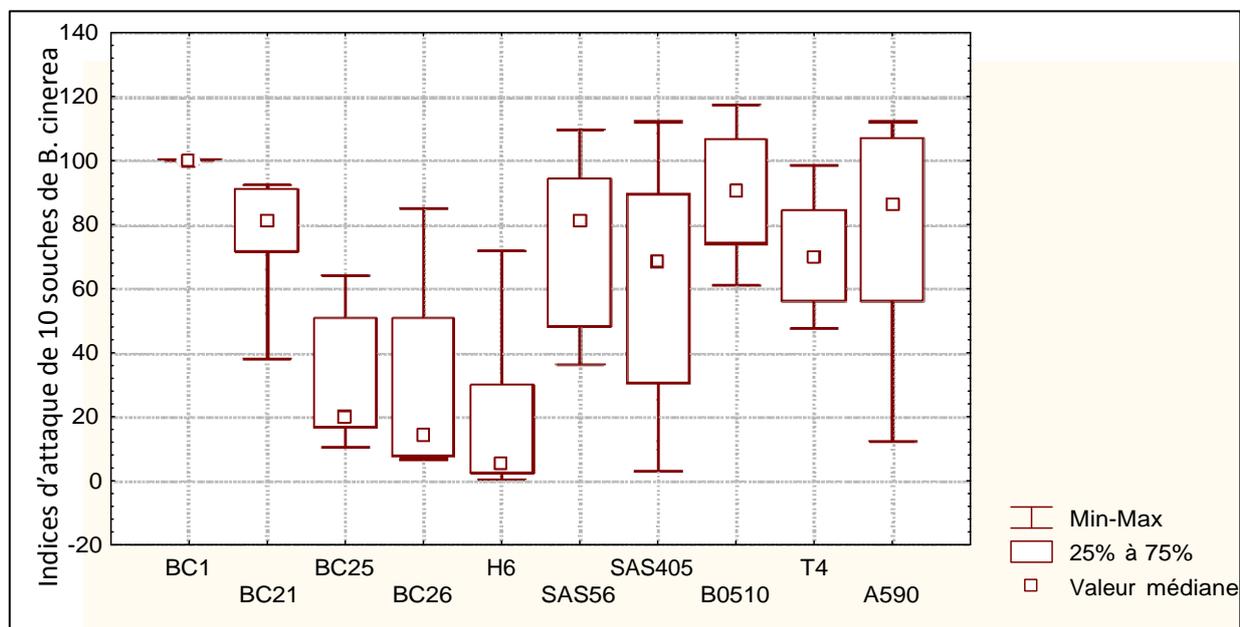


Figure 26: Distribution des niveaux d'agressivité (valeurs minimum, maximum et médiane) par souche de *B. cinerea* pour les espèces végétales testées. Les « moustaches » représentent les valeurs maximales et minimales non aberrantes. La valeur du 1^{er} quartile (25% des effectifs) correspond au trait inférieur de la boîte. La valeur médiane (50% des effectifs) est représentée par un carré à l'intérieur de la boîte. La valeur du 3^{ème} quartile correspond au trait supérieur de la boîte.

Tableau 6 : Effet du traitement avec *M. dimerum* sur la latence, la vitesse de développement des lésions et la sporulation des souches de *B. cinerea*. Des lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kolmogorov-Smirnov). Le test de Kruskal-Wallis est également significatif au seuil de 5%.

	Latence (jours)	Vitesse (mm/j)	Sporulation (spores/g de tissu frais)
T	4,1 a	8,9 a	6,9.10 ⁶ a
L13 10 ⁶	4,5 b	7,7 b	5,8.10 ⁶ b
L13 10 ⁷	5 c	3,5 c	2,9.10 ⁶ c
Kruskal-Wallis	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

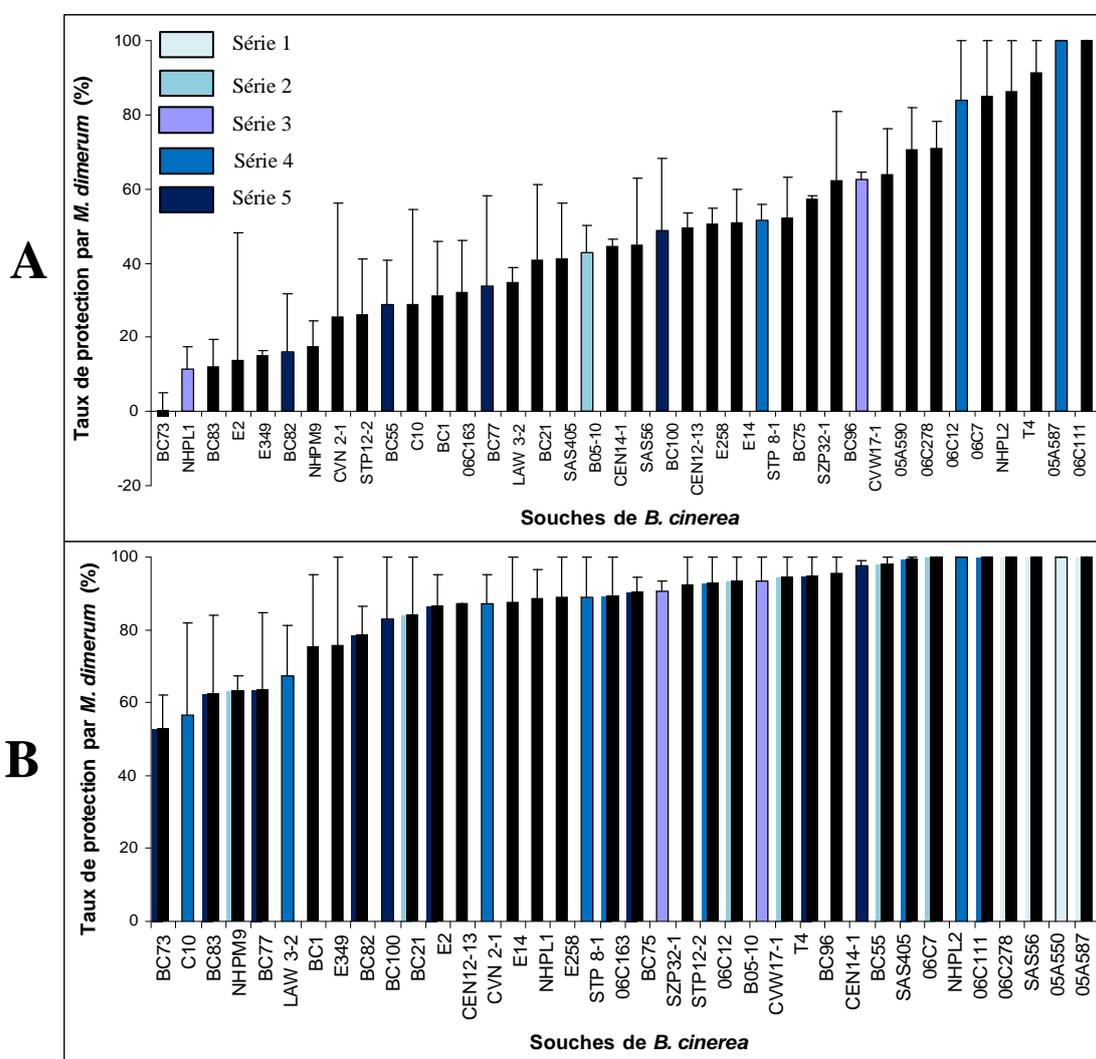


Figure 27: Taux de protection conférés par *M. dimerum* à 10⁶ spores/ml (A) et 10⁷ spores/ml (B) contre les souches de *B. cinerea* et exprimés en pourcentage. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l'erreur standard. Chaque série de tests est représentée par une couleur différente. La souche BC1 est testée dans

II) Efficacité de la lutte biologique

1) Sensibilité des souches de *B. cinerea* à *M. dimerum*

Quarante et une souches de *B. cinerea* sont étudiées pour leur sensibilité à *M. dimerum*. Deux concentrations de cet agent de lutte biologique sont testées : 10^6 et 10^7 spores/ml (soit respectivement des rapports de concentrations de 1/1 et 1/10 entre l'agent pathogène et l'agent de lutte biologique).

1.1) Diversité de la protection conférée par l'agent de lutte biologique

A partir des valeurs d'AUDPC obtenues pour chaque souche de *B. cinerea* en présence de *M. dimerum* à 10^6 et 10^7 spores/ml, des taux de protection ont été calculés, qui reflètent l'efficacité de l'agent de lutte biologique à contrôler les souches de l'agent pathogène. Cette protection de l'hôte conférée par *M. dimerum* est étudiée uniquement dans le cas des souches suffisamment agressives pour attaquer la plante ; ainsi les souches BC25, BC26 et H6 sont retirées des analyses car elles sont très peu agressives, quelque soit leur hôte.

Microdochium dimerum permet d'augmenter de manière significative le temps de latence avant l'infection des plantes de tomate et de réduire la vitesse de développement des lésions et la sporulation des souches de *B. cinerea* par rapport à la modalité témoin, sans application de l'agent de lutte biologique (tests de Kruskal-Wallis de l'effet global du traitement, $p < 0,0001$ pour les trois composantes de l'agressivité citées). L'application de *M. dimerum* à 10^7 spores/ml permet un contrôle significativement plus efficace des souches de *B. cinerea* (tab. 6) qu'à la dose de 10^6 spores/ml.

Dans le cas de l'application de *M. dimerum*, sur plantes entières de tomate, à une concentration de 10^6 spores/ml on observe une distribution normale des taux de protection (test de Shapiro Wilks, $W = 0,97$; $p = 0,31$) et l'égalité des variances est respectée (test de Bartlett, $p = 0,90$). Une analyse de variance sur les taux de protection révèle un effet souche significatif (ANOVA, $p = 0,0001$). Les taux de protection varient de -1,2% pour la souche BC73, à 100% pour les souches 06C111 et 05A550 (fig. 27A). La médiane se situe à 45% et la moyenne des taux de protection pour l'ensemble des souches est de $47 \pm 12\%$.

Notons qu'à cette concentration il existe parfois une très forte variabilité intra-souche de l'efficacité de l'agent de lutte biologique. Cette diversité d'efficacité pourrait être due à une forte variabilité entre les différents tests réalisés notamment d'un point de vue de l'agressivité globale de ces tests, mesurée à partir de la souche de référence BC1, utilisée à chaque répétition des tests. En effet les valeurs d'AUDPC de BC1 varient de 85 à 230 selon les tests effectués.

Lorsque *M. dimerum* est appliqué à une concentration de 10^7 spores/ml (dose prévue pour l'homologation du produit AntiBot) on distingue des différences de protection de la tomate conférée par l'agent de lutte biologique moins marquées entre les 41 souches de *B. cinerea* (fig. 27B). On observe globalement une bonne protection par *M. dimerum* avec des taux de protection des plantes qui varient de 60 à 100%. La médiane se situe à 90% et le taux de protection moyen pour l'ensemble des souches est de $86,8 \pm 8,1\%$.

Remarquons que la souche BC73 est également la moins bien contrôlée à cette concentration de l'agent de lutte biologique.

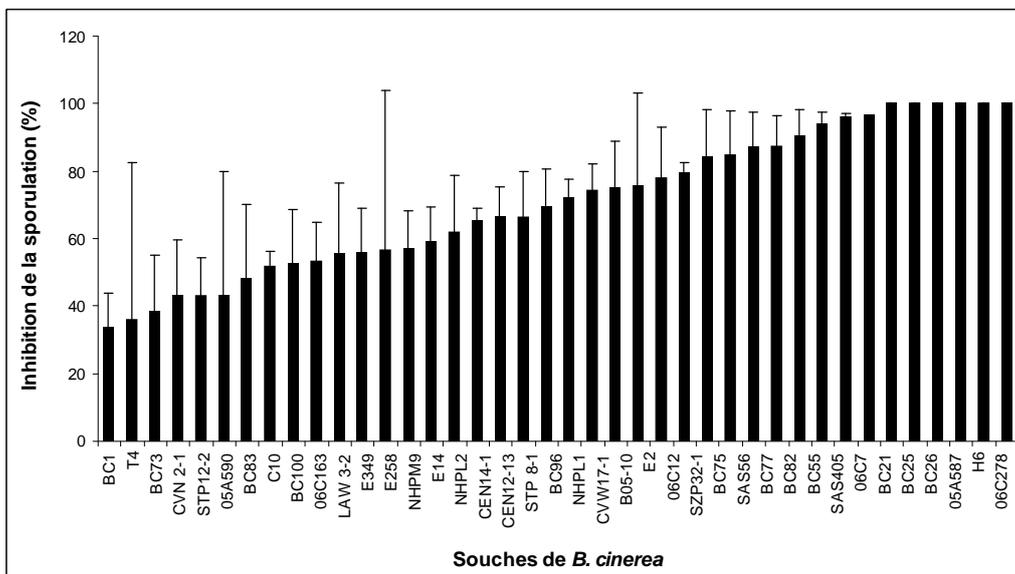


Figure 28: Inhibition de la sporulation de 40 souches de *B. cinerea* en présence de *M. dimerum* à 10^7 spores/ml, exprimée en pourcentage. Chaque barre de l’histogramme correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les barres verticales associées correspondent à l’erreur standard. Chaque série de tests est représentée par une couleur différente. La souche BC1 est testée dans chaque série de tests.

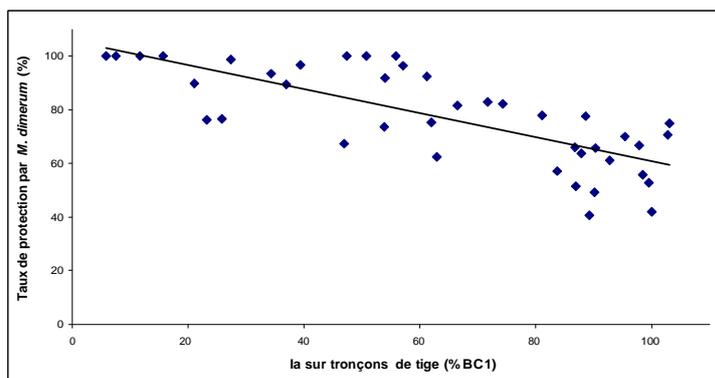


Figure 29: Corrélation entre l’agressivité par rapport à BC1 des souches de *B. cinerea* et le niveau de protection conféré par *M. dimerum* appliqué à 10^6 spores/ml sur tronçons de tiges de tomate. Chaque point correspond à la moyenne de 2 ou 3 répétitions indépendantes pour une souche. Les points sont distribués autour d’une droite de régression avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,13$.

Tableau 7 : Effet des différents traitements de Serenade® Max sur l’infection des feuilles de tomates par 19 souches de *B. cinerea* et sur les taux de protection conférés par l’agent de lutte biologique. Des lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kolmogorov-Smirnov). Le test de Kruskal-Wallis est également significatif au seuil de 5%.

Traitement	Surface lésée à 48 h (mm ²)	Taux de protection (%)			
		Min.	Max.	Médiane	Moyenne ± ES
T	102 a	-	-	-	-
Ser 0,2 J-2	63 b	8	59	40	37 ± 3
Ser 0,2 J0	53 b	20	70	51	47 ± 3
Ser 0,8 J-2	34 c	41	85	66	65 ± 3
Ser 0,8 J0	41 c	37	86	60	60 ± 3
Kruskal-Wallis	p = 0				

Malgré des bons taux de protection des plantes, certaines souches de *B. cinerea* sporulent 10 jours après l'inoculation en présence de *M. dimerum* à 10^7 spores/ml. L'inhibition de la sporulation de *B. cinerea* varie selon les souches de 34 à 100% d'inhibition par rapport à la présence de *B. cinerea* seul, suggérant que des souches dont le développement est partiellement inhibé par l'agent de lutte biologique sont capables de produire d'importantes quantités de spores (fig. 28).

Les 41 souches de B. cinerea étudiées ont une sensibilité variable à l'agent de lutte biologique M. dimerum. Cette différence de sensibilité est-elle liée aux différences d'agressivité constatées parmi les souches de l'agent pathogène ?

1.2) Lien entre l'agressivité des souches de B. cinerea et la protection conférée par M. dimerum

Les souches de *B. cinerea* qui sont peu agressives (faibles Ia) sont mieux contrôlées par *M. dimerum* appliqué à 10^6 spores/ml que des souches plus agressives. Ceci est vérifié sur tronçons de tige pour lesquels on obtient une corrélation nettement significative (fig. 29 ; test de corrélation par rang de Spearman, $R = -0,69$; $p < 0,0001$) ; cette corrélation n'est cependant pas significative sur plantes entières de tomate ($R = -0,32$; $p = 0,051$).

De même, les souches qui sporulent beaucoup sur tronçons de tiges de tomate sont significativement moins bien contrôlées par *M. dimerum* que celles qui sporulent peu ($R = -0,66$; $p < 0,0001$).

Enfin, le niveau de protection conféré par *M. dimerum* à 10^6 spores/ml contre les souches de *B. cinerea* ne semble pas lié à la vitesse de développement des lésions sur tiges de tomate ($R = -0,15$; $p = 0,396$), suggérant que les souches provoquant rapidement d'importantes lésions ne seraient pas moins bien contrôlées que les autres par l'agent de lutte biologique.

Les résultats obtenus montrent que les souches de B. cinerea ont des niveaux de sensibilité variables à l'agent de lutte biologique M. dimerum et que la moindre sensibilité de B. cinerea à cet agent de lutte biologique est liée à l'agressivité de la souche considérée. Les souches de B. cinerea présentent-elles également une sensibilité variable à Serenade® Max, dont le mode d'action est différent ? Existe-t-il un lien entre la sensibilité à cet agent de lutte biologique et l'agressivité des souches de B. cinerea ? Enfin, les souches moins sensibles à M. dimerum sont-elles également moins sensibles à Serenade® Max ?

2) Sensibilité de B. cinerea au produit à base de B. subtilis, Serenade® Max

Pour répondre à la précédente question, le produit Serenade® Max est testé sur deux hôtes différents, en prenant un sous échantillon de 20 souches parmi les 41 souches de *B. cinerea* précédemment étudiées. Deux concentrations et deux dates d'application du produit sont testées, soit cinq modalités en comptant la modalité témoin non traité.

2.1) Agressivité de B. cinerea sur feuilles de tomate et sensibilité au produit Serenade® Max

Nous observons un effet significatif du produit Serenade® Max sur la taille des lésions causées par les souches de *B. cinerea* (test de Kruskal-Wallis sur l'effet traitement, $p < 0,0001$).

Le traitement est plus efficace contre les souches de *B. cinerea* lorsqu'il est appliqué à la concentration forte de 0,8%, les taux de protection étant alors meilleurs (tab. 7).

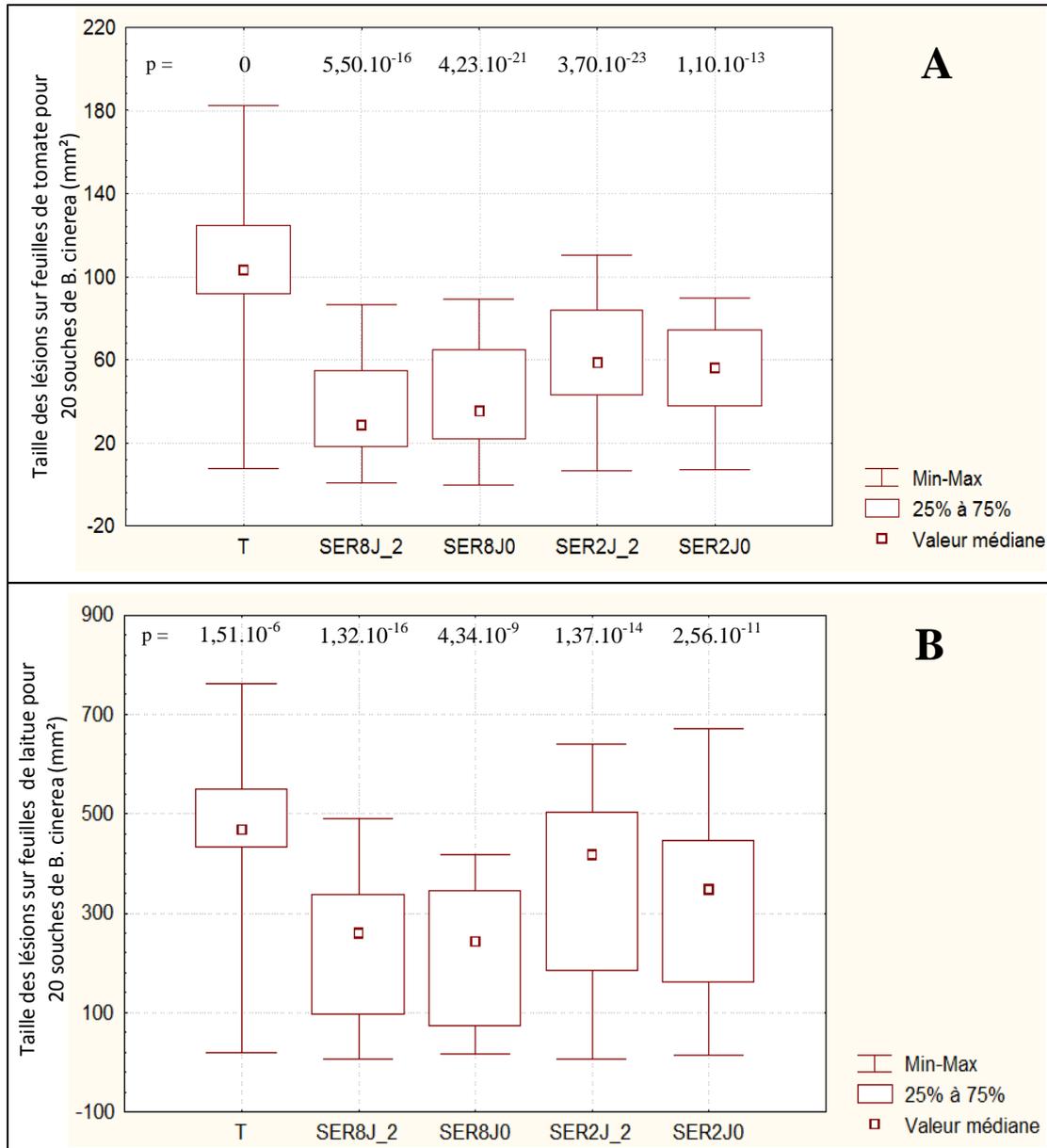


Figure 30: Distribution des niveaux d'agressivité sur feuilles de tomate (A) et de laitue (B), estimés par la taille des lésions en mm² (valeurs minimum, maximum, médiane), sur l'ensemble des souches de *B. cinerea* testées par modalité de traitement avec Serenade® Max (Témoin non traité, 0,8% à J-2, 0,8% à J0, 0,2% à J-2 et 0,2% à J0). Les « moustaches » représentent les valeurs maximales et minimales non aberrantes. La valeur du 1^{er} quartile (25% des effectifs) correspond au trait inférieur de la boîte. La valeur médiane (50% des effectifs) est représentée par un carré à l'intérieur de la boîte. La valeur du 3^{ème} quartile correspond au trait supérieur de la boîte. Les valeurs de p correspondent aux résultats, par traitement, de l'ANOVA de l'effet souche sur la taille des lésions.

On ne distingue par contre pas d'effet du moment d'application du produit sur l'efficacité de l'agent de lutte biologique, quelle que soit la dose utilisée (fig. 30A, tab. 7).

Pour chaque traitement, on observe des différences significatives de niveaux d'attaque selon les souches (fig. 30A : ANOVA sur la taille des lésions à 48h, $p < 0,0001$).

La protection conférée par le produit Serenade® Max n'est pas corrélée à l'agressivité des souches de *B. cinerea*, quelle que soit la modalité de traitement (test de corrélation par rang de Spearman, $K < 0,2$; $p > 0,05$). *En est-il de même sur feuilles de laitue ?*

2.2) Agressivité de *B. cinerea* sur feuilles de laitue et sensibilité au produit Serenade® Max

Les résultats sont globalement similaires à ceux obtenus sur feuilles de tomate. L'effet du traitement sur la taille des lésions est significatif (test de Kruskal-Wallis sur l'effet traitement, $p < 0,0001$) ; on observe pour chaque traitement un effet souche sur la taille des lésions (fig. 30B : ANOVA sur la taille des lésions, $p < 0,0001$). Le traitement confère une meilleure protection contre les souches de *B. cinerea* à la dose de 0,8% mais on n'observe pas d'effet de son moment d'application (tab. 8). On observe cependant une distribution plus étalée des niveaux d'agressivité sur feuilles de laitue, avec un effet souche moins marqué que sur feuilles de tomate.

Comme sur feuilles de tomate, la corrélation entre l'agressivité des souches et la protection conférée par l'agent de lutte biologique n'est pas significative, quelle que soit la modalité de traitement.

Tableau 8 : Effet des différents traitements de Serenade® Max sur l'infection des feuilles de laitues par 20 souches de *B. cinerea* et sur les taux de protection conférés par l'agent de lutte biologique. Des lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Kolmogorov-Smirnov). Le test de Kruskal-Wallis est également significatif au seuil de 5%.

Traitement	Surface lésée à 72 h (mm ²)	Taux de protection			
		Min.	Max.	Médiane	Moyenne ± ES
T	456 a	-	-	-	-
Ser 0,2 J-2	360 b	-25	64	21	23 ± 6
Ser 0,2 J0	324 b	-17	73	30	29 ± 5
Ser 0,8 J-2	256 c	-7	80	46	45 ± 5
Ser 0,8 J0	230 c	10	90	52	49 ± 6
Kruskal-Wallis	p = 0				

2.3) Relation entre le niveau de protection conféré par *M. dimerum* et celui conféré par Serenade® Max vis-à-vis de *B. cinerea*

On n'observe pas de corrélation significative entre les taux de protection conférés par *M. dimerum* sur plantes entières de tomate et ceux conférés par Serenade® Max sur feuilles de tomate, quelle que soit la dose des agents de lutte biologique appliquée et quel que soit le moment d'application du produit Serenade® Max (tests de corrélation par rang de Spearman, $p > 0,05$). Parmi les souches de *B. cinerea* bien contrôlées sur tiges de tomate par *M. dimerum* à 10^7 spores/ml, on observe une grande diversité de la protection des feuilles par Serenade® Max, quelles que soient ses modalités d'application (J-2 ou J0 ; 0,2% ou 0,8%).

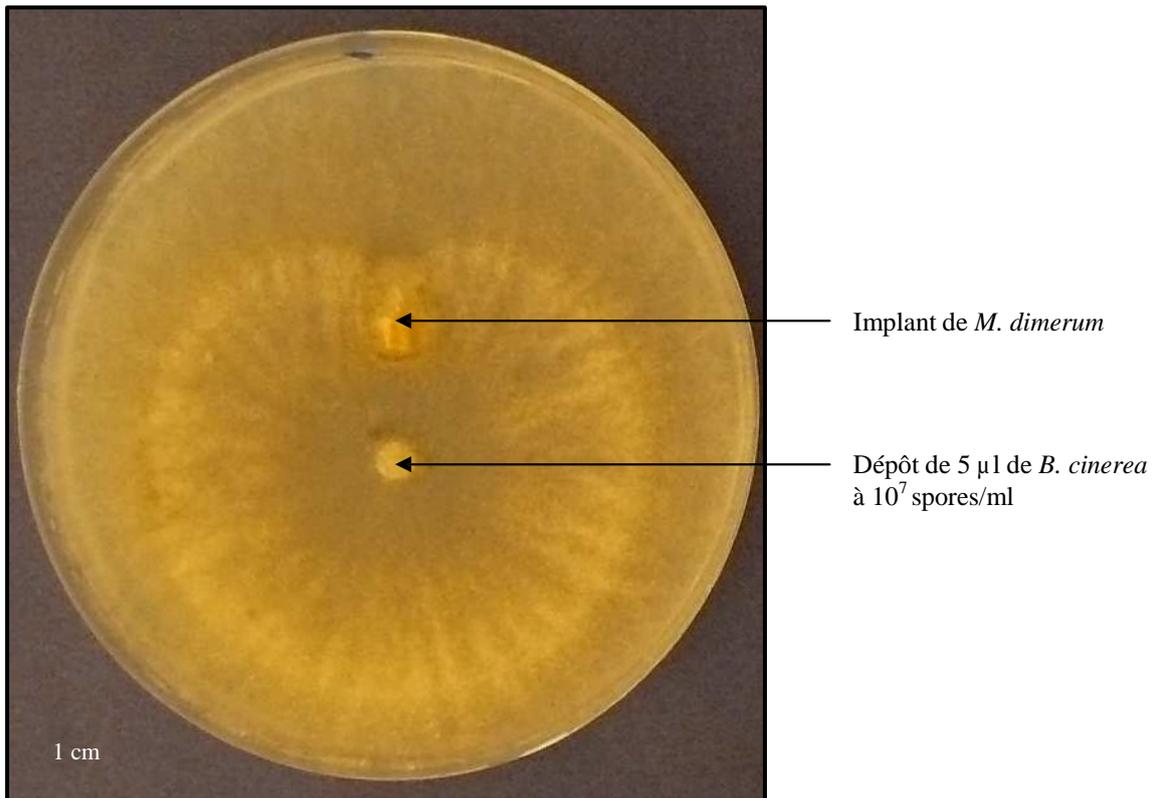


Figure 31 : Etat à 4 jours de la confrontation entre *Botrytis cinerea* (souche BC1) et *M. dimerum* (souche L13) sur milieu PDA. Aucune zone d'inhibition de la croissance de BC1 n'est observée (Source : INRA, 2011).

Discussion

Cette étude met en évidence une différence de sensibilité à des agents de lutte biologique agissant par d'autres modes d'action que l'antibiose, parmi différentes souches de l'agent pathogène *B. cinerea*. En effet, l'évaluation de 41 souches de *B. cinerea* de diverses origines géographiques a révélé qu'elles ne sont pas toutes affectées de la même manière par *M. dimerum*, champignon antagoniste dont le mode d'action probable est la compétition nutritive (Ladvie, 2003). Certaines souches présentent une sensibilité moindre à cet agent de lutte biologique. C'est le cas en particulier de la souche BC73, qui s'avère la moins bien contrôlée aux deux concentrations testées de *M. dimerum* et dont la sporulation est peu inhibée par la présence de l'agent de lutte biologique. Ces résultats suggèrent qu'il existe des isolats naturellement moins sensibles à *M. dimerum* dans les populations naturelles de l'agent pathogène *B. cinerea*. Au cours de cette étude, nous avons également mis en évidence une diversité de la sensibilité de *B. cinerea* à la bactérie *Bacillus subtilis*, substance active du produit Serenade® Max et dont le mode d'action serait multiple (Paulitz & Bélanger, 2001 ; Levasseur *et al.*, 2005).

Très peu d'études ont mis en évidence une telle diversité de la sensibilité de différents isolats d'un agent pathogène à un agent de lutte biologique. Les quelques études qui existent sur ce sujet concernent principalement des différences de sensibilité à des antibiotiques produits par des microorganismes (Ajouz *et al.*, 2011 ; Mazzola *et al.*, 1995 ; Schouten *et al.*, 2004). La seule étude comparable, sur la sensibilité à un agent de lutte biologique agissant par compétition nutritive, est celle de Buck et Jeffers (2004) qui ont montré des différences de sensibilité à la levure antagoniste *Rhodotorula glutinis* PM4, parmi 29 isolats de *B. cinerea*. Cependant, même si cette levure semble agir par compétition nutritive (Buck & Jeffers, 2004), elle produit des sidérophores (acide rhodotorulique) qui ont un effet direct sur la germination des spores de *B. cinerea* (Sansone *et al.*, 2005). La différence de sensibilité à cette levure est-elle liée à une différence de la capacité germinative des souches de *B. cinerea* en présence de l'acide rhodotorulique ?

La sensibilité de diverses souches d'oïdium du melon à un extrait de plante agissant par induction des mécanismes de défense des plantes a également été étudiée (Bardin *et al.*, 2011). Les auteurs ont mis en évidence une différence de sensibilité à l'extrait de *Fallopia sachalinensis* parmi 52 isolats de *Podosphaera xanthii* et 5 isolats de *Golovinomyces cichoracearum*. Le niveau de sporulation de ces nombreux isolats est différemment affecté par le traitement des feuilles de melon avec l'inducteur des mécanismes de défense des plantes. En plus d'induire les mécanismes de défense des plantes (Daayf *et al.*, 1995), cet extrait de plante a un effet direct sur la germination des spores de certains agents pathogènes (Randoux *et al.*, 2006). La différence de sensibilité observée est-elle liée à une moindre sensibilité de certains isolats aux molécules de défense produites suite à l'application de l'agent de lutte biologique ou est-elle due à l'effet direct de l'extrait de plante qui affecte différemment les souches de l'agent pathogène ?

Dans le cas étudié ici, le champignon antagoniste *M. dimerum* ne présente pas d'effet direct vis-à-vis de *B. cinerea* (fig. 31). La différence de sensibilité à *M. dimerum*, observée parmi les souches de *B. cinerea*, est donc probablement due à une capacité différente de ces souches à utiliser les nutriments présents sur la plante, au niveau des plaies d'effeuillage qui sont les cibles préférentielles de l'agent pathogène sur la tomate.

Les résultats obtenus dans cette étude indiquant qu'il existe une corrélation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et leur sensibilité à *M. dimerum* vont dans le sens de cette hypothèse. Nos résultats suggèrent en effet que plus une souche est agressive (fort indice d'attaque, forte sporulation) et plus elle est capable de contourner l'effet de *M. dimerum* et donc moins la plante hôte est protégée. On peut donc penser que plus une souche est agressive, plus elle se développera rapidement sur plante, et donc plus elle pourra utiliser

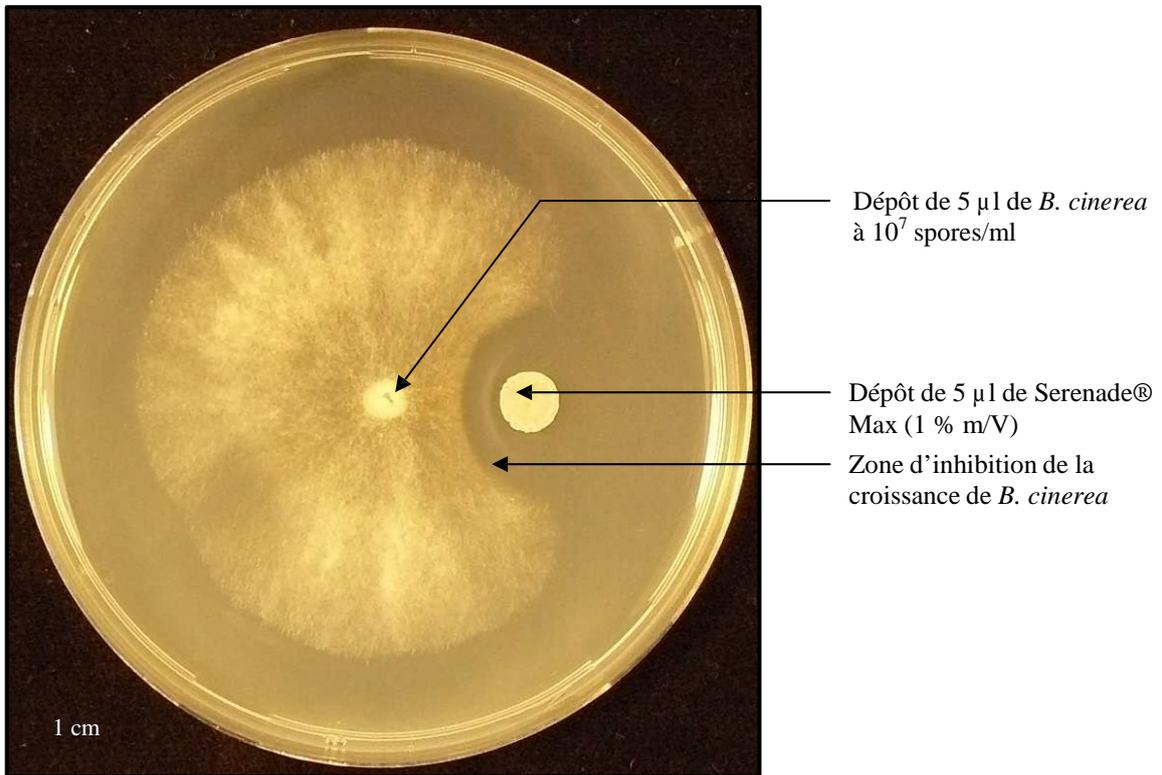


Figure 32 : Etat à 4 jours de la confrontation entre *Botrytis cinerea* (souche BC1) et Serenade® Max sur milieu PDA. On observe une zone d'inhibition de la croissance de BC1, au contact de la bactérie (Source : INRA, 2011).

efficacement les nutriments du milieu. Plus une souche est agressive et moins elle devrait donc être affectée par un éventuel agent de lutte biologique agissant par compétition nutritive. Cependant, même si la corrélation globale que nous avons obtenue entre l'agressivité de *B. cinerea* et la protection conférée par *M. dimerum* sur tronçons de tige est très significative ($R = -0,69$; $p < 0,0001$), nous devons nuancer nos résultats. Tout d'abord, cette corrélation n'est pas vérifiée sur plantes entières de tomate ($R = -0,32$; $p = 0,051$). De plus la souche BC73, qui comme nous l'avons vu est la moins bien contrôlée par *M. dimerum*, n'est pas la souche la plus agressive parmi les 41 souches de *B. cinerea* étudiées ($I_{a_{BC73}} = 59,3$). Cela suggère que d'autres facteurs que la capacité d'infection d'une souche ont un effet sur la sensibilité de *B. cinerea* à *M. dimerum*.

Par contre, aucune corrélation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et la sensibilité à Serenade® Max n'a été observée. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné le mécanisme d'action assez complexe de cette bactérie (Paulitz & Belanger, 2001 ; Lévassieur *et al.*, 2005). En effet, en plus d'une possible implication de la compétition nutritive, cette bactérie agirait par induction des mécanismes de défense des plantes mais également par antibiose (fig.32). Étant donné que *B. cinerea* est capable de contourner l'effet de molécules toxiques, naturelles ou synthétiques (voir synthèse bibliographique, p 11), on peut se demander si la moindre sensibilité de l'agent pathogène à cette bactérie est liée à une moindre sensibilité aux molécules de défense produites par la plante ou à des antibiotiques synthétisés par l'agent de lutte biologique.

Dans une précédente étude, Ajouz *et al.* (2011) ont déterminé les niveaux de sensibilité à la pyrrolnitrine de 204 souches de *B. cinerea*, dont les 41 souches présentées ici ; l'émergence chez *B. cinerea* d'une résistance à cet antibiotique produit par un agent de lutte biologique a été observée. Par contre, on n'observe pas de corrélation entre la sensibilité des souches de *B. cinerea* à Serenade® Max et à la pyrrolnitrine. Ajouz *et al.* (2011) ont montré qu'il n'y a pas non plus de lien entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et leur sensibilité à la pyrrolnitrine. Les mécanismes de résistance de *B. cinerea* à cet antibiotique et aux toxines produites par *Bacillus subtilis* sont donc probablement différents.

En outre, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la sensibilité de 41 souches de *B. cinerea* à *M. dimerum* et à la pyrrolnitrine ($R = 0,46$; $p = 0,06$ et $R = 0,22$; $p = 0,40$ dans le cas de l'application de *M. dimerum* respectivement à 10^6 et 10^7 spores/ml). La réponse des souches de *B. cinerea* aux différents mécanismes d'action mis en place par ces agents de lutte biologique semble donc différente.

De plus, nous avons montré que les niveaux de protection conférés par chacun des deux agents de lutte biologique *M. dimerum* et Serenade® Max ne sont pas corrélés.

L'ensemble de ces résultats est intéressant du point de vue de la durabilité du contrôle biologique, puisqu'ils semblent indiquer que le fait pour un agent pathogène d'être moins sensible envers un antagoniste ne le rend pas moins sensible à un autre agent de lutte biologique de mode d'action différent.

L'effet de l'agressivité d'un agent pathogène sur l'efficacité du contrôle biologique a été très peu étudié. La seule étude réalisée sur le sujet est celle de Buck et Jeffers (2004) qui étudient le contrôle de *B. cinerea* par la levure *Rhodotorula glutinis*. Ces auteurs n'ont pas établi de corrélation significative entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de la protection conférée par *R. glutinis* sur géraniums. *Rhodotorula glutinis* s'avère capable de contrôler des isolats ayant des niveaux d'agressivité très variés, et parmi les isolats de *B. cinerea* les moins bien contrôlés par l'agent de lutte biologique certains sont très peu agressifs. Cela corrobore le fait que cette levure n'agit pas seulement par compétition nutritive *sensu stricto*, et que l'acide rhodotorulique a probablement un effet direct sur son efficacité *in planta* (Sansone *et al.*, 2005). Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer s'il y a un lien entre le

niveau de sensibilité de *B. cinerea* à cette levure et son niveau de sensibilité à d'autres agents de lutte biologique producteurs de toxines.

Nos travaux ont également mis en évidence une importante diversité des composantes de l'agressivité parmi les 41 souches de *B. cinerea* testées ; ce champignon phytopathogène présente donc une gamme d'agressivité très étendue. Une telle différence d'agressivité des souches de *B. cinerea* a déjà été montrée dans de précédentes études sur vigne, tabac, tomate et haricot vert (Tiedemann *et al.*, 1997 ; Martinez *et al.*, 2003 ; Decognet *et al.*, 2009). Les souches les plus agressives sont celles qui ont les indices d'attaque les plus élevés, associés à un temps de latence court, une vitesse élevée de développement des lésions et qui sporulent beaucoup. Des résultats similaires ont été obtenus par Miller *et al.* (1998) qui ont mis en évidence des niveaux d'agressivité très variés parmi 22 isolats de *Phytophthora infestans*. Ils ont montré que les isolats les plus agressifs sont ceux ayant des fortes valeurs d'AULEC (Area Under the Lesion Expansion Curve) et de taille de lésions, un niveau de sporulation élevé, et un temps de latence court.

Nos résultats montrent que les souches de *B. cinerea* les plus agressives sur plants de tomate (la élevés) sont celles dont la croissance mycélienne sur milieu PDA est la plus importante. Cela va à l'encontre des résultats obtenus par Martinez *et al.* (2003), qui ont mis en évidence une corrélation négative significative entre la croissance mycélienne de *B. cinerea* sur milieu PDA et son pouvoir pathogène sur vigne et tabac, suggérant que les souches très agressives ont une vitesse de croissance mycélienne plus faible que des souches moins agressives. Ces résultats contradictoires ont cependant été obtenus avec des systèmes de test et des hôtes très différents. Martinez *et al.* (2003) ont étudié l'agressivité des souches de *B. cinerea* à partir d'implants mycéliens déposés sur feuilles de vigne et tabac, tandis que pour notre étude, des plaies sur tiges de tomate ont été inoculées avec des suspensions de spores de l'agent pathogène. La capacité à infecter ces différents hôtes nécessite peut-être la mise en place de mécanismes d'infection différents chez *B. cinerea*. Le test de l'ensemble de nos souches sur ces plantes hôtes permettrait de vérifier cette hypothèse.

Nos résultats indiquent que le niveau d'agressivité d'une souche peut varier selon la plante hôte testée. Ainsi on observe moins de différences d'agressivité des souches sur feuilles de laitue que sur feuilles de tomate, et le spectre d'agressivité est encore plus réduit sur pétales de fleurs ou sur fruits de pommes et fraises. On peut supposer que ces différences d'agressivité des souches selon l'hôte sont liées à des barrières physiques qui diffèrent selon la nature de l'organe végétal. Ainsi sur feuilles de tomate, dont la cuticule est plus épaisse que celles de laitue, on observe davantage de différences d'agressivité entre les souches puisque les souches moins agressives sont moins capables d'infecter ces organes. Sur feuilles de laitue on observe peu de différences entre les souches, car même les souches les moins agressives sont capables de franchir les barrières physiques de ces feuilles semblant plus fragiles. Il en est probablement de même sur les pétales.

Les mécanismes de défense de la plante pourraient également jouer un rôle lors de son infection par l'agent pathogène. En effet, on observe une différence de mise en place des mécanismes de défense selon l'état physiologique de la plante (Whalon, 2005). On peut donc supposer que des différences de mise en place de ces mécanismes existent entre organes différents (feuille vs. tige vs. pétale vs. fruit), d'où une plus ou moins grande homogénéité de l'agressivité des souches de *B. cinerea* selon l'organe végétal attaqué.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Miller *et al.* (1998) qui ont mis en évidence une différence d'agressivité entre cinq isolats de *Phytophthora infestans* selon l'organe végétal hôte. Ils ont montré une différence significative de sporulation entre les cinq isolats lorsque

Tableau 9 : Niveaux d'agressivité, estimés par l'indice d'attaque (Ia en % par rapport à la souche de référence BC1) sur plantes de tomate de 229 souches de *B. cinerea* selon leur hôte d'origine. Des lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil de 5% (test de Newman-Keuls de comparaison des moyennes).

	Nombre de souches	Moyenne \pm ES		Minimum	maximum	médiane
Total	229	49,8 \pm 1,7		0	120	51,3
Tomate	96	60,2 \pm 2,4	a	1	111	62,4
Non plante	69	49,7 \pm 3,1	b	0	120	49,2
Autres plantes*	32	44,2 \pm 3,7	b	0	98	41,4
Vigne	32	24,4 \pm 1,9	c	3	46	26,1
ANOVA		$p = 4.10^{-12}$				

* *Autres plantes : Fraise, Primula, Cerise, Poinsettia, Rose, Gerbera, Hortensia*

ces derniers sont inoculés sur plantes entières de pomme-de-terre alors que les niveaux de sporulation ne sont pas significativement différents sur folioles détachés.

Malgré cette différence d'agressivité des souches selon le matériel végétal hôte, nos résultats indiquent que globalement des souches très agressives sur un hôte le sont également sur un autre (cas de la souche de référence BC1) et inversement des souches peu agressives auront tendance à l'être vis-à-vis de tous les hôtes (cas de la souche H6). Ces résultats suggèrent que plus une souche est agressive plus elle semble capable d'infecter un grand nombre de plantes hôtes et donc que l'agressivité d'une souche serait liée à sa capacité d'infection de différentes espèces végétales.

Cette hypothèse ne va pas dans le sens d'études récentes de génétique des populations qui suggèrent une préférence d'hôte chez *B. cinerea*. Par exemple, les souches échantillonnées sur vigne sont génétiquement différentes de celles échantillonnées sur ronces (Fournier & Giraud, 2008), de même des souches prélevées sur plantes de tomate sous serre sont génétiquement différentes des souches prélevées sur ronces et vigne (Decognet *et al.*, 2007). De plus, en compilant les résultats issus de ce travail et ceux obtenus précédemment par l'équipe de mycologie de l'INRA d'Avignon, il apparaît que les niveaux d'agressivité des souches de *B. cinerea* dont l'hôte d'origine est la tomate sont les plus agressives une fois inoculées sur plantes de tomate (tab. 9). Les souches issues de plantes de tomate seraient donc mieux adaptées que les autres pour infecter cet hôte. Les souches provenant de substrats non agricoles s'avèrent également significativement plus agressives sur plantes de tomate que celles échantillonnées sur vigne. De plus, ces souches présentent un niveau moyen d'agressivité équivalent à la moyenne d'agressivité de l'ensemble des 229 souches testées (la proche de 50%). Cela suggère que ces souches collectées essentiellement dans l'air et dans des précipitations (pluie, neige) sont probablement issues d'une population de spores d'origines très diverses (hôtes et substrats différents). Des études de phylogénie moléculaire sont en cours au laboratoire pour déterminer le niveau de ressemblance génétique entre ces souches et celles isolées à partir de plantes.

Toutefois notre étude ne permet pas de conclure définitivement concernant l'existence ou non d'une préférence d'hôte selon l'origine des souches ; d'autres études doivent être menées, en considérant un plus large échantillon de souches provenant d'un même habitat avec des tests d'inoculation sur d'autres plantes que la tomate.

Conclusion et perspectives

Au cours de ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été réalisés pour la recherche d'agents de lutte biologique contre les agents phytopathogènes. De nombreuses études sont menées sur les facteurs d'efficacité de ces agents de lutte biologique et pour la compréhension de leurs modes d'action. Cependant, les études concernant la durabilité de cette méthode de lutte sont très rares.

L'étude présentée ici a permis de mettre en évidence une importante diversité de sensibilité aux agents de lutte biologiques *Microdochium dimerum*, qui agit par compétition nutritive, et *Bacillus subtilis* (Serenade® Max), qui agit selon un mode d'action complexe, incluant l'induction des mécanismes de défense de la plante hôte, parmi respectivement 41 et 20 souches de *B. cinerea*. Cette diversité de sensibilité pourrait être un facteur clé de l'érosion de l'efficacité de la protection biologique, puisqu'elle suggère l'existence d'isolats naturellement moins sensibles à ces agents de lutte biologique dans les populations de l'agent pathogène.

Les niveaux d'agressivité très variables des souches de *B. cinerea* pourraient expliquer la différence de sensibilité de ces souches à *M. dimerum*. En effet, plus une souche est agressive, et plus elle serait capable d'utiliser efficacement les nutriments du milieu, et donc moins elle serait affectée par la présence d'un agent de lutte compétiteur. En outre, le niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea* ne permet pas d'expliquer leur différence de sensibilité au produit Serenade® Max suggérant que les mécanismes de résistance de *B. cinerea* aux agents de lutte biologique sont différents selon les modes d'action que ces derniers mettent en place contre l'agent pathogène.

Les recherches sur ces deux agents de lutte biologiques doivent se poursuivre afin d'évaluer si des souches de *B. cinerea* sont capables de devenir moins sensibles sous pression de sélection, c'est-à-dire en condition de stress nutritif ou en présence des molécules d'induction de défense. En effet la capacité de *B. cinerea* à produire sous pression de sélection des mutants résistants est un autre facteur clé de l'érosion de l'efficacité de la protection biologique. Il faudrait également étudier si le développement chez *B. cinerea* d'une moindre sensibilité à ces agents de lutte biologique est associé à une perte de fitness des souches de l'agent pathogène, ce qui limiterait l'érosion de l'efficacité de cette méthode de lutte. Remarquons que l'application de *M. dimerum* à 10^7 spores/ml permet un contrôle relativement efficace des souches de *B. cinerea*, avec des taux de protection compris entre 60 et 100% pour la majorité des souches. Cette dose prévue pour l'homologation du produit AntiBot (Agrauxine) serait donc efficace contre la majorité des souches de *B. cinerea* et semble cohérente puisque la majorité des études effectuées avec des microorganismes comme agents de lutte biologique, et pour lesquelles une inoculation artificielle de *B. cinerea* a lieu, prévoit une dose de 10 à 1000 fois plus concentrée des microorganismes antagonistes (Fruit, 2001). Cependant l'inhibition de la sporulation n'est que rarement de 100%, même pour des souches bien contrôlées, ce qui pose d'importants problèmes d'épidémiologie car à partir du moment où une souche va sporuler, un inoculum est constitué en vue d'une future infection. On peut craindre que les spores ainsi produites sous pression de sélection soient plus résistantes aux agents de lutte biologique. Une telle acquisition de résistance a été étudiée par Ajouz *et al.* (2010), qui montrent que *B. cinerea* est capable d'acquérir une résistance à un antibiotique produit par un agent de lutte biologique au cours de générations successives obtenues sous pression de sélection. Des travaux doivent être menés afin d'étudier la capacité de *B. cinerea* à devenir résistant à des agents de lutte biologique, agissant par d'autres modes d'action que l'antibiose, au cours de générations successives produites sous pression de sélection. Par exemple, des générations successives de *B. cinerea* pourraient être réalisées *in vitro* sur un milieu appauvri en nutriments afin de mimer la pression de sélection qu'exercerait un agent de lutte biologique agissant par compétition nutritive. Ces études, couplées à la compréhension des modes d'action des agents de lutte biologique, devraient permettre de limiter l'apparition et le

maintien, dans les populations naturelles d'agents pathogènes, de souches responsables de la perte d'efficacité de la protection biologique, et ainsi améliorer la durabilité de cette méthode de lutte.

Cette étude révèle l'importance d'une bonne représentation de la population de l'agent pathogène, avec des isolats de sensibilité variable, lors de la recherche d'agents de lutte biologique. La prise en compte de cette diversité de sensibilité lors des étapes de *screening* et l'estimation du risque de perte d'efficacité devraient permettre d'améliorer le choix des agents de lutte biologique pour une meilleure durabilité de cette méthode de lutte. L'établissement d'une ligne de base de sensibilité permettra en particulier de suivre dans le temps l'évolution de l'émergence de souches moins sensibles au champ.

Références bibliographiques

- Agrios, G.N.** 2005. Plant Pathology, fifth edition. Elsevier Academic Press, 922 p.
- Ajouz, S.** 2009. Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. PhD. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, France, 198 p.
- Ajouz, S., Nicot, P.C., and Bardin, M.** 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology* **59**: 556-566.
- Ajouz, S., Walker, A.S., Fabre, F., Leroux, P., Nicot, P.C., and Bardin, M.** 2011. Variability of *Botrytis cinerea* sensitivity to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. *Biocontrol* **56**: 353-363.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., and Steinberg, C.** 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* **184**: 529-544.
- Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K.E., Gund, N.A., Reineke, A., Zebitz, C.P.W., Heckel, D.G., Huber, J., and Jehle, J.A.** 2007. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* **317**: 1916-1918.
- Bardin, M., Schmitt, A. and Nict, P.C.** 2011. Diversity in the effect of an extract from *Fallopia sachalinensis* on isolates of cucurbit powdery mildews grown on melon. OILB, sous presse.
- Bautista-Banos, S., Hernandez-Lauzardo, A.N., Velazquez-del Valle, M.G., Hernandez-Lopez, M., Barka, E.A., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L.** 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* **25**: 108-118.
- Beever, R., and Weeds, P.** 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*, p. 29-52, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Belanger, R.R., Bowen, P.A., Ehret, D.L., and Menzies, J.G.** 1995. Soluble silicon Its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* **79**: 329-336.
- Belanger, R.R., and Deacon, J.W.** 1996. Interaction specificity of the biocontrol agent *Sporothrix flocculosa*: a video microscopy study. *Phytopathology* **86**: 1317-1323.
- Bell, J.A., and Wheeler, M.H.** 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 411-51
- Benyagoub, M., Rhlid, R.B., and Belanger, R.R.** 1996. Purification and characterization of new fatty acids with antibiotic activity produced by *Sporothrix flocculosa*. *Journal of Chemical Ecology* **22**: 405-413.
- Berling, M., Blachere-Lopez, C., Soubabere, O., Lery, X., Bonhomme, A., Sauphanor, B., and Lopez-Ferber, M.** 2009. *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 925-930.
- Blakeman, J.P.** 1975. Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Transactions of the British Mycological Society* **65**: 239-247.
- Blakeman, J.P.** 1980. Behaviour of conidia on aerial plant surfaces, p. 115-151, in: *The Biology of Botrytis*. J. R. Coley-smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London.
- Brodie, I.D.S., and Blakeman, J.P.** 1975. Competition for carbon compounds by a leaf surface bacterium and conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* **6**: 125-135.
- Buck, J.W., and Jeffers, S.N.** 2004. Effect of pathogen aggressiveness and vinclozolin on efficacy of *Rhodotorula glutinis* PM4 against *Botrytis cinerea* on geranium leaf disks and seedlings. *Plant Disease* **88**: 1262-1268.
- Bunster, L., Fokkema, N.J., and Schippers, B.** 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1340-1345.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M.S.** 2004. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 693-703.
- Cowen, L.E.** 2001. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. *FEMS Microbiology Letters* **204**: 1-7.
- Crowe, J.D., and Olsson, S.** 2001. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and*

Environmental Microbiology **67**: 2088-2094.

Daayf, F., Schmitt, A., and Belanger, R.R. 1995. The effects of plant-extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long english cucumber. Plant Disease **79**: 577-580.

De Souza, J.T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi-Pearson, V., and Raaijmakers, J.M. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. Phytopathology **93**: 966-975.

De Waard, M.A., Andrade, A.C., Hayashi, K., Schoonbeek, H.J., Stergiopoulos, I., and Zwieters, L.-H. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Pest Management Science **62**: 195-207.

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

Decognet, V., Bardin, M., Walker, A.S., Fermaud, M., and Nicot, P. 2007. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from vegetable greenhouses in France, pp. 35. 14th International *Botrytis* Symposium, Cape Town, South Africa, 2007/10/21-26.

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

Del Sorbo, G., Schoonbeek, H.J., and De Waard, M.A. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genetics and Biology **30**: 1-15.

Denny, T.P., Matthews, P.S., and Etten, H.D.v. 1987. A possible mechanism of nondegradative tolerance of pisatin in *Nectria haematococca* MP VI. Physiological and Molecular Plant Pathology **30**: 93-107.

Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology **41**: 501-538.

Edwards, S.G., and Seddon, B. 1992. *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage, in: Recent advances in *Botrytis* research. Proceedings of the 10th International *Botrytis* symposium, Heraklion, Crete, Greece, 5-10 April 1992.

Edwards, S.G., and Seddon, B. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. Journal of Applied Microbiology **91**: 652-659.

Elad, Y., and Stewart, A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp, p. 223-41, in: *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

Farr, D., Bills, G.F., Chamuris, G.P., and Rossman, A.Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St Paul, USA, 1252 p.

Fedi, S., Tola, E., Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., Smith, L.M., and O'Gara, F. 1997. Evidence for signalling between the phytopathogenic fungus *Pythium ultimum* and *Pseudomonas fluorescens* F113: *P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. Applied and Environmental Microbiology **63**: 4261-4266.

Fleissner, A., Sopalla, C., and Weltring, K.M. 2002. An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. Molecular Plant-Microbe Interactions **15**: 102-108.

Fournier, E., and Giraud, T. 2008. Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. Journal of Evolutionary Biology **21**: 122-132.

Fruit, L. 2001. Etude des facteurs d'efficacité d'un agent de lutte biologique (*Ulocladium atrum*) pour la protection des plaies d'effeuillage sur tomate contre *Botrytis cinerea*. Claude Bernard-Lyon 1, Lyon (France), 123 p.

Govrin, E.M., and Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology **10**: 751-757.

Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D., and Dinooor, A. 2002. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. Biocontrol Science and Technology **12**: 976-985.

- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinooor, A.** 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* **91**: 621-627.
- Gurusiddaiah, S., Weller, D.M., Sarkar, A., and Cook, R.J.** 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29**: 488-495.
- Handelsman, J., and Stabb, E.V.** 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell* **8**: 1855-1869.
- Harish, S., Manjula, K., and Podile, A.R.** 1998. *Fusarium udum* is resistant to the mycolytic activity of a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Fems Microbiology Ecology* **25**: 385-390.
- Hashioka, Y., and Nakai, Y.** 1980. Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on Erysiphales. *Transactions Of The Mycological Society Of Japan* **21**: 329-338.
- Holz, G., Coertze, S., and Williamson, B.** 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, p. 9-27, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Jacobsen, B.J.** 2006. Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents, p. 133-147, in: *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. M. J. Bailey, A. K. Lilley, T. M. Timms-Wilson and P. T. N. Spencer-Phillips, eds. Athenaem Press, Gateshead, UK.
- Janisiewicz, W., Yourman, L., Roitman, J., and Mahoney, N.** 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease* **75**: 490-494.
- Jarvis, W.R.** 1992. *Managing diseases in greenhouse crops*. American Phytopathological Society, St Paul, MN, 288 p.
- Kapat, A., Zimand, G., and Elad, Y.** 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 127-137.
- Kohl, J., Molhoek, W.M.L., Plas, C.H.v.d., and Fokkema, N.J.** 1995. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* **85**: 393-401.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.J., Pradier, J.M., Leroux, P., De Waard, M.A., and Hahn, M.** 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Plos Pathogens* **5**: 1-13.
- Ladvie, P.** 2003. Etude des mécanismes d'action de *Microdochium dimerum*, agent de lutte biologique contre *Botrytis cinerea* sur tomate. Rapport de stage. INRA Avignon, Pathologie Végétale. 12 p.
- Leroux, P.** 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, p. 195-222, in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Levasseur, M., Tombu, B., and Zambaux, C.** 2005. Biological fungicide against vine *Botrytis*. *Phytoma*: 52-53.
- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., and Hochman, A.** 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **40**: 163-171.
- Li, H., and Leifert, C.** 1994. Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101**: 414-418.
- Lutz, M.P., Feichtinger, G., Defago, G., and Duffy, B.** 2003. Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3077-3084.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., and Fermaud, M.** 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 479-488.
- Mazzola, M., and Cook, R.J.** 1991. Effects of fungal root pathogens on the population dynamics of biocontrol strains of Fluorescent *Pseudomonads* in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2171-2178.
- Mazzola, M., Fujimoto, D.K., Thomashow, L.S., and Cook, R.J.** 1995. Variation in sensitivity of

- Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 2554-2559.
- McDonald, B.A., and Linde, C.** 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-379.
- McGaughey, W.H.** 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-195.
- McGaughey, W.H.** 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-195.
- Miller, J.S., Johnson, D.A., and Hamm, P.B.** 1998. Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology* **88**: 190-197.
- Milner, J.L., SiloSuh, L., Lee, J.C., He, H.Y., Clardy, J., and Handelsman, J.** 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3061-3065.
- Nicot, P.C., and Baille, A.** 1996. Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in: *Aerial plant surface microbiology*. C. E. Morris, P. C. Nicot and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New-York.
- Nicot, P.C., Bardin, M., Alabouvette, C., Köhl, J., and Ruocco, M.** 2011. Potential of biological control based on published research. 1. Protection against plant pathogens on selected crops. p. 1-11, in: *Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors influencing their success*. P. Nicot, ed. IOBC/WPRS.
- Nicot, P.C., Decognet, V., Fruit, L., Bardin, M., and Trottin, Y.** 2002. Combined effect of microclimate and dose of application on the efficacy of biocontrol agents for the protection of pruning wounds on tomatoes against *Botrytis cinerea*. *Bulletin OILB/SROP* **25**: 73-76.
- Nicot, P.C., Morison, N., and Decognet, V.** 1996. Protection of pruning wounds on greenhouse tomatoes by saprophytic microorganisms against infection by *Botrytis cinerea*, pp. 70. XIth International Botrytis Symposium, Wageningen, The Netherlands.
- Nicot, P.C., Morison, N., and Mermier, M.** 2001. Optical filters against grey mould of greenhouse crops, p. 134-145, in: *Physical Control Methods in Plant Protection*. C. Vincent, B. Panneton and F. Fleurat-Lessard, eds. Springer Verlag, Paris.
- Notz, R., Maurhofer, M., Dubach, H., Haas, D., and Defago, G.** 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2229-2235.
- Osbourn, A.E.** 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Paulitz, T.C., and Belanger, R.R.** 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 103-133.
- Prins, T.** 2001. Identification and functional analysis of *Botrytis cinerea* genes induced during infection of tomato. PhD. Wageningen University, Wageningen, 114 p.
- Quidde, T., Osbourn, A.E., and Tudzynski, P.** 1998. Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 151-165.
- Randoux, B., Renard, D., Nowak, E., Sanssene, J., Courtois, J., Durand, R., and Reignault, P.** 2006. Inhibition of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* germination and partial enhancement of wheat defenses by Milsana. *Phytopathology* **96**: 1278-1286.
- Sanchis, V., and Bourguet, D.** 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **28**: 11-20.
- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., and de Tosetti, M.I.S.** 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology* **35**: 245-251.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R., and Leroux, P.** 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology* **45**: 139-144.
- Schoonbeek, H., del Sorbo, G., and de Waard, M.A.** 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 562-571.

- Schoonbeek, H., Raaijmakers, J.M., and De Waard, M.A.** 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1165-1172.
- Schoonbeek, H.J., Jacquat-Bovet, A.C., Mascher, F., and Mettraux, J.P.** 2007. Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1535-1544.
- Schoustra, S.E., Slakhorst, M., Debets, A.J.M., and Hoekstra, R.F.** 2005. Comparing artificial and natural selection in rate of adaptation to genetic stress in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 771-778.
- Schouten, A., Berg, G.v.d., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C., Vos, C.H.d., Lemanceau, P., and Raaijmakers, J.M.** 2004. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1201-1211.
- Schouten, A., Maksimova, O., Cuesta-Arenas, Y., van den Berg, G., and Raaijmakers, J.M.** 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* **10**: 1145-1157.
- Segarra, G., Casanova, E., Aviles, M., and Trillas, I.** 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* **59**: 141-149.
- Stockwell, V.O., Kawalek, M.D., L.W., M., and J.E., L.** 1996. Transfer of pAgK84 from the biocontrol agent *Agrobacterium radiobacter* K84 to under field conditions. *Phytopathology* **86**: 31-37.
- Swadling, I.R., and Jeffries, P.** 1998. Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. *Biocontrol Science and Technology* **8**: 439-448.
- Tabashnik, B.E.** 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* **39**: 47-79.
- Tiedemann, A.** 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**: 151-166.
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W., and Thomma, B.** 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *Fems Microbiology Reviews* **31**: 239-277.
- Wang, J., Haddad, N.I.A., Yang, S., and Mu, B.** 2010. Structural characterization of lipopeptides from *Brevibacillus brevis* HOB1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**: 812-821.
- Whalen, M.C.** 2005. Host defence in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* **6**: 347-360.
- Whipps, J.M., and Gerlagh, M.** 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research* **96**: 897-907.
- Yang, X.J., Yang, L.J., Zeng, F.S., Xiang, L.B., Wang, S.N., Yu, D.Z., and Ni, H.** 2008. Distribution of baseline sensitivities to natural product physon among isolates of *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Disease* **92**: 1451-1455.
- Yu, H., and Sutton, J.C.** 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19** : 237-246.

Sitographie

- US Environmental Protection Agency** (page consultée le 10/06/2011). Biopesticides Current New Active Ingredient Applications.
http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/regtools/biopesticides_2011_workplan.html
- EU Pesticides Database** (page consultée le 10/06/2011). Active Substances.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection
- Ministère de l'Agriculture et de la pêche** (page consultée le 10/06/2011). E-phy.
<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

Annexe J : Nouvelles substances actives homologuées aux USA contre des agents phytopathogènes, par année entre 2006 et 2011 (d'après US Environmental Protection Agency).

Type: N = Nematicide, B = Bactericide, F = Fungicide, V = Virucide, PGR = Plant Growth Regulator.

2011: 11 substances actives homologuées

Active Ingredient	Type	Uses	Mode of action	Registrant
<i>Aureobasidium pullulans</i> strain DSM 14940	F	Citrus, pome fruits, sugarcane, greenway and trail lands		Bio Ferm GmbH
<i>Aureobasidium pullulans</i> strain DSM 14941	F	Citrus, pome fruits, sugarcane, greenway and trail lands		Bio Ferm GmbH
<i>Bacillus subtilis</i> strain CX-9060	F / B	Food crops, turf and ornamental	Competition for nutrients, growth sites on plants, colonization and attachment to pathogens	Certis
<i>Bacillus pumilis</i> strain GHA 181	F	Food crops, seeds, ground cover, and ornamentals	Systemic acquired resistance ?	Premier Horticulture
<i>Bacillus subtilis</i> var. amyloliquefaciens strain D747	F	Various food crops, turf and ornamental	Growth enhancer and disease suppressor through an enzyme that it produces	Certis
Natamycin	F	Mushrooms		DSM Food Specialties
<i>Pasteuria nishizawae</i> strain PN-1	N	Soybean		Pasteuria Bioscience
<i>Pasteuria reneformis</i> strain Pr-3	N	Various food and non-food crops	Endospores attach to and infect the host nematode	Pasteuria Bioscience
<i>Trichoderma asperellum</i> strain T34	F	Greenhouses (non-food)	Competition, parasitism, systemic acquired resistance	Biocontrol Technologies
<i>Typhula phacorrhiza</i> strain 94671	F	Turf (golf course)	Competition for living space and nutrients	Agrium Advanced Technologies
<i>Trichoderma virens</i> strain G41	F	Seeds, transplant crops, turf and ornamental		BioWorks

2010: 9 substances actives homologues

Active Ingredient	Type	Uses	Mode of action	Registrant
Bacteriophage of <i>Clavibacter michiganensis</i>	B	Tomato		Omnilytics, Inc.
Laminarin	Systemic Acquired Response inducer	Food crops	Systemic acquired resistance	Lab Goemar 83941-2
Plum Pox VCP	V	Plum		USDA/ARS
Tea Tree oil	F	Food crops		Tech Sci Group (Biomor Israel)
<i>Trichoderma asperellum</i>	F	Fruit, vegetables, ornamentals	Competition, parasitism, systemic acquired resistance	Isagro S.P.A
<i>Trichoderma gamsii</i>	F	Fruit, vegetables, ornamentals	Competition, parasitism, systemic acquired resistance	Isagro S.P.A
<i>Trichoderma hamatum</i> strain TH 382	F	Food crops & ornamentals		Sellew
<i>Typhula phacorrhiza</i> strain 94671	B	Turfgrass		Agrium Advanced Technologies
<i>Ulocladium oudemansii</i>	F	Fruit, vegetables, ornamentals		Botry-Zen

2009: 9 substances actives homologues

Active ingredient	Type	Uses	Mode of action	Registrant
<i>Candida oleophila</i> strain O	F	Apples and pears	Competition for nutrients, pre-colonization of plant wound sites and hydrolytic enzymes production	BioNext
Chitosan hydrolysate	B / F	Food crops, ornamentals, turf		Morse Enterprises
Oriental Mustard Seed	N	Turf		Nematrol
<i>Pasteuria usagae</i>	N	Manufacturing use products	Endospores attach to and infect the host nematode	Pasteuria Bioscience
Plum Pox VCP	V	Prunus species		USDA/ARS
Salicylic Acid	B / F	Food crops, ornamentals, turf		Morse Enterprises
<i>Trichoderma asperellum</i>	F	Manufacturing use products	Competition for space and nutrients and enzymes degrading cell walls production	Isagro S.P.A

<i>Trichoderma gamsii</i>	F	Manufacturing use products	Competition for space and nutrients	Isagro S.P.A.
<i>Trichoderma harzianum</i> strain TH 382	F	Food crops & ornamentals	Competition for space and nutrients	Sellew

2008: 2 substances actives homologuées

Active ingredient	Type	Uses	Mode of action	Registrant
<i>Bacillus firmus</i> strain 1582	N & PGR	Food crops & ornamentals		Agrogreen
<i>Trichoderma harizatum</i> strain TH 382	F	Food crops & ornamentals		Sellew

2007: 6 substances actives homologuées

Active ingredient	Type	Uses	Mode of action	Registrant
Avirulent zucchini yellow mosaic virus	F	Cucurbits		Bio-Oz Biotechnologies Ltd
Chitosan	B / F	Food crops, ornamentals, turf		Morse Enterprises
Potassium dihydrogen phosphate	F	Apples, grapes, cucumbers, melons, summer & winter squashes, watermelons, mangoes, peaches, nectarines, plums, cherries, peppers, tomatoes, roses		Cal Agri
<i>Pythium ologandrum</i> strain DV74	F	Food crops & ornamentals	Hyperparasitism	Biopreparatory Co. Ltd.
Quillaja extract	N / F	Grapes, citrus, pome fruits, stone fruits, nut crops, avocados, vegetable crops, and ornamentals		Desert King
Salicylic Acid	B / F	Food crops, ornamentals, turf		Morse Enterprises

2006: 9 substances actives homologuées

Active ingredient	Type	Uses	Mode of action	Registrant
Bacteriophages	B	Tomatoes & peppers	Killing bacteria by rupturing cell walls	Omni Lytics
Oceanic (chlorite) clay	F and PG R	Food Crops		Ironwood Clay
Oriental Mustard Seed	N	Turf		Nematrol
<i>Pantoea agglomerans</i> strain c91	F	Apple trees and pear trees (against fire blight)	Competition	NuFarm
<i>Pantoea agglomerans</i> strain D325	F	Apple trees and pear trees (against fire blight)	Competition	Northwest Ag Products
Potassium silicate	F / I	Food crops Ornamentals		PQ Corporation
<i>Pythium oligandrum</i> strain DV74	F	Food crops & ornamentals	Parasitism	Biopreparatory Co. Ltd.
Salicylic Acid	F	Food Crops		Stoller
<i>Verticillium dahliae</i>	F	Elm Trees	Systemic acquired resistance	Arcadis

Annexe II : Tableau récapitulatif des caractéristiques générales des 41 souches de *B. cinerea* utilisées et des plantes hôtes testées pour chacune des souches.

Souche	Substrat/Hôte	Pays	Ville	Année	Plantes hôtes testées			
					Tiges tomate	(N° de série du test)	Feuilles tomate et laitue	Autres espèces végétales (7)
BC1	Tomate	France	Plougastel 29	1989	X	(1-5)	X	X
05A550	Vigne	France	Hautvillers 51	2005	X	(1)	X	
05A587	Vigne	France	Hautvillers 51	2005	X	(1)	X	
05A590	Vigne	France	Hautvillers 51	2005	X	(1)	X	X
SAS56 ¹	Rose	Italie	-	1987	X	(1)	X	X
BC21	Fraise	France	Carpentras 84	1991	X	(2)	X	X
BC25	Tomate	France	Versailles 78	1991	X	(2)	X	X
BC26	Tomate	France	Versailles 78	1991	X	(2)	X	X
H6	Tomate	France	Berre 13	1991	X	(2)	X	X
B05-10 ²	Souche monoascospore dérivée de SAS56			-	X	(2)	X	X
T4 ³	Tomate	France	-	-	X	(2)		X
NHPM9	Primula	France	La Clusaz 74	2008	X	(2)	X	
SAS405 ¹	Vigne	Italie	-	1987	X	(2)	X	X
NHPL2	Précipitation	France	Chateaufrenard 13	2006	X	(2)	X	
STP12-2	Précipitation	France	St Saturnin 84	2010	X	(3)	X	
CVW17-1	Eau	France	Vars 05	2010	X	(3)	X	
NHPL1	Précipitation	France	Chateaufrenard 13	2006	X	(3)		
CEN12-13	Neige	France	Ceillac 05	2010	X	(3)		
CEN14-1	Neige	France	Ceillac 05	2010	X	(3)		
SZP32-1	Précipitation	France	Sauze 05	2010	X	(3)		
E14	Tomate	France	Eyguieres 13	2003	X	(3)		
E349	Tomate	France	Eyguieres 13	2003	X	(3)		
E258	Tomate	France	Eyguieres 13	2003	X	(3)		
LAW3-2	Eau	France	Lautaret 05	2010	X	(4)		
CVN2-1	Neige	France	Vars 05	2010	X	(4)		
STP8-1	Précipitation	France	St Saturnin 84	2010	X	(4)		
C10	Tomate	France	Isle sur Sorgues 84	2003	X	(4)		
06C7	Vigne	France	Hautvillers 51	2006	X	(4)	X	
06C12	Vigne	France	Hautvillers 51	2006	X	(4)		
06C111	Vigne	France	Hautvillers 51	2006	X	(4)		
06C163	Vigne	France	Hautvillers 51	2006	X	(4)	X	
06C278	Vigne	France	Hautvillers 51	2006	X	(4)	X	
BC55	Vigne	France	Menerbes 84	1993	X	(5)	X	
BC73	Cerise	France	Montfavet 84	1994	X	(5)		
BC75	Fraise	France	Monteux 84	1995	X	(5)		
BC77	Poinsettia	Italie	Albenga	1995	X	(5)		
BC82	Gerbera	France	Frejus 06	1995	X	(5)		
BC83	Rose	France	Cadenet 84	1996	X	(5)		
BC96	Hortensia	France	Angers 49	1998	X	(5)		
BC100	Tomate	Syrie	Lattaquié	2006	X	(5)		
E2	Tomate	France	Eyguieres 13	2003	X	(5)		

¹ Faretra, F., and Antonacci, E. 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopath. medit* **26**: 29-35.

² Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., Tudzynski, P. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea* : implications for genetic and molecular analyses. *Current. Genet* **25**: 445-450.

³ Amselem, J., Cuomo, C.A., Van Kan, J.A.L., et al. 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plos Genetics*, **7**: 1-27.



Centre d'Angers

Institut National d'Horticulture et du paysage

Spécialité : Horticulture **Option :** GDV

Enseignants responsables de l'option : J.C Michel et S. Poussier

Tuteur : S. Godet

Auteur : Morgane Comby

Organisme d'accueil : INRA d'Avignon, Unité de Pathologie Végétale.

Adresse : Domaine Saint Maurice, 84143 Montfavet

Nb pages : 44

Annexes : 2

Maître de stage : M. Bardin

Année de soutenance : 2011

Titre : Relation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de la protection biologique conférée par deux agents de lutte biologique.

Résumé : Les méthodes de lutte actuelles contre l'agent responsable de la pourriture grise, *Botrytis cinerea*, ne suffisent pas à garantir une protection totale contre ce champignon pathogène, capable de développer des résistances à de nombreux fongicides. Dans ce contexte, la protection biologique semble prometteuse mais la durabilité de cette méthode de lutte a été très peu étudiée. La perte d'efficacité des agents de lutte biologique pourrait résulter de la préexistence d'isolats moins sensibles de l'agent pathogène dans les populations naturelles. L'objectif principal de ce travail est d'étudier la relation entre l'agressivité de 41 souches de *B. cinerea* et leur sensibilité à *Microdochium dimerum*. Le lien entre la sensibilité de *B. cinerea* aux deux agents de lutte biologique *M. dimerum* et *Bacillus subtilis* est également étudié. Des tests d'agressivité de *B. cinerea* et d'efficacité des agents de lutte biologique ont été menés, notamment sur plantes et feuilles de tomate et sur feuilles de laitue. Les résultats ont mis en évidence une large gamme d'agressivité des souches de *B. cinerea*, ainsi qu'une grande différence de sensibilité de ces souches aux deux agents de lutte biologique. La sensibilité des souches de *B. cinerea* à *M. dimerum* est liée à leur niveau d'agressivité, mais ce n'est pas le cas de leur sensibilité à *B. subtilis*. De plus, aucune relation n'a pu être établie entre les niveaux de sensibilité de *B. cinerea* à ces deux agents de lutte biologique. Cette étude montre qu'il existe une différence de sensibilité à des agents de lutte biologique agissant selon différents modes d'action dans une population d'isolats d'un agent pathogène. Cela suggère l'importance d'une bonne représentation de la population de l'agent pathogène lors de la recherche d'agents de lutte biologique afin d'augmenter la durabilité de cette méthode de lutte.

Abstract: Actual crop protection efficacy against *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mold, is limited and some isolates are able to build resistance against many fungicides. In this context, biological control is promising but the durability of this method has been barely studied. The loss of biocontrol efficacy could be due to the existence of less sensitive isolates in natural populations of this pathogen. The main objective of this work is to study the relationship between the aggressiveness of 41 strains of *B. cinerea* and their sensitivity to *Microdochium dimerum*. The correlation between the sensitivity of *B. cinerea* to two biocontrol agents *M. dimerum* and *Bacillus subtilis* is also studied. Tests were conducted mainly on tomato plants and tomato and lettuce leaves to study the aggressiveness of *B. cinerea* and the efficacy of biocontrol agents to control this pathogen. The results reveal a wide range of aggressiveness among strains of *B. cinerea* and the existence of diverse levels of sensitivity to these two biocontrol agents. The sensitivity of strains of *B. cinerea* to *M. dimerum* is correlated with their aggressiveness, but no correlation is observed between aggressiveness and sensitivity to *B. subtilis*. Moreover, no correlation was observed between levels of sensitivity of *B. cinerea* to these two biocontrol agents. This study shows differences in sensitivity to biocontrol agents having different modes of action among several strains of a plant pathogen. It reveals the importance of considering several isolates when screening for biocontrol agents to obtain a good representation of the pathogen population and thus increase the durability of the biological control.

Mots-clés : *Botrytis cinerea*, protection biologique, efficacité, durabilité, gamme de sensibilité, *Microdochium dimerum*, *Bacillus subtilis*, Serenade® Max, compétition nutritive, induction des défenses de la plante.

Key-words: *Botrytis cinerea*, biological control, efficacy, durability, sensitivity baseline, *Microdochium dimerum*, *Bacillus subtilis*, Serenade® Max, nutritional competition, induction of plant defences.