

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Effet des sels et des bactéries contre la moniliose des fruits en post-récolte

Présenté par : MTALAI Salma

Encadré par : Pr.AMRANI JOUTEI Khalid

Pr.LAHLALI Rachid

Soutenu le : 12 juin 2019

Devant le jury composé de :

Pr.AMRANI JOUTEI Khalid : Encadrant (FST FES)

Pr.AL FIGUIGUI Jamila : Examinatrice (FST FES)

Pr.LAHLALI Rachid : Encadrant (ENAM)

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes très chers parents : Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance.

C'est avec beaucoup de fierté que je vous dédie ce travail, et qui n'est en réalité que le fruit de l'aide d'ALLAH et de vos efforts, en témoignage de mon profond amour Puisse DIEU vous protéger et procurer bonne santé et longue vie.

À mes chers frères : Mohammed et Salim

À mes chères sœurs : Safae et Fadwa

À ma nièce : Douae

À toute ma famille

À mes chères amies

À tous ceux qui me sont chers

À tous ceux qui comptent pour moi

REMERCIEMENTS

Le présent mémoire est le fruit de la collaboration entre l'école d'agriculture de Mekès et la Faculté des Sciences et Technique Fès. Cette étude couronne mes études de la licence à la Faculté des Sciences et Techniques Fès.

Au terme de ce travail, je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, l'aide pour finir ce travail.

Je tiens à remercier M.AMRANI JOUTEI Khalid, professeur et coordonnateur de la Licence Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources à FST Fès, pour son encadrement, ses conseils précieux, ainsi que pour sa sympathie et sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail.

Je tiens à remercier également Mr.LAHLALI Rachid Enseignant Chercheur au département de la Protection des Plantes et de l'environnement, unité phytopathologie à l'ENAM pour son soutien technique et son encadrement durant toute la période nécessaire pour la réalisation de cette étude, et à l'ensemble du personnel de l'ENAM pour leur collaboration et leur accueil.

Je tiens à transmettre mes sincères remerciements à l'doctorante LYOUSFI Nadia, pour tout l'aide, et ses conseils qu'ils m'ont apportés pendant le stage.

Un grand merci à Mme Figuigui Jamila qui me fait l'honneur d'assister et de bien vouloir juger mon Projet de Fin d'Etudes.

Mes vifs remerciements s'adressent également à M.Mohammed Tayssire qui m'a beaucoup aidé pour réaliser ce travail.

Enfin je suis redevable à toutes les personnes ayant contribué à l'élaboration de ce travail.

RESUME

Les maladies post-récolte des fruits causées par *Monilina* peuvent être à l'origine des pertes de plusieurs arbres fruitiers. La lutte chimique est la méthode la plus courante pour lutter contre ces maladies. Cependant l'utilisation des fongicides synthétiques provoque l'apparition des souches résistantes et une contamination de l'environnement. Pour cela, et comme alternative à la lutte chimique nous sommes orientés dans notre étude sur l'examen des moyens de lutte biologique tels que l'utilisation des sels et des bactéries.

Dans ce but nous avons concentré notre étude sur l'évaluation de l'efficacité de dix-sept sels organiques et inorganiques et aussi l'évaluation de l'effet de quatre souches de bactéries sur la moniliose causée par *Monilia Laxa* et *Monilia Fructigena*

Les résultats du screening de ces sels sur la croissance mycélienne ont montré qu'il existe parmi eux quinze qui sont plus efficaces : le carbonate de sodium/sulfate manganèse/chlorure de sodium/sodium sulfate anhydre/potassium dihydrogène phosphate/carbonate de potassium/ammonium molybdate/ammonium sulfate/acétate de sodium/magnésium chlorure/hydroxyde de potassium/bicarbonate de sodium/sulfate de cuivre/chlorure de sodium/hydroxyde de sodium/sodium phospho dibasique.

Les essais in vitro de la confrontation entre les quatre types de bactéries testés et les champignons ont montré une forte activité antagoniste notamment à une concentration de 10^8

Mots clés : *Monilia Laxa*, *Monilia Fructigena*, lutte biologique, sels, bactéries.

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau 1 : Taxonomie de *Monilia* spp

Tableau 2: Composition du milieu PDA

Tableau 3 : Types des bactéries utilisées dans le test

Figure 1 : a; *monilia laxa*, b; *monilia fructigena*

Figure 2: Cycle de *monilia* spp

Figure 3: A- milieu PDA ; B- acide acétique ; C- chloramphénicol ; D- streptomycine

Figure 4 : Procédure de l'étude de l'effet des sels sur la croissance mycélienne de la moniliose.

Figure 5: Mesure de diamètre du pathogène par un pied à coulisse

Figure 6 : Etapes de l'inoculation artificielle du fruit par *Monilia Laxa* et *Monilia Fructigena* .

Figure 7 : Boîtes de plastique stériles utilisées pour l'incubation du fruit

Figure 8 : a-Ajout de EDS dans la boîte de pétri ,b-grattage de la culture pure ,c-récupération de la solution sporale dans un tube ,d-Agitation dans le vortex , e-préparation du lame microscopique

Figure 9 : Procédure de l'étude d'effet des antagonistes sur la croissance mycélienne.

Figure 10 : Effet du sulfate de cuivre in vitro sur la croissance du *Monilia laxa* et *Fructigena*

Figure 11: Effet de carbonate de sodium in vitro sur la croissance du *Monilia laxa* et *Fructigena*

Figure12: Effet de l'acide citrique in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 13: Effet de sulfate du manganèse in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 14 : l'effet de magnesium de sulfate sur MF pour 5%

Figure15:Effet de l'acide salicylique in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Figure 16:Effet de chlorure de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Figure 17:Effet d'hydroxyde de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Figure18 :Effet de sodium sulfate anhydre in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Figure 19: Effet de Sulfate sodium anhydre (0.5%)sur la croissance de M.L

Figure 20:Effet de potassium dihydrogène phosphate sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 21:Effet de sodium phospho dibasique sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 22:Effet de carbonate de potassium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 23:Effet d'ammonium molybdate in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 24:Effet d'Ammonium sulfate in vitro sur la croissance de *Monilia laxa* et *Fructigena*

Figure 25: Effet d'acetate de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 26 :Effet d'Ammonium sulfate in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 27 : Effet d'hydroxyde de potassium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 28 : Effet de bicarbonate de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Figure 29: Observation microscopique(x40) de la structure mycélienne de *Monilia Laxa*

Figure 30: effet des quatre bactéries sur les pathogènes (10^6)

Figure 31: a-ML/MF en présence de SP10 ,b-ML/MF en présence de SF14 ,c-ML/MF en présence de ACBCB1 ,d-ML/MF en contact avec ACBCP1 (10^6)

Figure 32: effet des quatre bactéries sur les pathogènes (10^8)

Figure 33: a-ML/MF en présence de SP10,b-ML en présence de SF14,c-ML/MF en présence de ACBCB1,d-ML/MF en contact avec ACBCP1 (10^8)

Table des matières

INTRODUCTION	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. Généralités.....	2
2. Agents causals.....	2
2.1. Position systématique de <i>Monilia</i> spp	2
2.2. Caractéristiques morphologique de <i>Monilia</i> spp	3
3. Symptômes de la moniliose	3
4. Cyclebiologique et épidémiologique.....	3
5. Méthodes de luttés chimique et biologique contre la moniliose	4
5.1. Méthodes prophylactiques	4
5.2. Lutte chimique	5
5.3. Lutte biologique	5
5.3.1. Principe de la lutte biologique	5
5.3.2. Utilisation des sels.....	5
5.3.3. Agents de contrôle biologique contre <i>Monilia</i> spp.....	5
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	7
1. Matériel biologique	7
2. Préparation des souches	7
3. Screening des sels organiques et inorganiques	8
4.Effet des sels sur la croissance mycélienne	8
5.Effet des sels sur la germination de <i>Monilia Laxa</i> et <i>Fructigena</i>	10
5.1.Repiquage à partir du fruit inoculé par <i>Monilia</i> spp.....	10
5.2.Repiquage du pathogène a partir des fruits.....	11
5.3.Préparation de la solution sporale	11
6.Effet des bactéries sur la croissance mycélienne de <i>Monilia Laxa</i> et <i>Monilia Fructigena</i>	11
PARTIE III : Résultats et Discussion	13
1.Effet de différentes substances sur la coissance du <i>Monilia laxa</i> et <i>Fructigena</i> in vitro	13
2.Effet des sels sur la germination de <i>Monilia Laxa</i> et <i>Fructigena</i> :.....	22
3. Effet des bactéries in vitro sur le développement de <i>Monilia Laxa</i> et <i>Monilia Fructigena</i> ...	23
CONCLUSION ET RECOMMANDATION	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27

Introduction générale

Les pertes post-récolte causées par la moniliose constituent un obstacle majeur à surmonter dans la chaîne d'approvisionnement alimentaire. Certaines lésions fongiques peuvent entraîner une éventuelle contamination par les mycotoxines. En effet les maladies post-récolte limitent la période de stockage et la durée de vie commerciale des fruits. Cette décomposition fongique des fruits et légumes stockés après la récolte limite leur valeur économique.

La pourriture brune est une maladie cryptogamique provoquée par des champignons appartenant au genre *Monilia*, et aussi connue sous le nom de moniliose (Lesik, 2013). C'est une maladie présente sur tous les continents et cause le dessèchement des fleurs et des rameaux ou la pourriture brune des fruits selon les organes qu'elle touche. Cette maladie s'attaque principalement aux arbres produisant des fruits à noyau ou à pépins tels que les pommiers, les poiriers, les cerisiers, les abricotiers, les pêchers (Hrustic et al., 2012). Elle cause des pertes dramatiques, principalement en post-récolte (DE OLIVEIRA LINO, 2016).

Bien que l'utilisation de fongicides synthétiques reste le principal moyen de lutte contre les maladies post-récolte, l'exagération dans l'utilisation de ces fongicides a suscité de plus en plus de problèmes quant à leurs éventuels effets indésirables sur la santé humaine et l'environnement. Par conséquent, des composés plus respectueux de l'environnement et inoffensifs devraient être développées en tant que méthodes alternatives pour les maladies post-récolte. Il est donc essentiel de trouver une autre méthode, telle que le contrôle biologique, pour lutter contre les maladies de post-récolte. En effet des études antérieures ont montré que la lutte biologique, telle que l'application d'un microorganisme antagoniste, ou l'utilisation des sels, des huiles essentiels, et des extraits de plantes sont des méthodes prometteuses pour réduire les maladies de post-récoltes des fruits.

Cette étude conduite au laboratoire de phytopathologie, qui relève de l'Ecole National d'Agriculture de Meknès s'inscrit dans la thématique de la protection des plantes et de l'environnement. L'objectif de l'étude d'effet des sels et des bactéries (agents de contrôle biologique) sur deux agents pathogènes responsable de la moniliose qui sont *Monilia laxa* et *Monilia fructigena*, les deux principales agents causale de la moniliose ou la pourriture brune.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-Pourriture brune

1. Généralités

La pourriture brune ou la moniliose est une maladie cryptogamique provoquée par des champignons appartenant au Genre *Monilia* (Lesik, 2013). C'est une maladie présente sur tous les continents et cause le dessèchement des fleurs et des rameaux ou la momification des fruits selon les organes qu'elle touche. Cette maladie s'attaque principalement aux arbres de la famille des Rosacées produisant des fruits à noyau ou à pépins tels que les pommiers, les poiriers, les cerisiers, les abricotiers, les pêcheurs (Hrustic et al., 2012). Elle cause des pertes dramatiques, principalement en post-récolte (DE OLIVEIRA LINO, 2016).

2. Agents causals

La moniliose est causée par de nombreux champignons pathogènes mais seulement trois causent des pertes importantes : *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, et *Monilinia fructigena*.

2.1. Position systématique de *Monilia* spp

La position systématique de *Monilia* spp est donnée par le tableau suivant :

Tableau 1 : Taxonomie de *Monilia* spp

Règne	Champignons
Division	Ascomycètes
Classe	Pézizomycètes
Sous – classe	Leotiomycetidés
Ordre	Helotiales
Famille	Sclerotiniacées
Genre	<i>Monilinia</i>
Espèce	<i>Monilinia laxa</i> , <i>Monilinia fructigena</i>

2.2. Caractéristiques morphologiques de *Monilia* spp

In vitro : Les colonies de *Monilia Laxa* sont ont un mycélium concentrique avec des marges lobées, par contre celles de *Monilia Fructigena* sont radiales, fragmentées avec des marges entières.

In vivo : Cette maladie se caractérise par l'apparition des taches brunes arrondies et centrées au point d'infection. *M. fructigena* a une couleur allant du blanc au beige clair, de grandes touffes de conidiospores (1,5 mm en moyenne) et cercles concentriques dans le fruit. Tandis que *M. laxa* peut être distingué par des conidiospores gris verdâtre des touffes de moins de 0,5 mm en moyenne recouvrant toute la surface infectée (DE OLIVEIRA LINO, 2016).

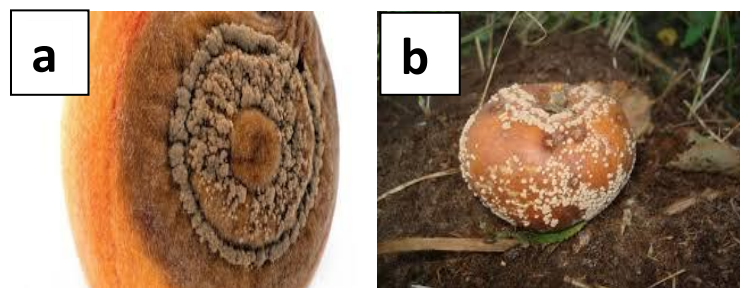


Figure 1 : a - monilia laxa, b - monilia fructigena.

3. Symptômes de la moniliose

Les symptômes causés par *Monilia laxa* sont visibles sur les fleurs, branches sous forme de brûlures et sur fruits sous forme de pourriture (Hrustic et al., 2012). Alors que pour *Monilia fructigena* le symptôme le plus fréquent est la pourriture des fruits qui est caractérisé par la formation des tâches de couleur brune et de forme circulaires autour du point d'entrée du pathogène ou de la blessure. Au fur et à mesure la tâche s'agrandit, elle traduit le développement de la maladie. Quand le champignon commence à sporuler, de nombreuses ruptures sur l'épiderme du fruit permettent l'apparition de sporodochies sous la forme de coussinets gris pour *Monilia laxa* et *Monilia fructicola* et de couleur beige pour *Monilia fructigena* (DE OLIVEIRA LINO, 2016 ; Jones et Aldwinckle, 1990)

4. Cycle biologique et épidémiologique

Monilia laxa et *Monilia fructigena* hivernent sous forme de mycélium dans les lésions de chancre de l'écorce des rameaux et des branches malades, des parties de fleurs pourries et des fruits momifiés dans la canopée ou sur le sol. Au printemps ou en été suivant lorsque les conditions deviennent favorables, le mycélium sporule sur ces parties de la plante, les

conidies se forment et sont disséminées par le vent, la pluie ou les insectes aux fruits. La germination des conidies et l'établissement d'infections est favorisés par des températures élevées et des conditions humides (Byrede et Willets, 1977; Holb, 2008). Les fruits peuvent être infectés par une pénétration directe de la cuticule, par production de cutinase (Bostock et al., 1999), des stomates ou des trichomes et par des fissures et des blessures (Wad et Cruickshank, 1992). Les conidies sont produites tout au long de la saison de croissance et peuvent infecter les fruits à n'importe quel stade de leur développement. Les chancres des tiges et des branches et les momies des fruits assurent la survie du champignon d'une saison à l'autre. La pourriture au stockage résulte d'infection juste avant la récolte.

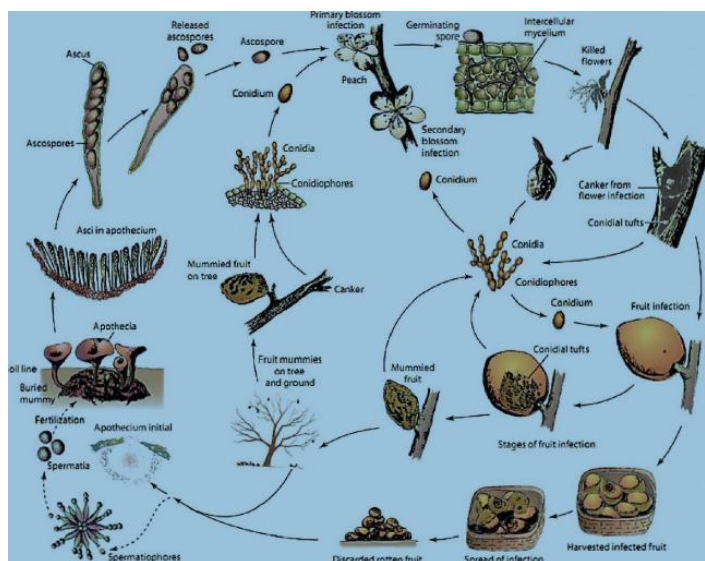


Figure 2 : Cycle de *monilia* spp

5. Méthodes de luttés contre la moniliose :

La lutte contre les champignons pathogènes du genre *Monilia*, les agents causals des maladies sur de nombreux arbres fruitiers est très exigeant et orienté dans plusieurs directions:

5.1. Méthode prophylactique

Cette méthode permet la réduction de l'inoculum au verger en éliminant les organes infectés. Elle s'applique avant la plantation d'arbres dans le respect de distances de plantation et l'orientation des lignes de la direction dominante du vent pour améliorer la ventilation. Pour réduire la pression de l'agent pathogène, il est nécessaire d'avoir des arbres sains et vigoureux, de sorte que le verger doit être régulièrement irrigué, fertilisé et taillé (Hrustic et al., 2012).

5.2. Lutte chimique

En ce qui concerne les attaques sur fleurs, de nombreuses substances actives sont utilisées en particulier celles qui affectent la sporulation du champignon telles que les dicarboximides, les benzimidazoles ou les triazoles. Plus récemment, des fongicides qui inhibent la respiration (strobilurines, carboxamides) ou le développement du mycélium (fenhexamid) ont été utilisés pour lutter contre les monilioses (Hrustic et al., 2012)

5.3. Lutte biologique

5.3.1. Principe de la lutte biologique

La lutte biologique vise à contrôler les agents pathogènes au moyen de ce qu'on appelle : biopesticides ou agents de biocontrôle, c'est-à-dire des moisissures, des levures, des bactéries et des virus ou par de produits comme les huiles essentielles, les extraits de plantes, et les sels organique / inorganique. Ces méthodes alternatives de lutte sont considérées comme plus soucieuses de l'environnement et de la santé du consommateur, et répondent plus adéquatement aux aspirations de développement durable de l'agriculture (El Hamouchi, 2011).

5.3.2. Utilisation des sels

De nombreux travaux menés au cours des deux dernières décennies ont démontré que certains sels, utilisés surtout comme additifs en industries agro-alimentaires, ont un potentiel intéressant pour le contrôle des maladies des plantes.

5.3.3. Agents de contrôle biologique contre *Monilia* spp.

Plusieurs antagonistes ont été identifiés et testés contre les principales maladies de post-récolte des fruits et notamment contre *Monilia* spp

✓ Mode d'action

Les modes d'action des agents microbiens dans le biocontrôle ne sont pas toujours bien connus (Sharma et al., 2009), et peuvent varier pour un micro-organisme donné, en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles (ADAM, 2008). Il s'agit principalement de la compétition pour l'espace et les éléments nutritifs, le parasitisme, l'antibiose, ou encore l'activation des réactions de défense chez l'organisme

hôte. Ces modes d'action peuvent contribuer simultanément ou séquentiellement au biocontrôle de l'agent phytopathogène.

a. Antibiose

L'antibiose consiste une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites secondaires (ADAM, 2008), à faibles concentrations mais qui peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes. Les antagonistes producteurs d'antibiotiques ont montré une grande efficacité dans le contrôle biologique. Cependant, leur utilisation comme agent de lutte biologique a été remise en question. L'introduction de ces organismes dans l'alimentation peut constituer une cause d'apparition de résistance à certains antibiotiques chez l'homme et/ou de toxicité directe vis à vis de l'homme.

b. Compétition pour la nutrition et pour l'espace

La plupart des pathogènes des maladies de post-récolte sont nécrotrophes et doivent présenter une phase saprophytique à la surface des fruits avant de développer une structure infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments provenant de la spore elle-même mais surtout de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface (Blakeman et Brodie, 1977). La présence sur les sites de blessure d'antagonistes entrant en compétition pour ces éléments nutritifs, peut prévenir l'établissement de la phase saprophytique du pathogène et par conséquent prévenir ou réduire l'infection. Cette compétition a lieu lorsque l'agent antagoniste et le pathogène consomment simultanément le même composé. Pour être efficace sur ce point, l'antagoniste doit donc utiliser rapidement et efficacement les nutriments.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

Dans ce travail, nous avons utilisé deux souches pathogènes *Monilia Fructigena* et *Monilia laxa* importées de [Serbie](#), qui ont été isolées respectivement à partir des cerises et des prunes en 2010. La culture des deux champignons a été maintenue sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Ce milieu est favorable au développement du champignon.

Les colonies du champignon, objet des différents tests, sont issues des repiquages, âgées de 10 jours à 25°C dans l'incubateur et à obscurité.

2. Préparation des souches

A partir des souches originales provenant de Serbie une série de repiquage a été mise en place afin d'obtenir des nouvelles souches pures de *monilia* spp.

Dand des conditions aseptiques,des fragments du champignon ont été déposés sur le milieu PDA solidifié, à raison 20ml par boîte de pétri, additionné après autoclavage de 100mg/l de chloramphénicol et streptomycine et 1% d'acétone (favorise la sporulation) en plus de l'acide acétique 1%.

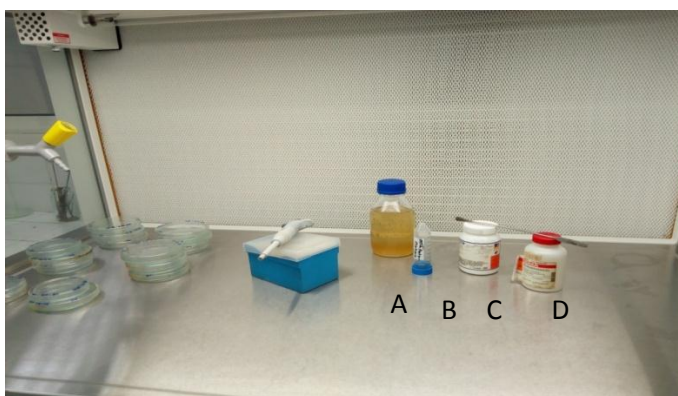


Figure 3 : A - milieu PDA ; B - Acide acétique ; C - chloramphénicol ; D- Streptomycine

Les boîtes sont incubées ensuite à 25°C à l'obscurité, afin d'obtenir des cultures pures, et chaque colonie est repiquée plusieurs fois dans de nouvelles boîtes de PDA.

Sous hotte à flux laminaire, et à partir d'une culture en pleine croissance, des repiquages sont réalisés à partir de cubes de 2-3 mm d'arête et déposée au centre de milieu de culture PDA, en présence des antibiotiques afin d'inhiber la croissance des bactéries.

Tableau 2 : Composition du milieu PDA

Eléments	g/l
Pupe de pomme de terre	250
Agar	20
Glucose	15
Eau distillée	1L

3. Screening des sels organiques et inorganiques

Agents de contrôle biologique

Nous avons utilisé dix-sept sels organiques / inorganiques présents au niveau du laboratoire de phytopathologie de l'ENAM

- | | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| ✓ Sulfate de cuivre | ✓ Carbonate de sodium |
| ✓ Ammonium sulfate | ✓ Acide citrique |
| ✓ Ammonium molybdate | ✓ Bicarbonate de sodium |
| ✓ Carbonate de potassium | ✓ Chlorure de sodium |
| ✓ Hydroxyde de potassium | ✓ Acide salicylique |
| ✓ Chlorite de magnésium | ✓ Hydroxyde de sodium |
| ✓ Sodium phospho dibasie | ✓ Sodium sulfate anhydre |
| ✓ Sodium acétate | ✓ Potassium dihydrogeno phosphate |
| ✓ Sulfate magnésium | |

4. Effet des sels sur la croissance du mycélium

Pour évaluer l'efficacité des sels sur la croissance mycélienne. Des solutions de chaque sel sont incorporées dans le milieu PDA après autoclavage et le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri. L'inoculation est faite par un disc mycélien de 5 mm à partir d'une culture de 10 jours à 15 jours. Dans ce test trois répétitions par concentration sont effectuées, et les boîtes sont incubées à 25°C à l'obscurité.

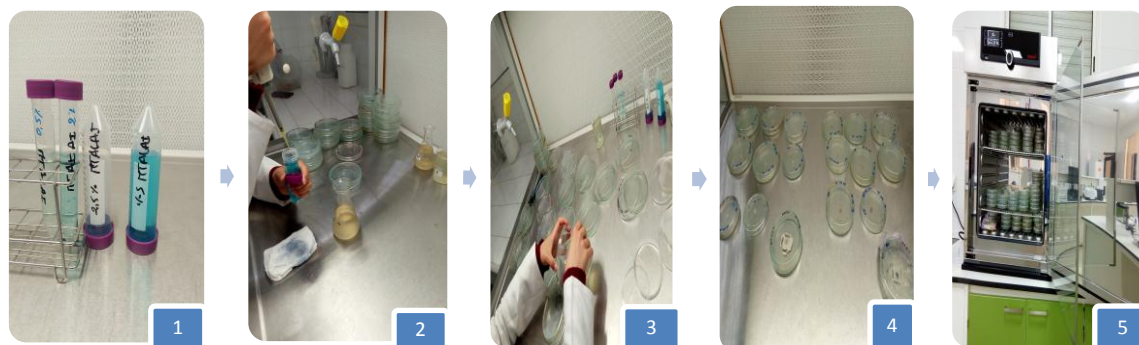


Figure 4 : Procédure de l'étude de l'effet des sels sur la croissance mycélienne de la moniliose

Le diamètre des champignons est mesuré deux fois ; après 5 jours et puis après l'envahissement de la boîte du témoin les mesures ont été effectuées par un pied à coulisse.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon est calculé selon la formule suivante (Selmaoui et al., 2004)

$$PIs = \frac{Dt - Dc}{Dt} * 100$$

avec

Dt : diamètre du témoin sur le milieu de culture sans traitement.

Dc : diamètre du pathogène sur le milieu de culture avec traitement.



Figure 5 : Mesure de diamètre du pathogène par un pied à coulisse

5. Effet des sels sur la germination de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

5.1. Repiquage à partir du fruit inoculé par *Monilia* spp

Les fruits (pêcher / Nectarines) ont été désinfectés sous hotte à flux laminaire avant l'inoculation et ils ont placés dans de l'eau distillée stérile et de l'eau de javel 1% pendant 3 min (3 fois), ensuite ils ont été rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile pendant 3min pour chaque rinçage et enfin séchées sous hotte pendant 30 min. Après séchage, les fruits ont été blessés à l'aide d'une aiguille fine (blessures de 2 mm de profondeur) au niveau de quatre points opposé de l'équateur, puis inoculés par des fragments mycéliens prélevés des cultures jeunes.

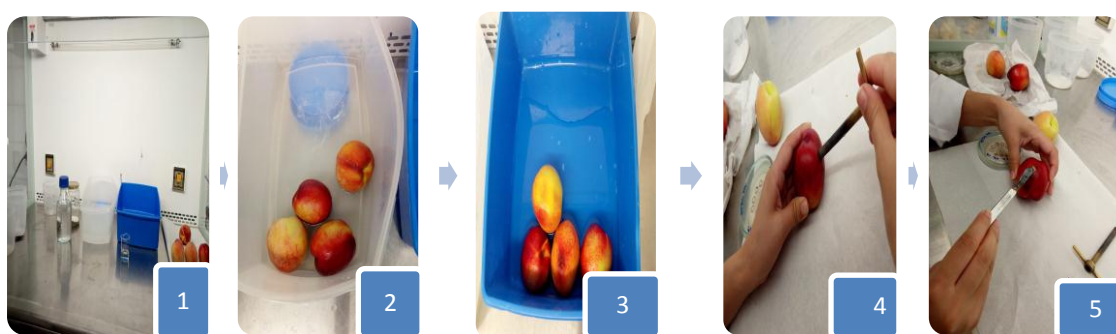


Figure 6 : étapes de l'inoculation artificielle du fruit par *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Les fruits inoculés ensuite sont placés dans des boîtes de plastiques stériles contenant un papier filtre stérile imbibé avec de l'EDS et incubé pendant 10 jours. Ces fruits sont incubés à l'obscurité pendant 24h sous une température ambiante du laboratoire et puis en photopériode (12 h de lumière, 12 d'obscurité) à 24°.



Figure 7 : Des boîtes de plastique stériles utilisées pour l'incubation du fruit

5.2.Repiquage du pathogène a partir des fruits

Sur des conditions aseptiques,les fragments du champignon ont été prélevés à partir des fruits inoculés pendant 10 jours et déposés sur le milieu PDA, à raison 20ml par boîte de pétri, additionnés après autoclavage de 100mg/l de chloramphénicol , streptomycines et 1% d'acétone qui favorise la sporulation et de l'acide acétique 1%. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C à l'obscurité, afin d'obtenir des cultures pures du pathogène.

5.3. Préparation de la solution sporale

La solution sporale est préparée à partir d'une souche âgée de 4jours. Au premier lieu on a ajouté 3 ml d'eau distillée stérile dans la boîte de pétri. La boîte est grattée avec une lame de rasoir. Après,la solution est récupérée dans un tube de 10 ml contenant 2 ml d'EDS et l'agiter au vortex pendant 3 min.Pour éliminer les débris du mycélium une filtration a été effectuée. A partir de cette solution une lame microscopique a été préparée afin d'observé sur le microscope les formes des conidies des deux pathogènes.

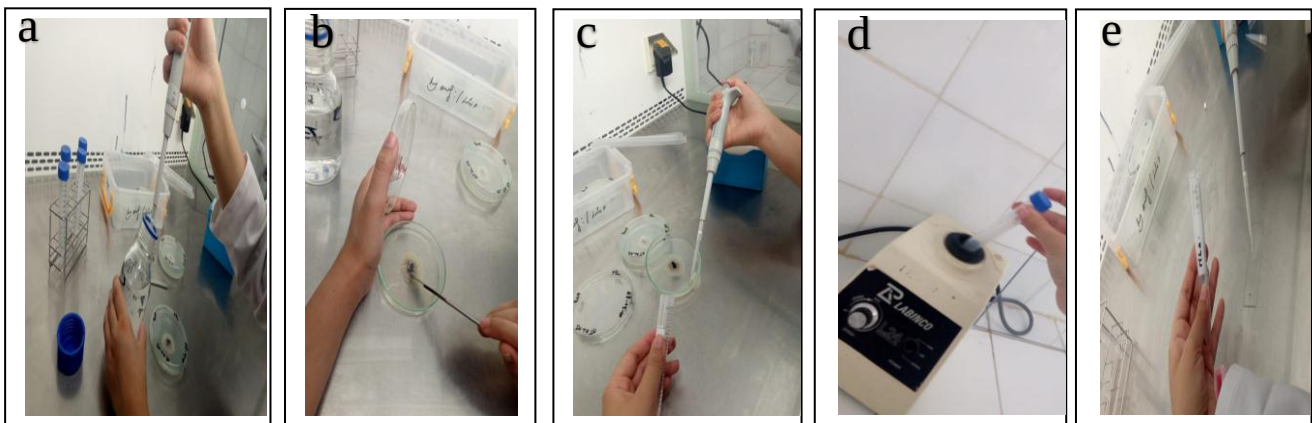


Figure 8 : a - Ajout de EDS dans la boîte de pétri, b - grattage de la culture pure, c - récupération de la solution sporale dans un tube, d - Agitation dans le vortex, e - préparation du lame microscopique

6. Effet des bactéries sur la croissance mycélienne

❖ Agent de biocontrôle

Le test in vitro de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne des deux souches pathogène a été effectué par quatre bactérie (ACBC1 : *Alcaligenes faecalis*) (ACBP1 : *Pantoea agglomerans*) (SF14 : *Bacillus amyliliquefaciens*) (SP10 : *Bacillus*

amylicofaciens). Le choix de ces bactéries est basé sur une étude antérieure réalisé par Lahlali et al . ; 2019).

Tableau 3 : Types des bactéries utilisées dans le test

	BACTERIES
<i>MONILIA LAXA</i>	ACBC1 ACBP1 SP10 SF14
<i>MONILIA FRUCTIGENA</i>	ACBC1 ACBP1 SP10 SF14

La suspension bactérienne des souches a été préparée à partir des cultures âgées de 24h ; les bactéries sont récupérées en grattant par une pipette pasteur stérile. La concentration bactérienne a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre a une longueur d'onde 620 nm.

Pour évaluer l'effet des bactéries sur la croissance du pathogène ; une suspension bactérienne est préparée avec deux différents concentrations (10^6 et 10^8). Après agitation de la suspension au vortex la suspension est placée sur du papier filtre stérile circulaire (0.5 cm de diamètre ; deux pièces dans chaque boîte ; à égal distance du bord et du centre de la boîte)qui est placé dans les boîtes de pétri qui sont déjà remplis par le milieu PDA cette fois si sans ajouté les antibiotiques pour ne pas inhibé la croissance des bactéries. L'inoculation est effectuée par un disc mycélien issu de culture âgée de 7 jours. Toutes les boîtes ensuite sont déposées dans un incubateur à 25 °C à l'obscurité

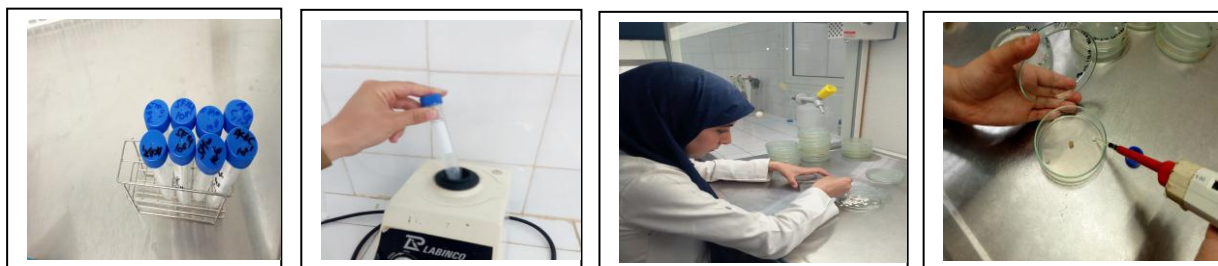


Figure 9 : Procédure de l'étude d'effet des antagonistes sur la croissance mycélienne

PARTIE III : Résultats et Discussion

1.Effet de différentes substances sur la coissance du *Monilia laxa* et *Fructigena* in vitro.

➤ Sulfate de Cuivre

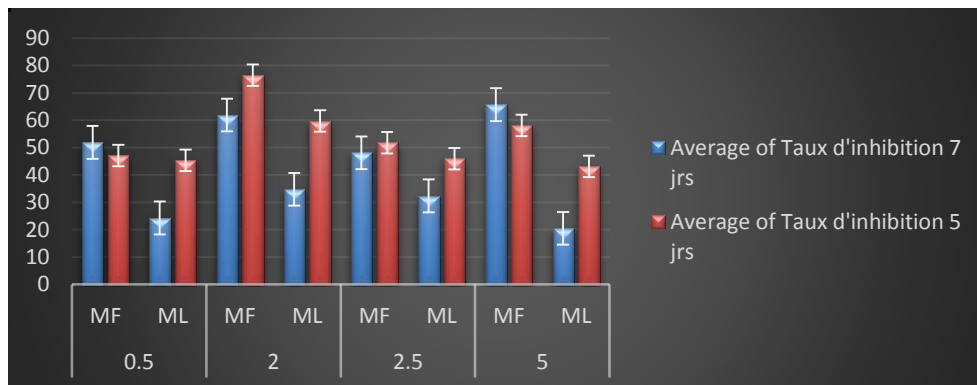


Figure 10 : Effet du sulfate de cuivre in vitro sur la coissance du *Monilia laxa* et *Fructigena*

D'après la figure (10), on a constaté pour *Monilia Fructigena* que le taux d'inhibition après 5 jours et après l'envahissement de la boîte par le témoin est élevé dans la concentration 2% et 5% par rapport aux autres concentrations, alors que pour *Monilia Laxa* le taux d'inhibition est très importants pour la concentration 2%.Ce sel a une efficacité moyenne pour la concentration 2% et faible dans autres concentrations.

➤ Carbonate de sodium

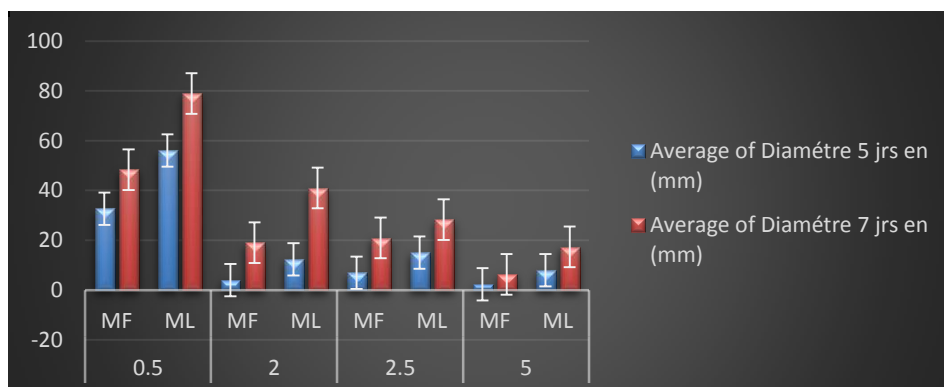


Figure 11 : Effet de carbonate de sodium in vitro sur la coissance du *Monilia laxa* et *Fructigena*

Cette figure montre une augmentation du taux d'inhibition pour chaque souche pour la concentration de 0.5 %. Après en remarque une chute du taux d'inhibition jusqu'à ce qu'il devient presque nul pour une concentration de 5 %.

D'une autre part les mêmes résultats sont décrites par (Talibi et al . ; 2012)

➤ Acide citrique

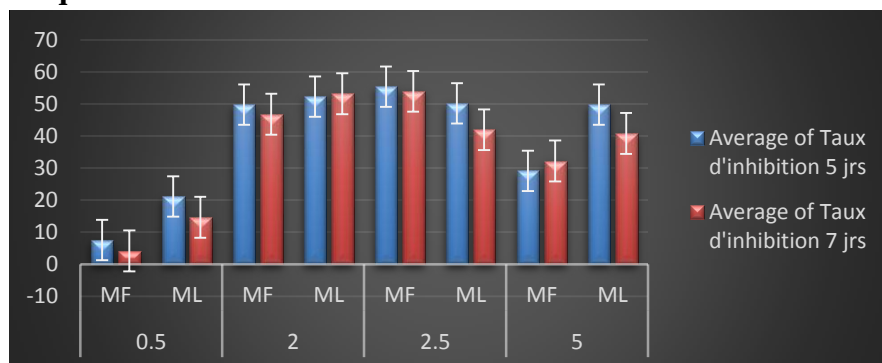


Figure 12 : Effet de l'acide citrique in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

D'après cette figure on constate une baisse au niveau du taux d'inhibition pour la concentration 0.5. Mais ce taux commence à augmenter pour les différentes concentrations jusqu'à ce qu'il arrive à son max (presque 55%) pour une concentration de 2.5%. Alors que (Talibi et al . ; 20) aussi a trouvé que la concentration inhibitrice minimale est supérieure à 2%.

➤ Sulfate du manganèse

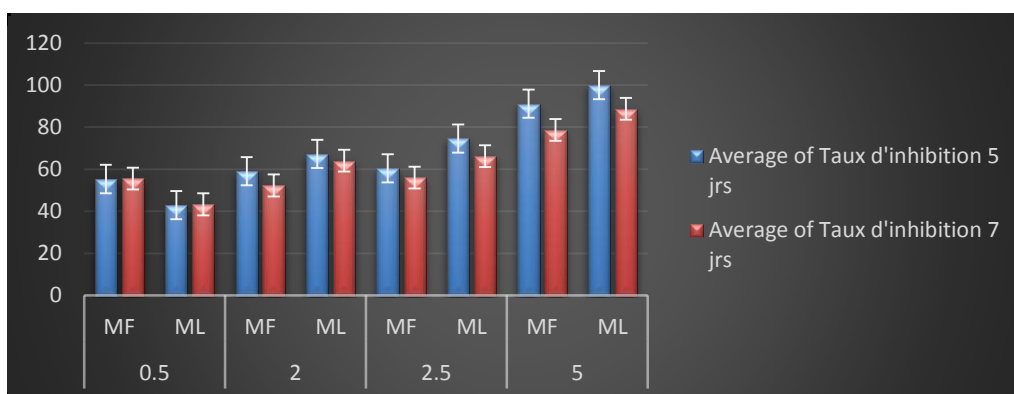


Figure 13 : Effet de sulfate du manganèse in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

D'après ce graphique on constate que le taux d'inhibition pour *Monilia Fructigena* est supérieur à celle de *Monilia Laxa* au niveau de toutes les concentrations (0.5 %, 2%, 2.5%, 5%)

Ensuite on observe que le taux d'inhibition pour les deux souches augmente avec l'augmentation du concentration. Ce qui a été déjà mentionné (Talibi et al. ; 2012).

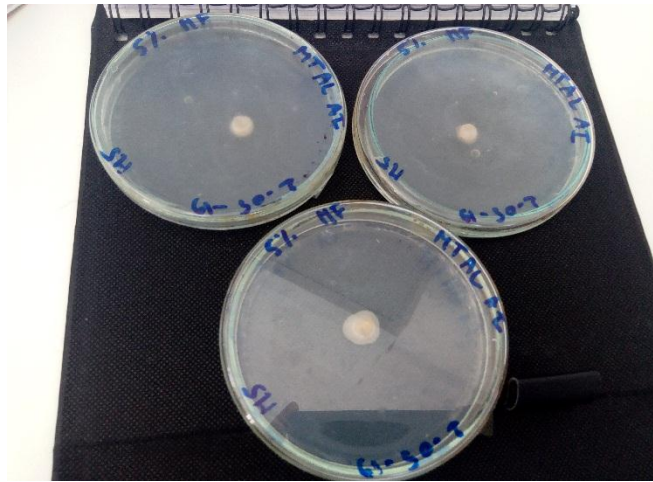


Figure 14 : l'effet de Sulfate du manganese pour MF (5%)

➤ Acide salicylique

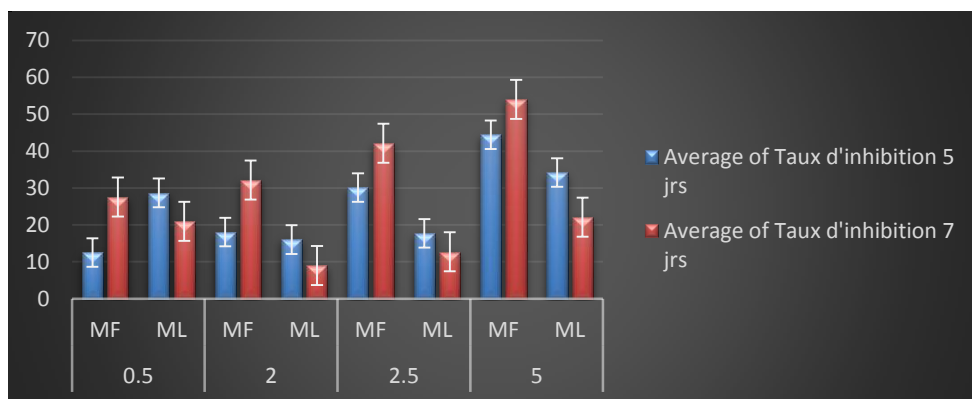


Figure15 : Effet de l'acide salicylique in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

D'après la figure (15), on a constaté pour *monilia fructigena* que le taux d'inhibition après 5 jours et après 7 jours est moyenne pour la concentration 2.5% et 5% par rapport aux autres concentrations, alors que pour *Monilia Laxa* le taux d'inhibition est très importants pour la concentration 5%.donc ce sel a une efficcacité moyenne dans une concentration de 5 %.

Et d'ailleurs (Talibi et al .,2012) a trouvé que le taux d'inhibition minimal de ce sel est supérieur à 2

➤ Chlorure de sodium

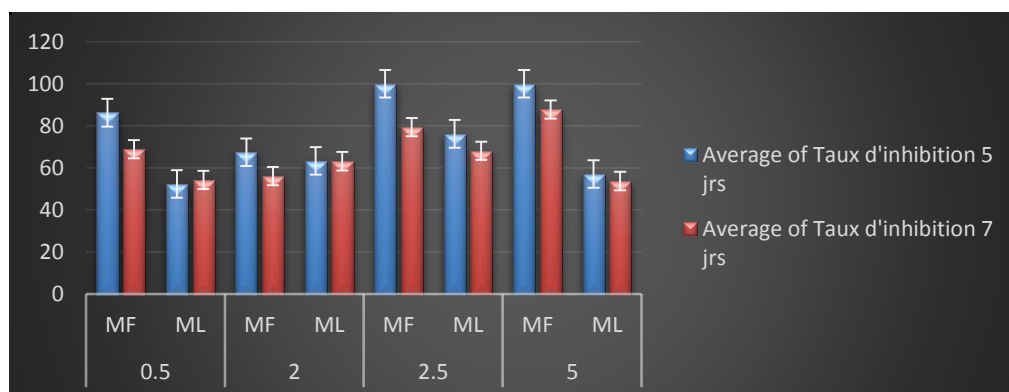


Figure 16 : Effet de chlorure de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Tous d'abord on observe que le taux d'inhibition des deux souches est très important pour toutes les concentrations.

Puis on constate que ce taux atteint 100% pour *Monilia Fructigena* pour les concentrations 2.5% et 5%.

Donc la présence des sels en contact avec le champignon permet l'inhibition de sa croissance, et il a une efficacité importante surtout au niveau des concentrations 2.5% et 5%.

➤ Hydroxyde de sodium

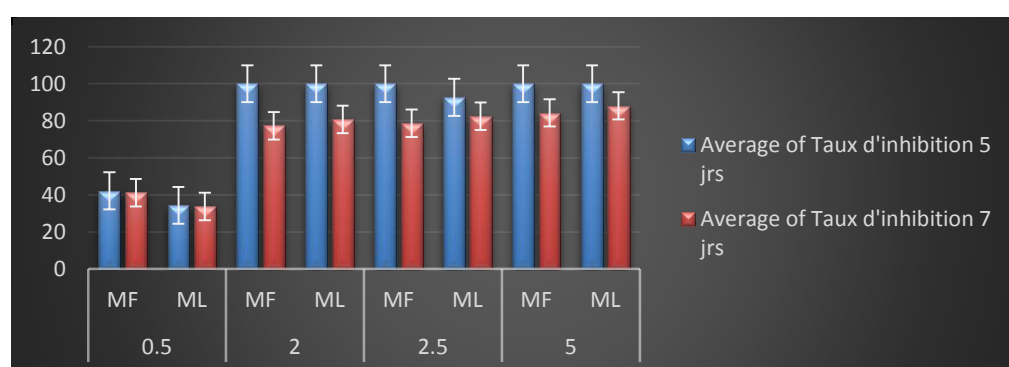


Figure 17 : Effet d'hydroxyde de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

D'après les statistiques on constate que le taux d'inhibition de *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* est presque le même pour toutes les concentrations.

Ce taux devient constante dans une valeur maximal de 100% à partir de la concentration 2%.

Donc ce sel n'est efficace que avec une concentration supérieur ou égal à 2 %.

➤ **Sodium sulfate anhydre**

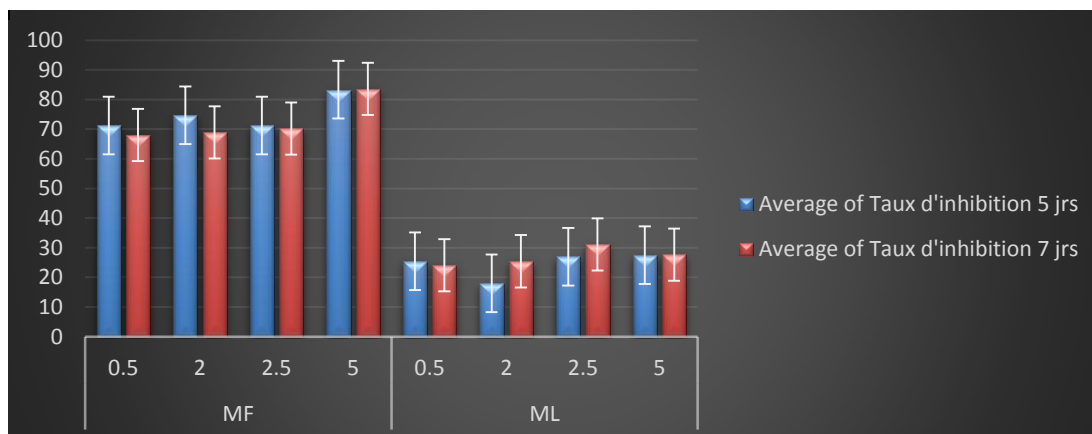


Figure 18 : Effet de sodium sulfate anhydre in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*.

Cette figure montre un taux d'inhibition de la souche *Monilia fructigena* plus important que celui de la souche *Monilia laxa*.

Pour *Monilia fructigena*, le sodium sulfate anhydre est efficace puisque le taux d'inhibition est supérieur à 70%. Ce taux arrive à son max pour la concentration 5% alors que pour *Monilia laxa* ce sel n'est pas efficace puisque le taux d'inhibition pour toutes les concentrations ne dépasse pas 30%.



Figure 19 : Effet de Sulfate sodium anhydre (0.5%) sur la croissance de M.L

➤ **Potassium dihydrogeno phosphate**

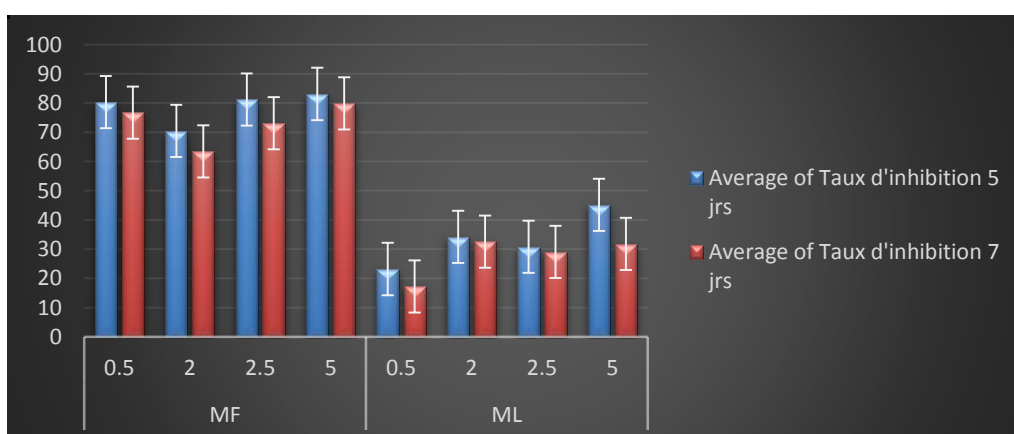


Figure 20 : Effet de potassium dihydrogeno phosphate in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Cette histogramme indique une élévation du taux d'inhibition de *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* après 5 jours et après 7 jours.

Ce taux se différencie selon les deux souches car pour MF on observe que celui-ci est plus important que celui de *Monilia laxa*. Ce qui montre l'efficacité de potassium dihydrogène phosphate pour *Monilia fructigena*, alors qu'il n'est pas efficace pour *Monilia laxa*.

Les chiffres montrent que le taux d'inhibition de *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* atteint son maximum pour la concentration 5 %.

➤ Sodium phospho dibasie

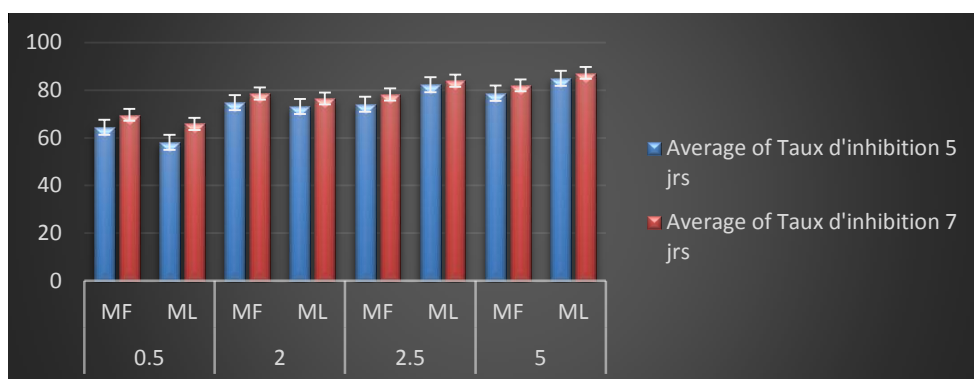


Figure 21 : Effet de sodium phospho dibasie sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Cette figure illustre le taux d'inhibition de *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* selon des différents concentrations

Puis ces statistiques indiquent que le taux d'inhibition de *Monilia fructigena* est plus grand que celui de *Monilia laxa*. Et on observe également que ce taux augmente avec l'augmentation des concentration.

➤ Carbonate de potassium

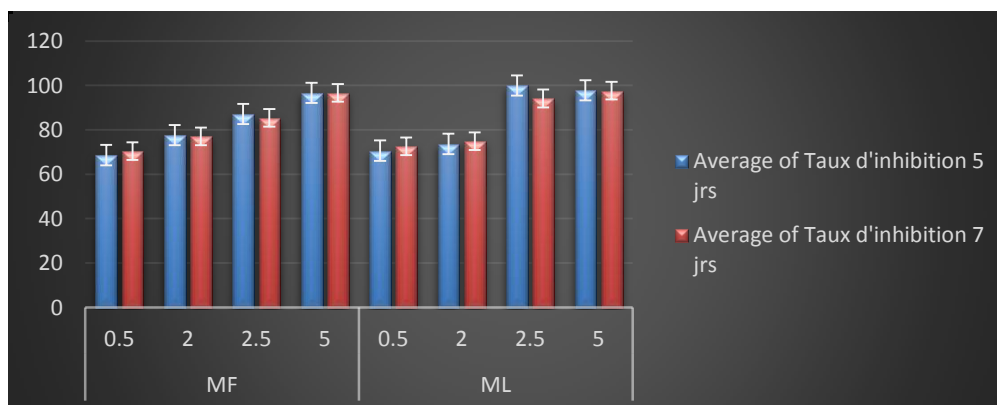


Figure 22 : Effet de carbonate de potassium in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

D'après cette figure on observe que le taux d'inhibition est très important pour la concentration 5 % pour les deux souches de la moniliose, ce qui montre l'efficacité du carbonate de potassium dans l'inhibition de la croissance de la moniliose.

(Talibi et al ., 2012) a confirmé l'efficacité du carbonate de potassium puisqu'il a trouvé la concentration inhibitrice minimale de ce sel est égale à 0.5%. (Palmer et al ., 1997) a trouvé que le carbonate de potassium est efficace.

➤ Ammonium molybdate

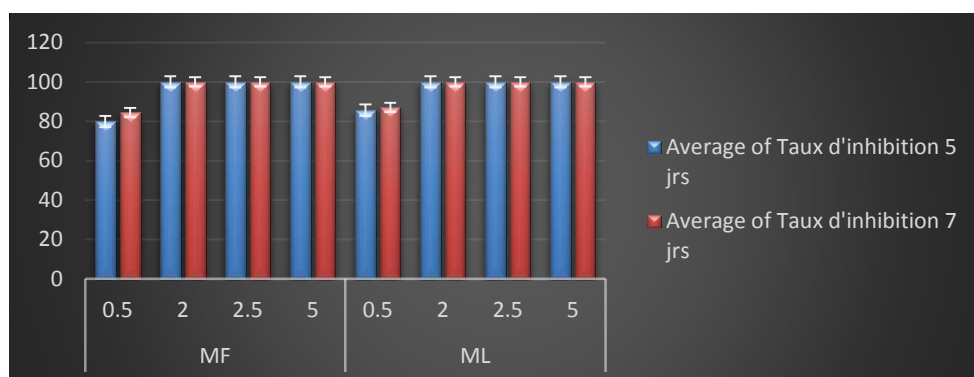


Figure 23 : Effet d'amonium molybdate in vitro sur la croissance de *Monilia Laxa* et *Fructigena*

Cette figure illustre une égalité au niveau du taux d'inhibition pour *Monilia laxa* et *Monilia fructigena*

Ce taux commence de 80% pour la concentration 0.5 % et arrive à 100 % à partir la concentration 2 %

Cette résultat confirme ce qui a trouvé (Talibi et al . ; 2012) que l'ammonium molybdate a une concentration minimiale inhibitrice égale à 0.5 %

➤ Ammonium sulfate/Acétate de sodium

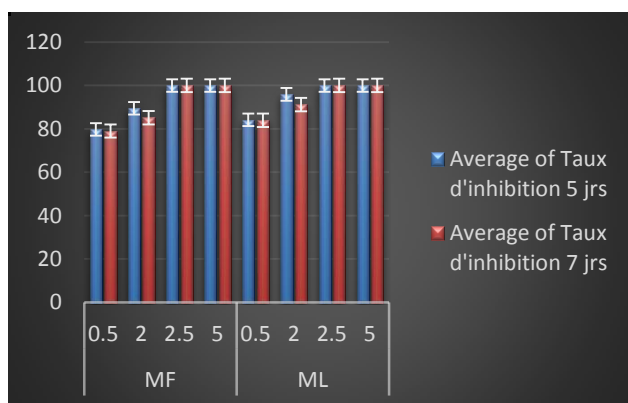


Figure 24 : Effet d'Ammonium sulfate in vitro sur la croissance de *monilia laxa* et *fructigena*

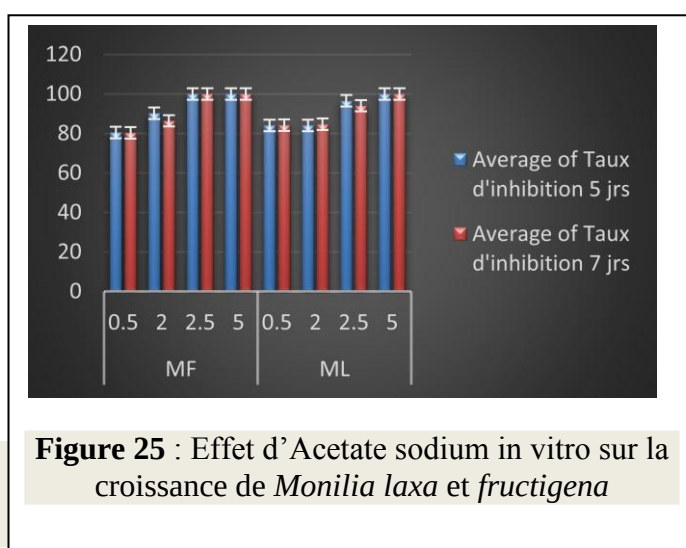


Figure 25 : Effet d'Acetate sodium in vitro sur la croissance de *Monilia laxa* et *fructigena*

Ces deux figures montrent une progression du taux d'hinibition pour les deux souches de la pourriture brune.

Ce taux d'inhibition arrive à 100 % pour les deux souches et en présence des deux sels pour une concentration de 2.5 % et 5 %.

Ammonium sulfate et Acetate sodium deux sels qui présentent une activité inhibitrice importante sur la croissance du champignon. Cette résultat présente le contraire de ce qui a trouvé (Talibi et al . ,2012).

➤ magnésium chloride

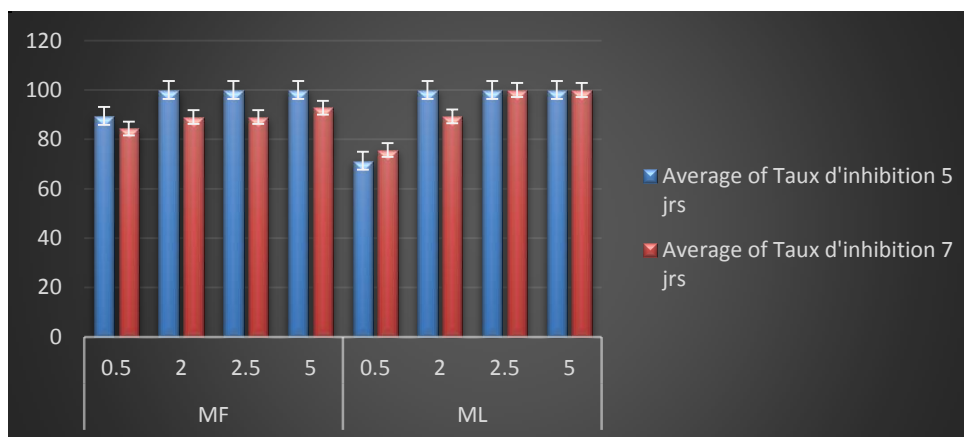


Figure 26 : Effet de magnésium chloride in vitro sur la croissance de *Monilia laxa* et *fructigena*

D'après cette figure on constate que pour *Monilia fructigena* le taux d'inhibition après 5 jours est très important tout au lon de toutes les concentrations est il devient stable à 100 % depuis la concentration 2% pour *Monilia laxa*.

Cette résultat est le contraire du résultat de (Talibi et al . 20)

➤ Hydroxyde potassium

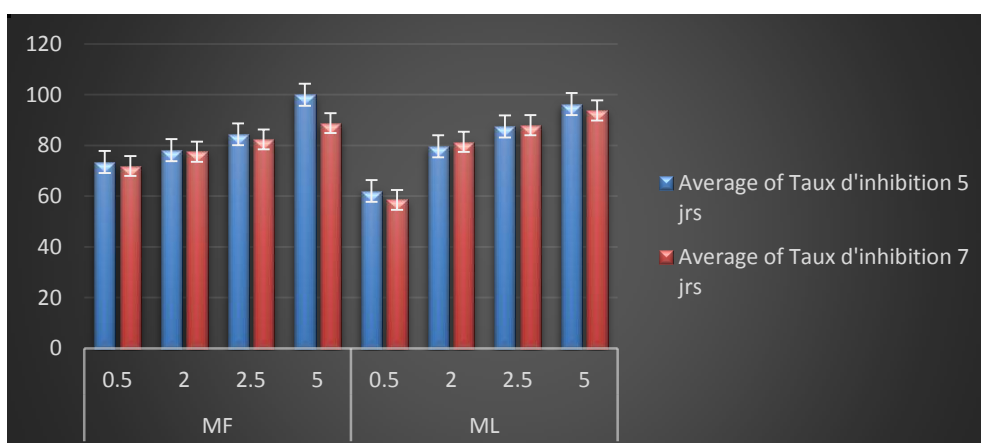


Figure 27 : Effet d'hydroxyde de potassium in vitro sur la croissance de *Monilia laxa* et *fructigena*

On observe dans cette figure que l'hydroxyde de potassium a un effet efficace dans l'inhibition de la croissance des deux souches de la moniliose. On note la présence d'un pic pour *Monilia fructigena* et aussi *Monilia laxa* pour une concentration de 5%.

➤ Bicarbonate de sodium

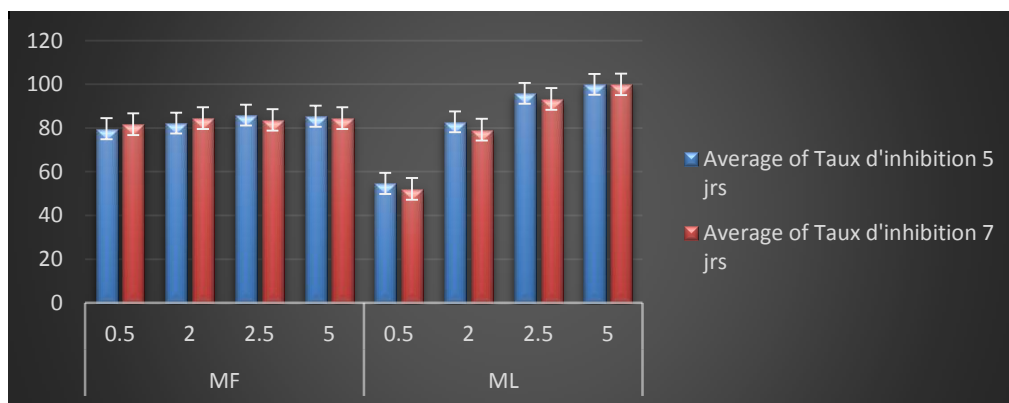


Figure 28 : Effet de bicarbonate de sodium in vitro sur la croissance de *Monilia laxa* et *fructigena*

Pour *Monilia fructigena* on observe que le taux d'inhibition reste presque constante pour les différents concentrations testé dans une valeur égale à 82

Pour *Monilia laxa* on remarque que le tax d'inhibition augmente avec l'augmentation des concentration j'usqu'a ce qu'il arrive à 100 pour une concentration de 5 .Ce qui montre l'efficacité de bicarbonate de sodium dans la lutte contre la moniliose.Cependant (Talibi et al.,2012) a trouvé que ce sel n'est pas efficace.

2.Effet des sels sur la germination de *Monilia laxa* et *fructigena* :

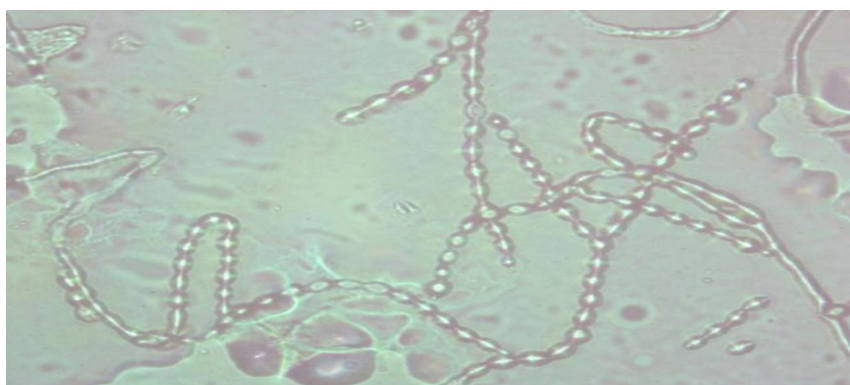


Figure 29 : Observation microscopique des spores de *Monilia laxa*(x40).

L'étude microscopique de la solution sporale montre les différentes formes de spores. On trouve des spores en chaînés alors que d'autres ils sont ronds et bien germés. Ces spores qui vont à la suite utilisés pour déterminer l'effet des sels sélectionnés sur la germination de *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* (manipulation en cours...)

3. Effet des bactéries in vitro sur le développement de *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* :

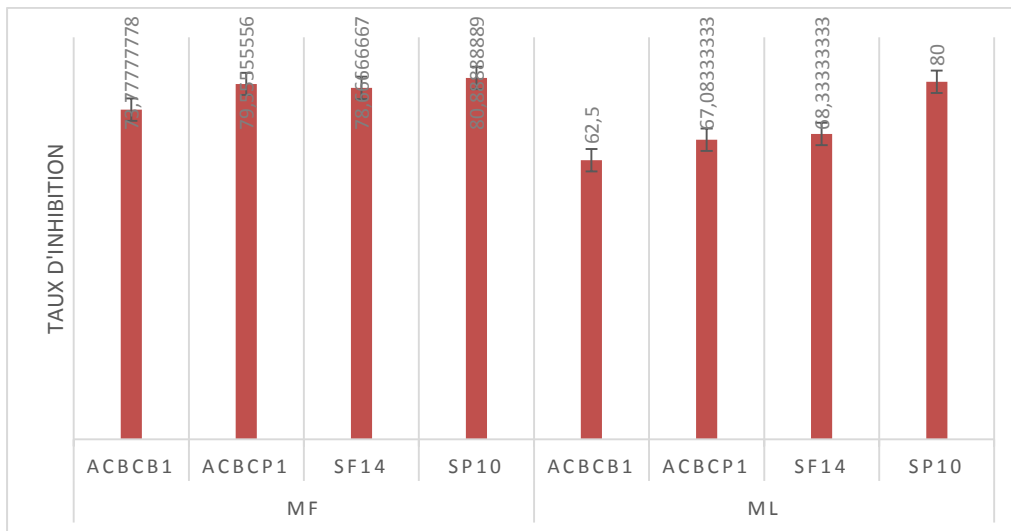


Figure 30 : effet des 4 bactéries sur les pathogènes (10^6)

Les 4 bactéries ont marqué une inhibition élevée qui est supérieure à 60

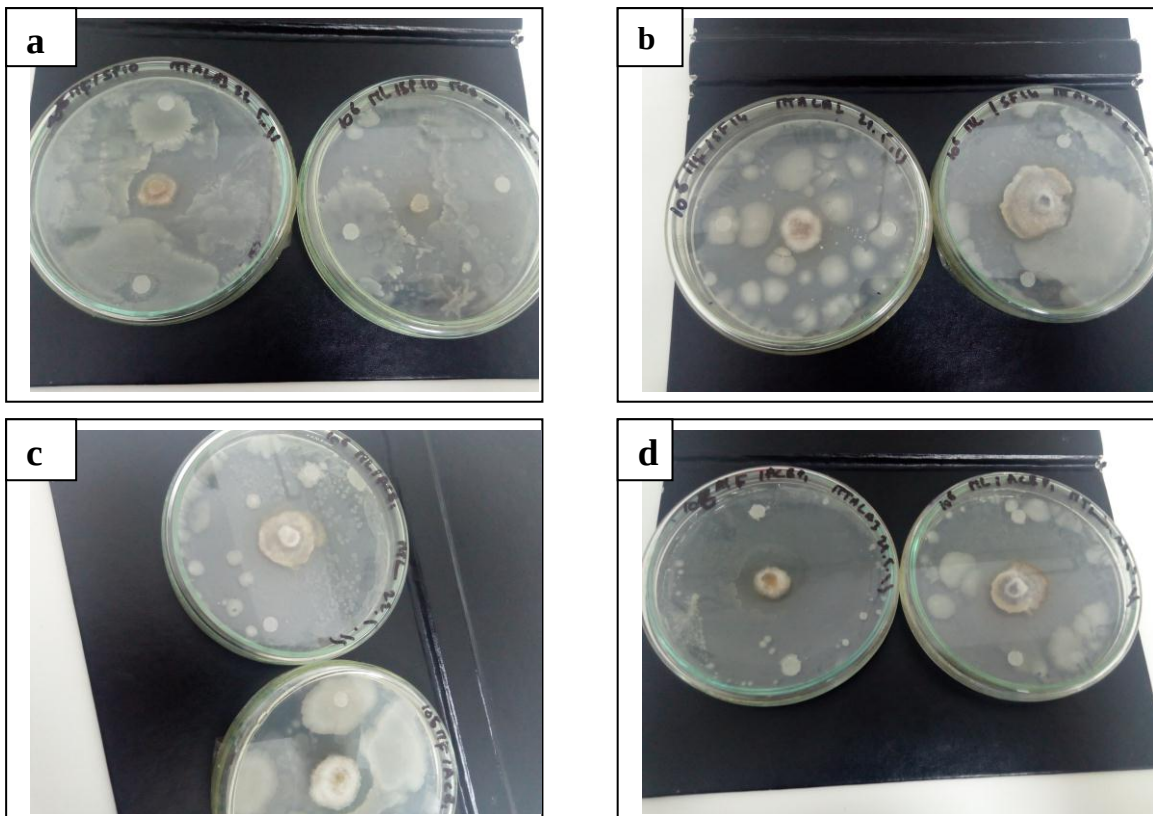


Figure 31: a - ML/MF en présence de SP10, b - ML/MF en présence de SF14, c - ML/MF en présence de ACBCB1, d - ML/MF en contact avec ACBCP1

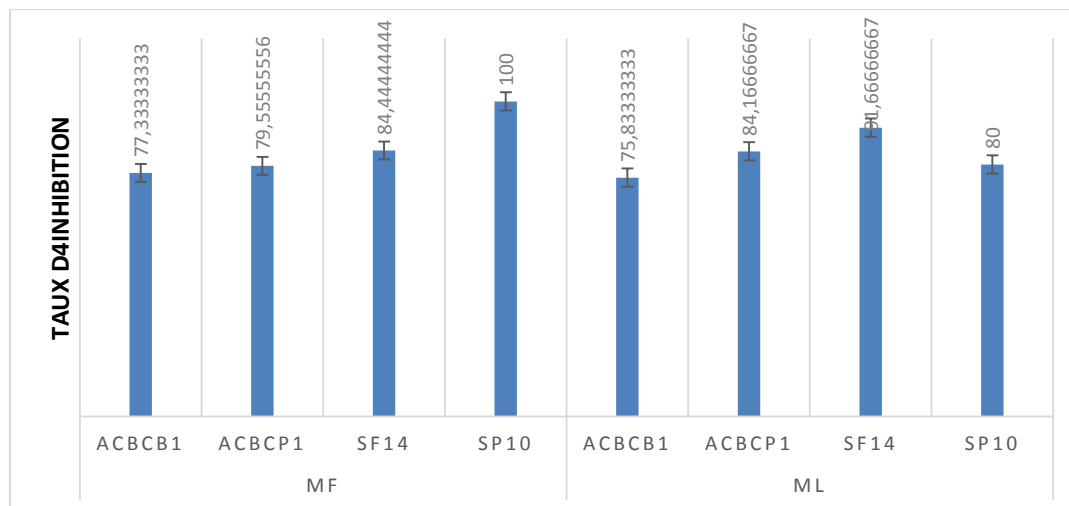


Figure 32 : Effet des 4 bactéries sur les pathogènes (10^8)

Les résultats montrent une élévation du taux d'inhibition pour les différents bactéries utilisées dans ce test qui sont supérieures à 70 et qui atteignent une inhibition totale pour SP10 (MF).

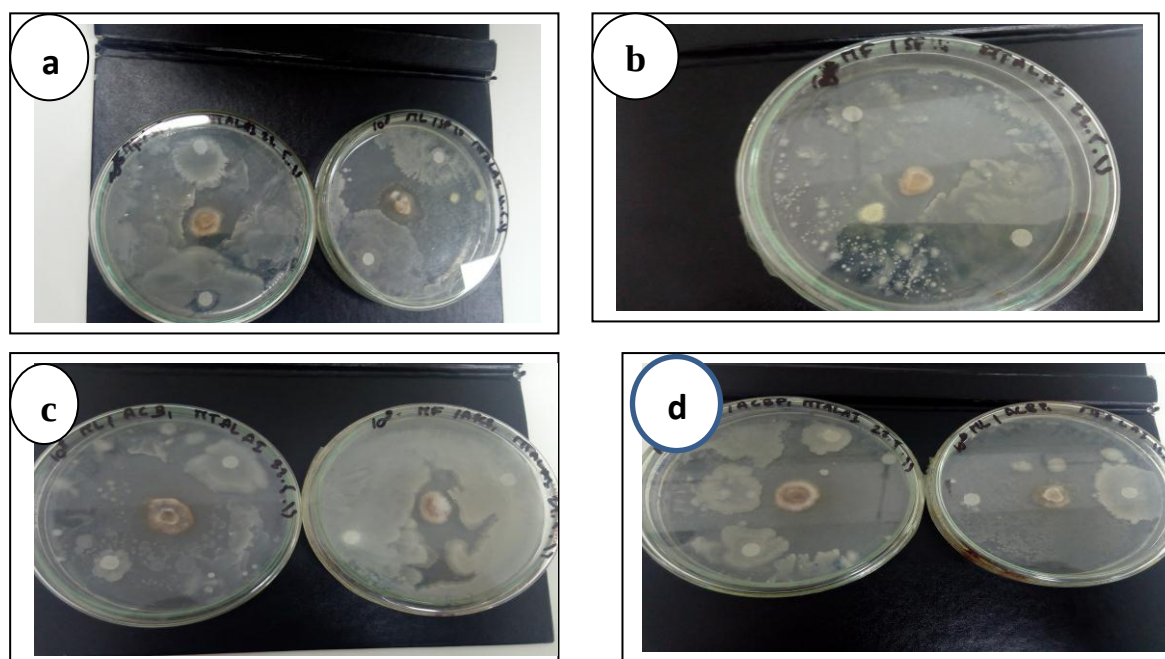


Figure 34 : a - ML/MF en contact avec SP10, b - ML en contact avec SF14, c - ML/MF en contact avec ACBCB1, d - ML/MF en contact avec ACBCP1

CONCLUSION ET RECOMMANDATION :

La moniliose est une maladie très répandue et qui peut ruiner les récoltes des vergers. Les mesures prophylactiques et les fongicides sont actuellement les principaux moyens de lutte contre ces maladies. Vu que l'application des fongicides s'est révélée contraignante, la lutte biologique par les antagonistes et par les sels organiques ou inorganiques s'est développée comme une solution alternative potentielle et prometteuse, à la lutte chimique. Cependant, très peu d'études ont porté sur l'utilisation des bactéries et des sels dans la lutte biologique au Maroc.

Dans ce travail, nous avons orienté l'étude vers l'évaluation de l'activité antifongique de dix-sept sels et l'activité antagonistes de quatre bactéries, in vitro pour le contrôle de la pourriture brune causée par *Monilia fructigena* et *Monilia laxa*.

Les résultats du test de confrontation entre les sels et les deux souches du pathogène ont montré que parmi les 17 sels utilisés nous avons trouvé quinze sels qui possèdent une activité antifongique élevée contre la moniliose ou la pourriture brune avec un taux d'inhibition qui varie entre 75 et 100 %, seulement l'acide citrique et l'acide salicylique qui ne sont pas efficaces.

Les sels suivants ont un taux d'inhibition varie entre 80 et 100 % pour toutes les concentrations : Ammonium sulfate, Acétate de sodium, magnesium chloride, hydroxyde de potassium, bicarbonate de sodium.

Alors que les sels suivants ne sont pas efficace que dans une concentration précise : Carbonate de sodium a une taux d'inhibition de 80 % pour la concentration 0.5%, Chlorure de sodium et le sodium phospho dibasique et carbonate de potassium sont très efficaces pour 2.5 et 5 %.

Cependant le Sulfate sodium anhydre et le potassium dihydrogène phosphate sont efficace seulement pour M.F au niveau de la concentration 5%.

Alors que pour la confrontation directe in vitro entre les bactéries et les champignons, à 7 jours d'incubation à 25°C les résultats de l'effet des bactéries sur la croissance mycélienne de *Monilia Laxa* et *Monilia Fructigena* ont mis en évidence une activité antagoniste importante confirmée par le taux d'inhibition qui était très élevé pour les différentes souches bactériennes utilisées.

Afin d'obtenir un meilleur résultat il est souhaitable de suivre les recommandations suivantes :

- ✓ Etude in vivo de l'effet des sels sélectionnés sur le développement de *Monilia Laxa* et *Monilia Fructigena*.
- ✓ Etude in vivo de l'effet des 4 bactéries sur le développement de *Monilia Laxa* et *Monilia Fructigena*.
- ✓ Etude in vitro d'effet des sels sélectionnés sur la germination des spores et sur la sporulation de *Monilia Laxa* et *Monilia Fructigena*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ADAM A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. p.7.
- Attrassi K., Selmaoui K. , OuazzaniTouhami A., Badoc A. et Douira A. (2005). Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine
- Blakeman J.P. et Brodie I.D.S. (1977). Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves.
- Bostock R.M., Wilcox S.M., Wang G., Adaskaveg J.E. (1999). Suppression of *Moniliniafructicolacutinase* production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Byrde R. J. W., et Willetts H. J. (1977). The brown rot fungi of fruit: their biology and control. Pergamon Press, Oxford.
- DE OLIVEIRA LINO, L. (2016). Etude de la variabilité génétique de la sensibilité à la pourriture brune au cours du développement du fruit chez la pêche en lien avec l'évolution des caractéristiques biochimiques du fruit. p.4.
- El Hamouchi A. (2011). Développement d'une méthode de traçage mixte pour *Aureobasidiumpullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5, deux agents antagonistes des maladies fongiques des pommes en conservation. L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, p.3.
- Holb I.J. (2008). Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control. *International Journal of Horticultural Science*.
- Hrustić J., Mihajlović M., Grahovac M., Delibašić G., Bulajić A., Krstić B. et Tanović B. (2012). Genus *Monilinia* on Pome and Stone Fruit Species.
- Hu M., Cox K., Schnabel G. et Luo C. (2011). *Monilinia* Species Causing Brown Rot of Peach in China.

Lesik K. (2013). *Monilinia* species causing fruit brown rot, blossom and twig blight in apple orchards in Belarus. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences

Selmaou K., Boubaker A. et Douira A. (1997). Effet, in vitro et in vivo, de quelques fongicides sur le développement de la pourriture des pommes en conservation due à *Alternaria tenuis* Nees. p.42.

Sharma R., Singh D. et Singh R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological control.