



HAL
open science

Stimuler les défenses des plantes contre botrytis cinerea par des rayonnements UV-C

Hilarion Vasquez

► **To cite this version:**

Hilarion Vasquez. Stimuler les défenses des plantes contre botrytis cinerea par des rayonnements UV-C. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2017. Français. NNT : 2017AVIG0695 . tel-01755100

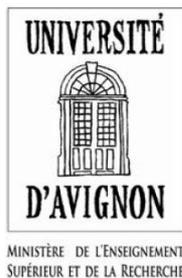
HAL Id: tel-01755100

<https://theses.hal.science/tel-01755100>

Submitted on 30 Mar 2018

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.



Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
Laboratoire de recherche Physiologie des Fruits
et Légumes
Ecole Doctorale n° 536: Sciences et
Agrosiences



Thèse de Physiologie Végétale pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Par
Hilarión Vásquez

**Stimuler les défenses des plantes contre *Botrytis cinerea*
par des rayonnements UV-C**

Date de soutenance: 22 novembre 2017

Composition du jury:

Mohamed El Maataoui (Professeur, Université d'Avignon)	Président
Nathalie Gaveau (MCF-HDR, Université de Reims)	Rapporteur
Bernard Orsal (Professeur, Université de Montpellier)	Rapporteur
Olivier Faure (MCF, Université de St. Etienne)	Examineur
Bernard Caromel (IE, INRA avignon)	Examineur
Laurent Urban (Professeur, Université d'Avignon)	Directeur de thèse
Jawad Aarouf (MCF-HDR-HC, Université d'Avignon)	Co-Directeur de thèse

Résumé

Il y a désormais un consensus autour de l'idée que nous devons réduire l'usage des pesticides (Plan Ecophyto). Il est donc nécessaire de développer des systèmes de cultures réduisant l'utilisation des pesticides au profit d'un système de production dans lequel on stimule les mécanismes de défense «naturels» des plantes. Dans ce contexte, on voit aujourd'hui se développer de nombreuses solutions d'origines chimique ou biologique à base de stimulateurs de défenses des plantes (SDP) mais dont l'efficacité est souvent jugée aléatoire. Dans ce travail, notre choix a porté sur l'utilisation des rayonnements UV-C pour stimuler les défenses de la laitue et de la tomate contre *Botrytis cinerea*. L'idée d'exploiter les rayonnements UV-C, comme stimulateurs des défenses des plantes à intérêt alimentaire en culture, n'a jamais été testée. Nos résultats démontrent clairement un effet stimulateur des défenses des plantes par des doses faibles et répétées d'UV-C (inférieur à 1,70 kJ/m²). Cette stimulation est associée au renforcement de la paroi cellulaire, à l'augmentation des composés phénoliques et à l'augmentation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes. Lorsque le traitement par les rayonnements UV-C est combiné à l'agent biologique *Bacillus subtilis* aucun effet synergique ou même additif n'a été observé par rapport à un traitement simple UV-C ou *B. subtilis*.

Resumen

Se ha establecido en el mundo entero la importancia sobre el control de uno de los principales organismos fitopatológicos como lo es *Botrytis cinérea*, el cual demanda en la actualidad a los productores aplicar controles cónsonos con la protección del medio ambiente. Por consiguiente, se evaluó el uso de diferentes dosis de luz ultravioleta sola o en combinación con un agente de biocontrol (*Basillus subtilis*), con la finalidad de estimular las defensas naturales de dos especies vegetales (lechuga y tomate). Al respecto, los resultados establecieron que dosis menores de 1,70 kJ/m² de UV-C logran disminuir la sensibilidad de las plantas, sin afectar significativamente el desenvolvimiento del aparato fotosintético de ambas especies. Así como, se observó un efecto antagónico del biocontrol sobre la UV-C cuando se combinan.

Abstract

There is now a consensus around the idea that we must reduce the use of pesticides (Plan Ecophyto). It is therefore necessary to develop crop systems that have less need to be protected by pesticides in favor of a production system in which the "natural" defense mechanisms are stimulated. In this context, many solutions of chemical or biological origin based on stimulation of plant defense are now being developed but their effectiveness is often judged to be random. In this work, we chose to use UV-C radiation to stimulate the defenses of lettuce and tomato against *Botrytis cinerea*. The idea of exploiting radiation UV-C, as a stimulant of plant food-borne defenses in culture, has never been tested. Our results clearly demonstrate a stimulatory effect of plant defenses by low and repeated doses of UV-C (less than 1.70 kJ/m²). This stimulation is associated with a reinforcement of the cell wall, an increase in the phenolic compounds and the activity of certain antioxidant enzymes. When treatment with UV-C radiation is combined with a biological agent *Bacillus subtilis*, no synergistic or even additive effect has been observed compared with a simple UV-C or *B. subtilis* treatment.

Remerciements Mesdames et Messieurs les membres du Jury, je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie sincèrement Dr. Nathalie Gaveau et Dr. Bernard Orsal d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur. C'est avec un grand plaisir que je remercie Dr. Olivier Faure et Dr. Bernard Caromel pour leur implication dans le comité de thèse et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues.

J'adresse mes remerciements à Fundayacucho qui grâce à l'accord avec le Ministère des Affaires Étrangères et Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de France, m'a permis de financer ma thèse et de réaliser ce travail.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse Pr. Laurent Urban, pour m'avoir fait confiance dans l'acceptation de mon projet et soutenu tout au long de ces quatre années. Mon beaucoup aidé, ses conseils avisés, ses idées et son agréable humeur. Merci de continuer à me motiver et à m'aider jusqu'au dernier moment.

J'exprime ma gratitude au Dr. Jawad Aarouf, qui a dirigé et coordonné ce travail de thèse. Je le remercie également pour sa patience et son soutien jusqu'aux derniers instants. Et j'exprime ma reconnaissance pour toute l'aide qu'il m'a apporté à la fois lors des manipulations, des interprétations et de la rédaction de ce manuscrit. Merci.

Pour cette dissertation, je remercie particulièrement le Pr. Mohamed El Maataoui pour ses conseils d'expert. Je suis extrêmement reconnaissant pour son soutien actif dans les activités cytohistologiques.

Je tiens à remercier madame Huguette Sallanon directrice du laboratoire de Physiologie des Fruits et Légumes (Agrosciences), pour son accueil au sein de son institut, pour son aide enthousiaste et sa profonde préoccupation pour le plein développement de cette étude. Je suis également reconnaissant au Pr. Félicie Lauri Lopez, au Dr Florence Charles, au Dr. David Roux de l'Institut, pour leur accompagnement lors des activités quotidiennes. Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr. Véronique Vidal, Sandrine Laurent et le Dr. Yves Lizzi collaboration et participation

avec moi dans les activités du laboratoire ainsi que le Dr. Marc Bardin de l'INRA pour leur excellent aide technique. Je n'oublie pas Franck Lacroix, Saad Melha, Emmanuelle Arnoux et Florence Leautier pour son soutien administratif.

Je remercie également mes collègues du bureau: Alejandra, Dounyazade, Kim, Phrutiya, Mônica, Majd, Osama, Sanders, Jean Baptiste et Wael. Les avoir connus, est l'une des meilleures choses que je prends de ce travail, merci pour votre soutien et votre aide.

Enfin, je remercie ma famille: ma mère, les parents de ma femme, a Marialejandra, mes amis et leurs épouses, et ma femme pour être arrivé jusqu'ici. Spécialement, Je suis très endetté à Soraya et mes deux fils (Sorahili et Stéphane), que Dieu les payés.

J'ai le plaisir d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail. À ceux qui ne sont pas toujours avec moi.

Dedicase

Je consacre cette thèse à mon Dieu tout-puissant qui m'a donné de la sagesse pour enquêter sur ces études, m'a appris la force pour surmonter les difficultés, suggéré une vision pour le monde et m'a toujours conduit sur un chemin.

A Sorahili
et Stephane.

<u>Chapitre I: Synthèse bibliographique</u>	1
A/ CONTEXTE GENERAL	2
B/ LES RESISTANCES AUX BIOAGRESSEURS CHEZ LES VEGETAUX	4
1/ La réaction d'hypersensibilité	5
2/ Les messagers de la défense	5
3/ Les réponses défensives à l'infection	6
3.1/ <i>Renforcement des parois cellulaires</i>	6
3.2/ <i>Les protéines Pathogenesis-Related (protéines PR)</i>	7
3.3/ <i>Phytoalexines</i>	7
C/ PRESENTATION DU PATHOGENE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	8
D/ MOYENS DE LUTTE	10
1/ La lutte chimique	11
2/ Les méthodes alternatives	13
2.1/ <i>Pratiques culturales et mesures prophylactiques</i>	13
2.2/ <i>Contrôle physiologique</i>	14
2.3/ <i>Utilisation des outils génétiques</i>	15
2.4/ <i>Protection biologique</i>	15
2.4.1/ <i>Composés minéraux et organiques</i>	16
2.4.2/ <i>Extraits de plantes</i>	16
2.4.3/ <i>Agents microbiens</i>	17
E/ LUTTE PHYSIQUE	20
1/ La lutte mécanique	20
2/ La lutte pneumatique	21
3/ La lutte thermique	21
4/ La lutte électromagnétique	21
5/ L'utilisation des rayonnements ultraviolets	21

<u>Chapitre II : Les rayonnements UV-C, un moyen pour stimuler les défenses de la laitue en cours de culture contre <i>Botrytis cinerea</i> (Scientia Horticulturae 222 : 32-39, 2017)</u>	29
A/ ORIGINE ET DIVERSITE DE LA LAITUE	30
1/ Présentation	30
2/ Les différents cultigroupes de laitue et production	31
3/ Préférences pédo-climatiques et fertilisation	32
4/ Composition et conditions de conservation et de transport	33
5/ Principales maladies de la laitue	33
B/ PRE HARVEST HORMETIC DOSES OF UV-C RADIATION CAN DECREASE SUSCEPTIBILITY OF LETTUCE LEAVES (LACTUCA SATIVA L.) TO BOTRYTIS CINEREA L.	35
RESUME	36
1/ Abstract	37
2/ Introduction	38
3/ Materials and methods	40
3.1/ <i>Production of plant material and UV-C treatment</i>	40
3.2/ <i>Measurements of Chlorophyll (a) fluorescence using the Handy PEA</i>	41
3.3/ <i>Epidermal cells microscopy observations</i>	41
3.4/ <i>Chlorophyll and carotenoid contents</i>	42
3.5/ <i>Lipid peroxidation</i>	42
3.6 <i>Determination of total phenolic compounds</i>	42
3.7/ <i>Phenylalanine ammonia lyase activity</i>	43
3.8/ <i>Antioxidant enzyme activities</i>	43
3.9/ <i>Pathogen culture and inoculation tests on leaves</i>	44

3.10/ Histopathological study	45
3.11/ Statistical analyses	45
4. Results	46
4.1/ Identification of a non-deleterious dose of UV-C	46
4.1.2. Microscopic observations of the epidermal cells	46
4.1.3. Determination of pigments and malondialdehyde	48
4.2/ Resistance to <i>B. cinerea</i> after irradiation with UV-C	49
4.2.1. Effect of a single exposure to UV-C radiation	49
4.2.2. Effect of four successive exposures to UV-C radiation	49
4.3/ Physiological plant responses of four successive doses of UV-C radiation	52
4.3.1. Parameters derived from chlorophyll fluorescence measurements	52
4.3.2. Pigments, malondialdehyde, total phenols and enzymatic activities	52
5. Discussion	56
<u>Chapitre III: Les rayonnements UV-C, un moyen pour stimuler les défenses de la tomate en cours de culture contre <i>Botrytis cinerea</i></u>	60
A/ ORIGINE ET DIVERSITE DE LA TOMATE	61
1/ Présentation	61
2/ La production de tomate	62
3/ Préférences pédo-climatiques et fertilisation	62
4/ Composition et conditions de conservation et de transport	62

5/ Principales maladies de la tomate	64
B/ LES RAYONNEMENTS UV-C, UN MOYEN POUR STIMULER LES DEFENSES DE LA TOMATE CONTRE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> EN COURS DE CULTURE	66
1/ Résumé	66
2/ Introduction	67
3/ Matériels et méthodes	68
3.1/ <i>Matériel végétal</i>	68
3.2/ <i>Traitements aux rayonnements UV-C</i>	69
3.3/ <i>Mesures de la fluorescence</i>	70
3.4/ <i>Détermination de la teneur en chlorophylle totale et des caroténoïdes</i>	70
3.5/ <i>Dosage du Malondialdéhyde (MDA)</i>	71
3.6/ <i>Dosage et caractérisation des polyphénols</i>	71
3.7/ <i>Activité de la phénylalanine ammoniacque (PAL)</i>	72
3.8/ <i>Activités enzymatiques antioxydantes</i>	73
3.9/ <i>Matériel fongique et tests phytopathologiques</i>	74
3.10/ <i>Observations microscopiques</i>	75
3.11/ <i>Analyses statistiques</i>	76
4/ Résultats	76
4.1/ <i>Tests phytopathologiques</i>	76
4.2/ <i>Dosage du Malondialdéhyde (MDA)</i>	77
4.3/ <i>Dosage des pigments</i>	78
4.4/ <i>Etude cytologique</i>	78
4.5/ <i>Dosage des composés phénoliques</i>	79
4.6/ <i>Dosage de la PAL</i>	80
4.7/ <i>Dosage des enzymes antioxydante</i>	80
4.8/ <i>Mesures de la fluorescence</i>	81
5/ Discussion	83

<u>Chapitre IV: Optimisation de la stimulation des défenses de la laitue et de la tomate (combinaison des UV-C avec un agent de lutte biologique)</u>	87
1/ Résumé	88
2/ Introduction	89
3/ Matériels et méthodes	91
3.1/ <i>Matériel végétal</i>	91
3.2/ <i>Traitements aux rayonnements UV-C</i>	92
3.3/ <i>Traitement de biocontrôle</i>	92
3.4/ <i>Matériel fongique et tests phytopathologiques</i>	92
3.5/ <i>Analyses statistiques</i>	93
4/ Résultats	93
5/ Discussion	97
<u>Chapitre V: Discussion générale/Conclusion et perspectives</u>	99
A/ DISCUSSION GENERALE	100
B/ CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
<u>Annexe: Article en cours de rédaction</u>	108
<u>Bibliographie</u>	110

Chapitre I

Contexte général et **Synthèse bibliographique**

A/ CONTEXTE GENERAL

Les pesticides, notamment les fongicides, sont utilisés pour détruire à la source les agresseurs biotiques qui menacent les plantes et la productivité des cultures. Les pesticides sont généralement efficaces, en tout cas à court terme, mais différentes raisons doivent nous amener à limiter voire supprimer leur usage. Les pesticides sont en effet à l'origine de pollutions très néfastes pour l'environnement et les consommateurs, et leur utilisation augmente les coûts de production (Chaves and Wang, 2004; Legard *et al.*, 2005; Lizcano, 2007). Par ailleurs, les maladies et les ravageurs réussissent presque toujours à développer des résistances qui obligent à développer en permanence de nouvelles molécules dans une fuite en avant sans fin. Depuis un certain nombre d'années, une nouvelle stratégie alternative se développe. Elle vise non plus à détruire les agresseurs biotiques pour protéger les cultures mais à admettre un certain niveau d'agression en stimulant les défenses "naturelles" des plantes dans le cadre d'une stratégie de gestion des maladies et des ravageurs authentiquement durable (Osorio *et al.*, 2007). On parle de stimulateurs de défenses des plantes (SDP) ou stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN) qui ont une origine naturelle ou non. De nombreuses spécialités commerciales sont proposées, dotées de spectres d'action plus ou moins larges (Butault *et al.*, 2010). Les SDP connus sont des agents de synthèse chimique ou des produits d'extraits biologiques. Dans tous les cas, ils posent des problèmes de formulation et peuvent exiger des études de toxicité qui rendent leur développement coûteux. A l'heure actuelle, on pense que c'est une combinaison de solutions plutôt qu'une solution unique qui permettra de gérer la question des défenses des cultures contre les maladies. Il y aurait beaucoup d'intérêt à développer des SDP physiques dans la mesure où ils complèteraient bien les SDP chimiques et biologiques. Par ailleurs, les SDP physiques ne posent a priori pas de problèmes de formulation ni de toxicité environnementale et humaine (Benhamou and Picard 1999; Blanchard and Limache 2005; Piasentin 2009; Benhamou and Rey 2012).

Parmi les facteurs physiques susceptibles de stimuler les défenses des plantes, on a identifié depuis longtemps le manque d'eau, les températures excessivement élevées ou basses. Plus récemment, les nombreux travaux

réalisés dans le cadre de la thématique du changement climatique ont confirmé le rôle stimulant pour les défenses des plantes des rayonnements UV-B (Tsormpatsidis *et al*, 2007). Malheureusement, exploiter les UV-B pose des problèmes concrets (Nogués *et al*, 1998). En général une exposition prolongée est requise pour être efficace et les expositions prolongées sont difficiles à imposer dans la pratique. D'où l'idée de ce projet d'exploiter les UV-C, plus fortement énergétiques, en lieu et place des UV-B, pendant des temps beaucoup plus courts, plus faciles à gérer (Hollósy 2002).

L'objectif de ma thèse est donc d'étudier l'effet des rayonnements UV-C comme moyen de stimulation des défenses de deux espèces de plantes (la laitue et la tomate) contre *Botrytis cinerea* et de combiner cette méthode physique avec une méthode de lutte biologique.

B/ LES RESISTANCES AUX BIOAGRESSEURS CHEZ LES VEGETAUX

Dans leur environnement naturel, les plantes sont confrontées aux attaques de nombreux agents pathogènes. Pour s'opposer à ces agresseurs, les plantes possèdent et/ou développent plusieurs stratégies de défense. On distingue les résistances constitutives qui sont déterminées par des facteurs préexistants avant tout contact avec l'agent pathogène et les résistances induites qui se mettent en place à la suite de la rencontre des deux protagonistes (Figure 1). Toutes ces résistances sont contrôlées au niveau génétique, par un seul gène (résistance monogénique) ou par plusieurs gènes (résistance polygénique) (Biffen, 1905).

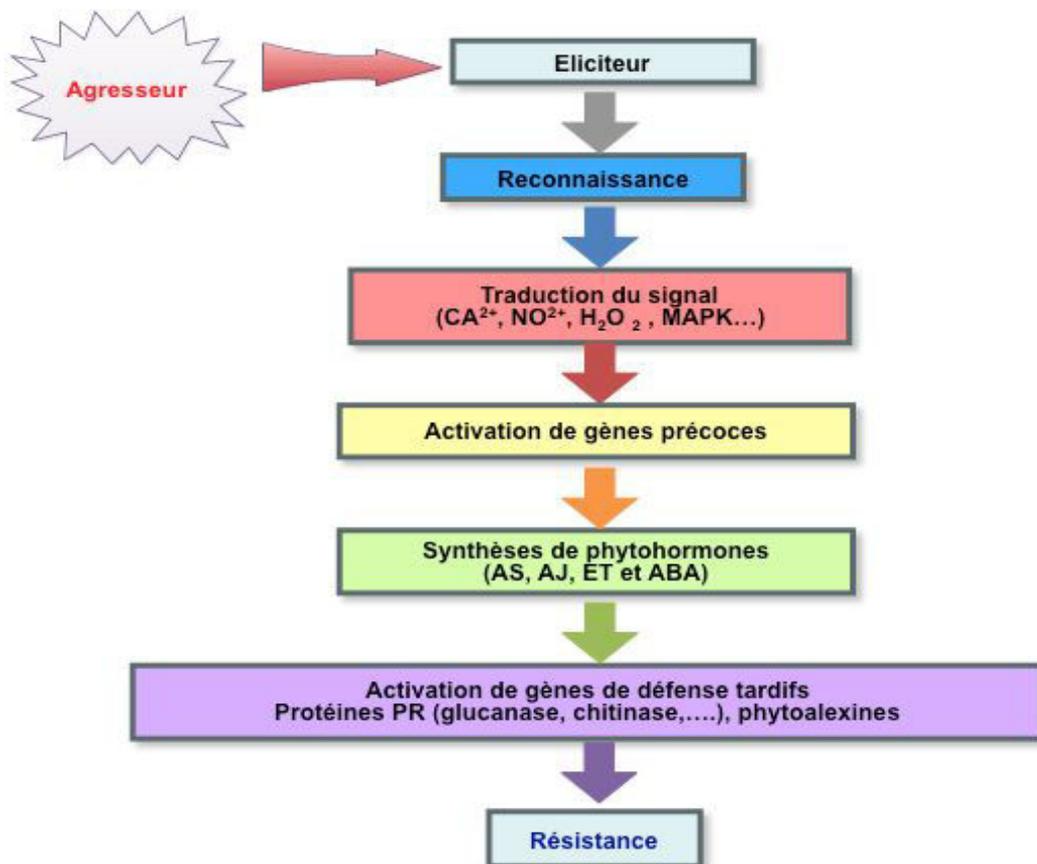


Figure 1: Schéma simplifié des réactions de défense induites dans les interactions plantes/agents pathogènes.

Bien que dépourvue d'un système immunitaire évolué, chaque plante n'est sensible qu'à quelques bioagresseurs: "la maladie est plutôt l'exception". Les plantes possèdent des barrières mécaniques préformées, la cuticule et la paroi pectocellulosique qui leur confèrent une résistance constitutive passive. Dans le

cas où l'agent pathogène est capable de franchir ces barrières, la plante peut induire des systèmes de défense, il s'agit d'une résistance active. Les mécanismes de défense active peuvent débiter par la réaction d'hypersensibilité (HR).

1/ La réaction d'hypersensibilité

La réaction d'hypersensibilité est un mécanisme naturel de défense induite chez les plantes contre les pathogènes, se traduisant par une réaction localisée. Cette réaction de sensibilité exacerbée des cellules à l'infection est de forte intensité et de courte durée. Elle est le résultat d'un processus actif contrôlé génétiquement entraînant la mort programmée d'un nombre limité de cellules hôtes entourant le site d'infection et permet de circonscrire le pathogène et d'empêcher sa multiplication et sa migration. Cette réaction est le résultat d'une forte augmentation de la consommation d'oxygène et d'une production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS: H_2O_2 , $HO\cdot$, $O_2\cdot^-$). Ce burst oxydatif permet de catalyser le renforcement des barrières physiques mais il est aussi impliqué dans le signal des mécanismes de défense plus tardifs (activation des gènes codant pour les protéines liées à la pathogénie PR, inhibition de protéases...).

2/ Les messagers de la défense

Les mécanismes de défense mis en place ne se limitent pas à la proximité du site d'infection. La plante développe une réponse systémique, état de résistance généralisé, qui permet de la protéger contre des attaques ultérieures de bioagresseurs. Cet état, proche de l'immunité animale, apparaît quelques heures après la reconnaissance plante-pathogène et implique la diffusion du signal aux cellules saines à l'aide de messagers secondaires (Benhamou, 2009). Les messagers secondaires, alertent les cellules entourant la zone d'attaque et l'ensemble de la plante, et dévient leur métabolisme vers la lutte contre l'agression. Ces messagers sont de nature polysaccharidique et proviennent de la dégradation des parois du pathogène sous l'action des hydrolases de l'hôte ou de la dégradation des parois des cellules végétales hydrolysées par les enzymes du pathogène (Turelli *et al.*, 1982). Le rôle des messagers secondaires est aussi attribué à des phytohormones comme

l'éthylène, l'acide salicylique, l'acide jasmonique ou encore l'acide abscissique. Ces composés, qui sont le résultat de l'activation des gènes précoces, jouent un rôle dans l'induction de la résistance systémique acquise en activant à leur tour des gènes de défense tardifs et la production d'une diversité de composés issus du métabolisme secondaire, comme des protéines de défense et diverses phytoalexines (Ryals *et al.*, 1996; Benhamou, 2009). Ces molécules et particulièrement les molécules phénoliques de petite taille ont aussi un rôle antimicrobien direct.

3/ Les réponses défensives à l'infection

Lorsqu'une plante est attaquée, de multiples enzymes sont activées, comme les polyphénol-oxydases et les peroxydases. En conséquence, des composés sont néoformés et d'autres sont synthétisés en plus forte concentration. Ces composés permettent le renforcement des parois cellulaires de l'hôte, le blocage du développement et la neutralisation du parasite.

3.1/ Renforcement des parois cellulaires

La paroi étant le premier obstacle que rencontrent les parasites, les plantes ont mis en place des mécanismes de défense par incorporation réactionnelle de lignine, subérine, callose ou glycoprotéines. Ces dépôts contribuent à la rigidification de la paroi que de nombreux micro-organismes sont alors incapables de dégrader et de franchir (Duhoux et Nicole, 2004). Ces appositions peuvent se limiter au point de pénétration de l'hyphe et former une papille, ou constituer une encapsulation complète des structures étrangères. Ces mécanismes physiques, ralentissant la pénétration du pathogène, permettent à la plante d'activer les autres voies de biosynthèse de molécules à action antimicrobienne directe (protéines PR, phytoalexines...) (Benhamou, 1996). Des glycoprotéines structurales riches en hydroxyproline (HRGP) s'accumulent aussi dans les parois et participent à la défense mécanique de la plante contre les bioagresseurs (Lepoivre, 2003). La synthèse, par les plantes, des inhibiteurs des polygalacturonases (enzymes lytiques de la paroi) permet la conservation de l'intégrité des structures des parois végétales (Cervone *et al.*, 1993).

3.2/ Les protéines Pathogenesis-Related (protéines PR)

Les protéines PR ont été mises en évidence dans les feuilles de tabac après une hypersensibilité vis-à-vis du virus de la mosaïque de tabac (Gianinazzi, 1970). Il s'agit de 14 classes de protéines induites lors d'un stress biotique ou abiotique (Van Loon *et al.*, 1994). Leur fonction biologique n'est définie que pour certaines : Glucanase (PR2), Chitinase (PR 3, PR8, PR11), Peroxydase (PR9), Inhibiteur de protéases (PR6, PR7), Ribonucléase (PR10). De nombreuses autres PR ont été découvertes ces dernières années.

3.3/ Les phytoalexines

Les phytoalexines sont des molécules dont la synthèse est induite chez les végétaux en réponse à différents facteurs de stress biotiques et abiotiques et qui possèdent un pouvoir inhibiteur à l'égard d'un large éventail de micro-organismes. Elles présentent des structures chimiques variées mais caractéristiques de la famille végétale : isoflavonoïdes chez les Légumineuses, sesquiterpénoïdes chez les Solanacées, polyacétylènes chez les Composées, diterpènes chez les Graminées (Lepoivre, 2003). Il existe une corrélation étroite entre l'ampleur et la vitesse de leur apparition dans une cellule végétale et le blocage du développement des pathogènes.

Toxique pour les parasites, les phytoalexines le sont aussi, à forte concentration, pour les plantes hôtes (Shirashi *et al.*, 1975 ; Kobayashi *et al.*, 1995). Leur accumulation au cours de la réaction d'hypersensibilité est en grande partie responsable de la mort des cellules qui constitue la nécrose bloquante.

C/ PRESENTATION DU PATHOGENE *BOTRYTIS CINEREA*

Botrytis cinerea est un ascomycète (tableau 1) pathogène, ubiquiste et très polyphage. Ce champignon est responsable de pourritures sur un grand nombre de plantes hôtes d'importances économiques en agriculture. Il attaque plus de 200 espèces de cultures dans le monde (Govrin, and Levine, 2000 ; Lecompte *et al.*, 2013).

Tableau 1. Taxonomie de *Botrytis cinerea* (Source: Card 2005).

Royaume	Fungi
Phylum ou Division	Ascomycota
Classe	Ascomycete
ordre	Helotiales
Famille	Sclérotiniaceae
Genre	Botryotinia
Espèce	<i>Botrytis cinerea</i>

On le retrouve dans toutes les zones de production du monde (Elad *et al.*, 2004). En France, on peut le trouver aussi bien sous abris qu'en plein champ. Cependant, c'est sous abris que les attaques de *B. cinerea* sont les plus sévères étant donné la forte hygrométrie (Chaves and Wang 2004). Les conditions favorables au développement de *B. cinerea* sont engendrées par une humidité relative importante, en particulier pendant la période de floraison, (entre 80 et 90 % HR) (Wilcox and Seem 1994), des températures comprises entre 17 et 23 °C surtout pendant les mois d'hiver (Wang *et al.*, 1986), mais aussi par l'apport d'une importante quantité de fumures azotées (Raynal *et al.*, 2014).

Le cycle de développement de *B. cinerea* est résumé dans la figure 2. Durant l'hiver, *B. cinerea* survit dans les débris des végétaux sous diverses formes comme les conidies, les mycéliums et les sclérotés qui ont la propriété de persister dans le sol plusieurs années (Klaus, 2007). De plus, son mode saprophyte lui permet de se conserver facilement dans la matière organique. Comme *B. cinerea* est très polyphage, il peut attaquer des centaines de plantes

cultivées et adventices qui pourront constituer par la suite une source d'inoculum (Elad, 1997).

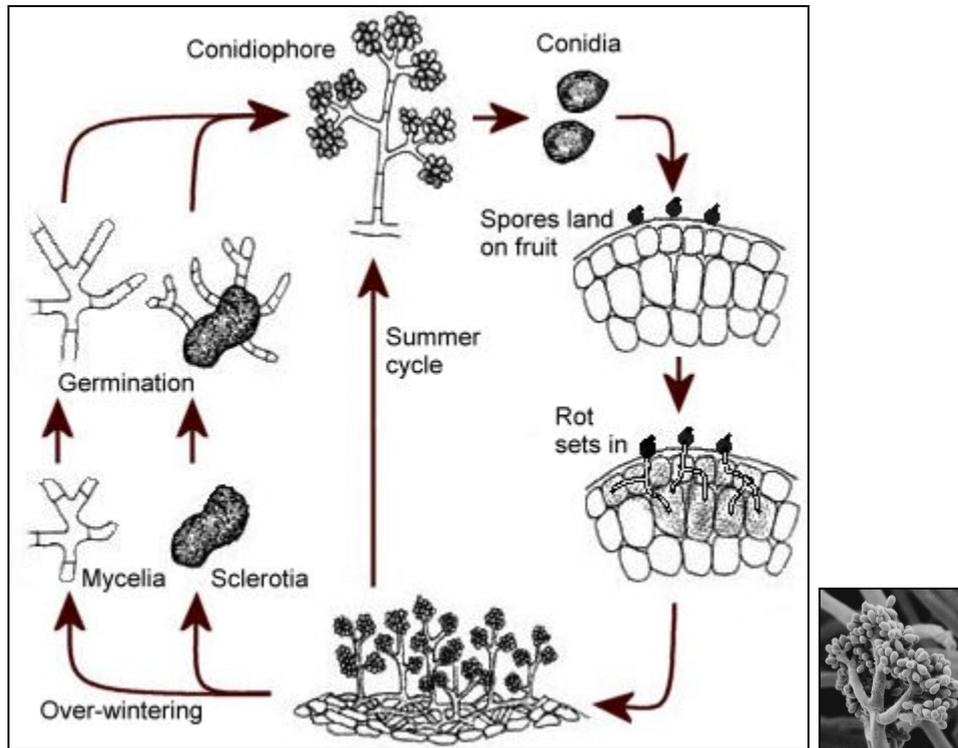


Figure 2 : Cycle de vie de *Botrytis cinerea*, (source Agrios 2005).

Lorsque les conditions redeviennent favorables, les sclérotés ou les mycéliums produisent beaucoup de conidies qui se propagent dans l'air et peuvent ainsi se déposer sur les feuilles et germer en présence d'eau (Muvunyi 2012). De plus, les sclérotés présents à proximité des feuilles en contact avec le sol peuvent également germer et former du mycélium qui les colonisera (Elad, 1996). Le tube germinatif des conidies et le mycélium des sclérotés vont par la suite pénétrer dans les tissus, dans le parenchyme foliaire en détruisant les parois des cellules et leur contenu (Jarvis, 1989). Le champignon pénètre alors soit directement par la cuticule soit par les blessures déjà présentes au moment de la colonisation (Muvunyi 2012,). Une fois sur la plante hôte, la pénétration de l'agent pathogène est facilitée par la pression mécanique exercée par le développement de l'appressorium, en générant une turgescence par l'accumulation de glycérol (Hege et Fluhr, 2007). En quelques jours *B. cinerea* colonise rapidement tous les tissus en hydrolysant les composés pectiques

présents dans les parois des cellules (Blancard *et al.*, 2003). Il s'agit d'un pathogène nécrotrophe (Elad, 1996).

Les attaques de *B. cinerea* ne se limitent pas à un seul organe. En effet, il colonise principalement les feuilles sénescents en contact avec le sol mais il peut également attaquer le reste de la partie aérienne, les inflorescences et les fruits. Les producteurs le craignent en raison de ses effets dévastateur sur la production (Wilson *et al.*, 1997; Leroux *et al.*, 2002). Pour ce qui est des symptômes, on observe sur les feuilles sénescents une pourriture humide marron à brune (Beliard, 2003). Et sur les jeunes feuilles, on observe des tâches humides et brunes qui se développent surtout en bordure du limbe. Enfin, sur les inflorescences, *B. cinerea* provoque une pourriture qui contamine les graines récoltables chez certaines espèces (Hayes et Edward 2007). Quel que soit la partie de la plante attaquée par le pathogène, les tissus se couvrent d'un feutrage gris caractéristique, constitué des fructifications du champignon. Quelques fois, on peut observer des sclérotés sur la surface colonisée (Blancard *et al.*, 2003).

E/ MOYENS DE LUTTE :

Un grand nombre de plantes cultivées est sensible à divers pathogènes. L'application des pesticides constitue actuellement le principal moyen de lutte des plantes contre ces bioagresseurs. Cette stratégie peut être efficace mais l'emploi répété de ces substances génère des problèmes de pollution, ainsi que l'apparition et l'extension rapide de souches de pathogènes résistants (Russell 1995).

Les problèmes environnementaux liés à la protection des cultures sont de plus en plus préoccupants. Le plan Ecophyto 2025 est l'une des mesures prise par le Grenelle de l'environnement visant à réduire de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires jugés trop dangereux sur l'équilibre et la survie des écosystèmes.

1/ La lutte chimique

L'agriculteur utilise de manière conventionnelle de nombreux pesticides qu'il répand sur les cultures souvent de manière non raisonnée afin de lutter contre les bioagresseurs. Ainsi, l'utilisation fréquente des fongicides a conduit au développement de souches de bioagresseurs résistants (Wang *et al.*, 1986; Leroux *et al.*, 2002). En ce qui concerne l'attaque de *B. cinerea* sur laitue, les agriculteurs utilisent généralement des fongicides, homologués en France, comme le Signum®, Rovral® Aquaflo, Rovral® WG (iprodione), qui sont des fongicides communs avec d'autres champignons phytopathogènes et ayant une action générale. Mais ils utilisent également des fongicides ayant une action plus spécifique contre *Botrytis* comme le Scala® (pyriméthanil) (Elad *et al.*, 2004, Charles *et al.*, 2000) ou cyprodinil (Couderchet 2003).

Ces pesticides sont constitués le plus souvent de plusieurs matières actives ayant chacune des propriétés et des modes d'actions différents. Ex: Signum® est composé de deux matières actives aux propriétés complémentaires: la première est la pyraclostrobine, de la famille des strobilurines (QoI). La pyraclostrobine (QoI) inhibe la respiration mitochondriale, ce qui a pour effet de bloquer la production d'ATP, indispensable aux fonctions vitales du champignon (Karadimos *et al.*, 2005; Khana and Smith 2005). La deuxième est le boscalide de la famille des carboxamides (SDHI) (Avenot and Michailides 2007). Ce dernier (SDHI) bloque deux voies biochimiques vitales pour le champignon: la dégradation ultime de molécules énergétiques au niveau du cycle de Krebs et le transport des électrons au sein du complexe II et donc la production d'ATP (Avenot *et al.*, 2009).

L'utilisation des pesticides dans la lutte contre les bioagresseurs génère énormément d'inconvénients qui ne sont malheureusement pas compensés par leur efficacité. En effet, l'emploi répété des substances actives peut générer l'apparition et l'extension rapide de souches de pathogènes résistantes (Veloukas *et al.*, 2011 ; Stammler *et al.*, 2007) (tableau 2).

Tableau 2: Fongicides utilisés contre Botrytis et niveau de résistance (Source: Hahn 2014).

Classe de fongicide	Site cible / mode d'action	Risque de résistance
Dithiocarbamates (thiram, mancozeb)	Inhibiteur multisite; groupes Thiol	Faible
Phthalimides (captan)	Inhibiteur multisite; groupes Thiol	Faible
Benzimidazoles (carbendazim, thiophanate-methyl)	β -Tubulin	Haute
Dicarboximides (iprodione, vinchlozolinb)	Osmodétection Histidina kinase	Moyen à élevé
Anilinopyrimidines (cyprodinil, pyrimethanil)	Inconnu	Moyen
Phenylpyrroles (fludioxonil)	Osmoregulation	Faible
Qols/strobilurins	Complexe Cytochrome bc1 (respiration)	Haute
Hydroxyanilides (fenhexamid)	3-Ketoreductase (biosynthèse de steroI)	Faible à moyen
SDHs (boscalid)	Succinate dehydrogenase (respiration)	Moyen à élevé

De plus, l'apparition de résistances aux pesticides utilisés conduit à des pertes d'efficacité, à l'augmentation des doses appliquées et à terme, à l'abandon de substances actives pouvant entraîner des difficultés au niveau de la protection phytosanitaire dans certains cas (Capeland *et al.*, 1999). Actuellement, on observe des résistances à la majorité des familles de fongicides utilisées contre *B. cinerea* (Couderchet, 2003; Leroux, 2004).

Outre le fait d'engendrer des résistances, les pesticides polluent dangereusement l'environnement (Pedigo & Higley 1992). Il devient donc impératif de trouver des alternatives à ces pesticides non dangereuses pour l'environnement et la santé humaine (Charles *et al.*, 2008c).

2/ Méthodes alternatives

Il existe des méthodes alternatives à la lutte chimique qui peuvent être efficaces sans polluer ni affecter la santé humaine mais qui restent cependant très peu utilisées. La gestion des maladies phytopathologiques par l'éloignement des pathogènes, la manipulation de l'environnement, la sélection conventionnelle et/ou le traitement avant la récolte avec des éliciteurs/activateurs de plantes, dont la plupart sont des composés phénoliques, peut conduire au contrôle des entités biotiques indésirables (Osorio *et al.* 2007) et à l'amélioration de la santé humaine (Terry *et al.* 2004).

2.1/ Pratiques culturales et mesures prophylactiques

Selon Bernard et Bugaret (2002) la prophylaxie en matière de protection des végétaux représente l'ensemble des mesures pouvant être conseillées afin de prévenir ou défavoriser l'installation d'un organisme nuisible et son développement dommageable sur un territoire déterminé. La prophylaxie repose sur des moyens directs visant à éloigner ou à combattre l'organisme indésirable en situation de nuire ou sur des mesures indirectes ayant pour objectif de minimiser ou de rendre impossible l'expression de la nuisibilité de l'organisme considéré.

Une gestion culturelle maîtrisée peut être un moyen puissant pour réduire de façon drastique les maladies chez les végétaux. Dans le cas de *Botrytis cinerea*, ces mesures consistent à une meilleure gestion de l'humidité et de la température autour des végétaux, à maîtriser l'entrée et l'accumulation

d'inoculum (Elad and Shtienberg 1995), à nettoyer les structures (serres), les équipements (caisses, petits outils) et le matériel agricole (rinçage des roues de tracteur), mais aussi en éliminant les plantes malades, les foyers de ravageurs et les déchets de cultures. Pareillement, une planification des rotations et des assolements permet de limiter les épidémies (Navarrete *et al.*, 2010).

2.2/ Contrôle physiologique

En plus de l'oxygène, du dioxyde de carbone et de l'eau, les plantes ont besoin de plusieurs éléments minéraux pour une nutrition adéquate (Mengel *et al.*, 2001). Une carence dans l'un de ces éléments minéraux réduit la croissance des plantes et le rendement des cultures. Les plantes acquièrent généralement leurs éléments minéraux à partir du sol. Il est reconnu depuis longtemps que l'état nutritionnel de la plante peut déterminer sa sensibilité ou sa résistance aux maladies. La colonisation des plantes par des agents pathogènes nécessite l'utilisation efficace des ressources disponibles dans les tissus hôtes (Snoeiijers *et al.*, 2000). Les nutriments minéraux agissent sur le développement et la croissance de la plante, ils agissent sur la distribution des molécules qui peuvent être utilisées par le pathogène et ils stimulent les mécanismes de défense chez la plante. En particulier, l'azote influence fortement les interactions hôte-pathogènes (Huber et Watson, 1974). Il peut être favorable ou défavorable au développement de la maladie en fonction de l'agent pathogène et de la plante. Pour certains agents pathogènes, une forte disponibilité en azote défavorise le développement de la maladie. Hoffland *et al.*, (1999) ont montré qu'il y a une forte corrélation positive entre la sensibilité de la tomate à *B. cinerea* et le rapport C/N. Par exemple, les feuilles de tomates cultivées sous faible disponibilité en azote dont le rapport C/N est élevé (21 g/g) ont été environ 2,5 fois plus sensibles à la formation de lésion de *B. cinerea* que les feuilles dont le rapport C/N est faible (11 g/g) (Hoffland *et al.*, 1999). Cette relation entre le rapport C/N et la sensibilité à *B. cinerea* s'explique par le fait que les feuilles avec C/N élevé contiennent plus de glucides solubles qui sont corrélés positivement avec la sensibilité au pathogène. Sur la laitue, au contraire, des réactions opposées ont été observées entre des souches de *Botrytis*, favorisées par élevés teneurs d'azote dans les plantes (Lecompte *et al.*, 2010).

2.3/ Utilisation des outils génétiques

La lutte génétique repose sur l'utilisation de variétés de plantes suffisamment résistantes pour assurer un contrôle durable des populations pathogènes. L'utilisation de gènes de résistance aux bioagresseurs est un moyen efficace et une méthode respectueuse de l'environnement pour la gestion de ces parasites. D'après Dik et Wubben (2004) il n'existe aucune variété commerciale résistante à la pourriture grise pour l'ensemble des cultures attaquées par le champignon. Cependant, de nombreuses plantes présentent des niveaux de sensibilité variable d'origine génétique. Chez la tomate, la résistance à *B. cinerea* est quantitative et liée à différents gènes de résistance chez l'hôte (Dik and Wubben, 2004; Finkers *et al.*, 2008). Une résistance partielle liée à trois QTL a été identifiée chez une variété sauvage de la tomate *Solanum habrochaites* LYC4 (Finkers *et al.*, 2008).

2.4/ Protection biologique

L'objectif n'est pas de stopper totalement les maladies, mais plutôt de réguler leur progression de manière à les maintenir en-dessous d'un seuil acceptable. La définition officielle par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) stipule que la protection biologique est «l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs». Cette méthode vise donc à identifier des auxiliaires efficaces et optimiser leur utilisation afin de lutter contre des espèces invasives et contre des organismes pathogènes difficilement maîtrisables par les luttes classiques. Le principe de la lutte biologique est basé sur l'exploitation par l'homme et à son profit d'une relation naturelle entre deux êtres vivants:

- la **cible** est un organisme indésirable, pathogène ou ravageur d'une plante cultivée, mauvaise herbe, etc.

- l'**agent** de protection (ou auxiliaire dans le cas des ravageurs) est un organisme différent, le plus souvent un parasite (ou parasitoïde), un prédateur ou un agent pathogène du premier, qui le tue à plus ou moins brève échéance, éventuellement en s'en nourrissant, ou tout au moins qui limite son développement.

Cette définition est actuellement élargie à tous les produits ou extrait

d'origine végétale. La protection biologique accepte donc les composés minéraux et organiques, les extraits des plantes, etc.

2.4.1/ Composés minéraux et organiques

Les composés minéraux et organiques peuvent être utilisés comme fongicides d'origine naturelle pour le contrôle des agents pathogènes des plantes (Tripathi and Dubey, 2004). Plusieurs sels comme le chlorure de calcium (CaCl_2), la carbonate de potassium (K_2CO_3), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et le carbonate de sodium (Na_2CO_3) peuvent réduire la croissance mycélienne de *B. cinerea* *in vitro* sur un milieu glucose-agar (Nigro *et al.*, 2006). La carbonate de potassium, le bicarbonate de sodium et le carbonate de sodium ont montré un effet similaire *in vivo* avec réduction de l'incidence de la pourriture grise sur les baies de raisins (Nigro *et al.*, 2006). Le chitosan qui est une forme soluble de la chitine et ses dérivés est utilisé surtout comme agent de lutte contre *B. cinerea* en protection post-récolte. Ce produit induit une résistance dans le fruit et n'inhibe pas directement l'agent pathogène (El-Ghaouth *et al.*, 1997).

2.4.2/ Extraits de plantes

Le contrôle des bioagresseurs par des extraits végétaux (biopesticides) a longtemps été réalisé de manière traditionnelle et donc leur utilisation repose souvent sur des bases empiriques. En ce qui concerne *B. cinerea*, un extrait de feuilles de la Renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis*) a été décrit comme un éliciteur de défense de la vigne contre *B. cinerea* (Carlen *et al.*, 2003). Le mélange d'extraits d'algues et de chlorure d'aluminium (AlCl_3), contenus dans le produit Synermix, induit l'accumulation de resvératrol, composé phénolique antimicrobien, dans les feuilles de vigne (Jeandet *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 1996). La propolis est une résine végétale utilisée par les abeilles comme anti-infectieux pour assainir la ruche. De consistance visqueuse, elle est recueillie par les abeilles sur certaines parties des végétaux. Elle est produite sur certains conifères et sur les bourgeons de plusieurs espèces d'arbre. La propolis contient des protéines, des acides aminés, des vitamines, des minéraux et des flavonoïdes (Marcucci, 1995; Walker and Crane,

1987). Elle a une activité antibiotique, antibactérienne et antifongique (Tosi *et al.*, 1996). Cependant un point limitant dans l'utilisation de ces molécules est lié à la difficulté de leurs productions en grandes quantités et leur formulation.

2.4.3/ Agents microbiens

La protection biologique contre *B. cinerea* à l'aide de microorganismes antagonistes, champignons filamenteux, levures et bactéries, a été intensivement étudiée au cours des dernières décennies (Tableau 3) (Droby *et al.*, 2009; Elmer and Reglinski, 2006; Janisiewicz, 1998; Mari *et al.*, 2003; Paulitz and Belanger, 2001; Van Lenteren, 2000).

Des travaux menés par l'unité de Pathologie végétale de l'INRA d'Avignon depuis 1990 ont montré que le champignon *Microdochium dimerum*, souche L13, a une bonne efficacité pour protéger les plaies d'effeuillage et les feuilles de plants de tomates contre les attaques de *B. cinerea* en cultures sous abris (Bardin *et al.*, 2008; Nicot *et al.*, 2003). Un certain nombre de levures (dont *Pichia* et *Rhodotorula*) et de bactéries (dont *Bacillus* et *Pseudomonas*) ont également été signalées pour leur efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* en traitement post-récolte (Buck and Jeffers, 2004; De Meyer and Hofte, 1997; Elad *et al.*, 1994b; Guetsky *et al.*, 2002). Il a été rapporté aussi que l'une des alternatives bio-contrôle est l'utilisation de *Bacillus subtilis* contre *B. cinerea* chez le fraisier (Sutton y Peng, 1993; Hang *et al.*, 2005; Donmez *et al.*, 2011), la laitue (Fiddaman *et al.*, 2000; Arkhipova *et al.*, 2005; Srimai and Akarapisarn 2014), la vigne (Magnin *et al.*, 2007), la pomme (Touré *et al.*, 2004), l'avocat (Korsten and De Jager 1995), le haricot (Ongena *et al.*, 2007) et la tomate (Siripornvisal 2010). Les modes d'action impliqués dans la protection biologique de la plante contre l'infection par *B. cinerea* sont nombreux:

Antibiose: l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible. Des substances responsables de l'antibiose ont pu être caractérisées chez des souches appartenant à diverses espèces d'agents de lutte biologique (notamment *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*), et les gènes impliqués dans la production de certaines de ces substances ont été identifiés (Duffy *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2002).

Tableau 3: Les microorganismes commercialisés (biopesticides) pour la lutte contre *Botrytis cinerea* (source: Fravel 2005)

Agent de contrôle biologique	Agents pathogènes	Cultures ou utilisation	Produit
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhizoctonia, Fusarium, Aspergillus</i>	Graines de coton, arachide, soja, blé, orge, pois et haricots	Kodiak
	<i>Fusarium, Rhizoctonia, Alternaria, Aspergillus</i>	Coton, haricot, orge, blé, maïs, pois, arachide et soja	Subtilex; Histick N/T
	Agents pathogènes foliaires, les pourrites	Cerise, cucurbitacées, raisin, laitue, piment, pomme de terre, tomate,	Serenade; Rhapsody
	<i>Rhizoctonia, Fusarium</i>	Plantes d'ombre ornementales, arbustes et arbres forestiers	Taegro
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pythium, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum</i>	Plantes ornementales et maraîchères de serre	AtEze
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Sclerotinia homeocarpa, Colletotrichum graminicola, Pythium aphanadermatum,</i>	Terrains de golf	Bio-Ject Spot-Less
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Botrytis cinerea, Pythium ultimum var.</i>	Cultures fruitières, ainsi que amandes, pomme de terre et tomate	BlighBan A506; Frostban
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Pathogènes du sol	Cultures alimentaires, plantes ornementales	Mycostop

Hyperparasitisme: l'antagoniste est un parasite qui reconnaît spécifiquement sa cible, pénètre dans ces cellules et entraîne sa destruction *via* la colonisation de ses organes. *Coniothyrium minitans* est par exemple un champignon hyperparasite de *Sclerotinia sclerotiorum*, capable de produire des enzymes dégradant les parois cellulaires de l'agent pathogène, telles que des chitinases ou des β -1-3 glucanases (Whipps and Gerlagh, 1992).

Compétition nutritive: Le champignon *B. cinerea* est très sensible à l'absence de nutriments: il a, par exemple, besoin de nutriments d'origine extérieure pour assurer la germination de ses spores (Elad, 1996). Certains microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) peuvent ainsi inhiber la germination des conidies de cet agent pathogène *via* la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro-éléments présents dans le milieu (Blakeman and Fokkema, 1982; Elad and Stewart, 2004; Filonow, 1998). Le champignon antagoniste *Trichoderma harzianum* souche T39 inhibe aussi la germination des conidies de *B. cinerea* en rentrant en compétition pour les nutriments à des stades précoces de l'interaction (Zimand *et al.*, 1996).

Stimulation des défenses naturelle des plantes (SDP): Il s'agit du concept de **résistance induite** qui est basé sur l'application d'un produit biologique naturel ou synthétique sur la plante, pour lui permettre d'enclencher ses mécanismes naturels de défense et ainsi d'être en état de résistance à un pathogène auquel elle serait normalement sensible (Conrath 2009). Ceci commence par la reconnaissance des deux partenaires, suivie de la transduction de signaux émis à l'interface et qui vont conditionner la réponse finale, à savoir la mise en place de réactions de défense chez la plante. En effet, les plantes ont toutes le potentiel de se défendre, contre les stress, grâce à des systèmes de défenses induites dont l'expression pourrait être stimulée. Récemment, des microorganismes comme les bactéries et des champignons ont été utilisés comme potentialisateurs de défenses de la plante et de renforcement de sa résistance contre les bioagresseurs (Bloemberg and Lugtenberg 2001, Van Wees *et al.* 2008, Lugtenberg and Kamilova 2009).

Trichoderma harzianum induit une résistance contre *B. cinerea* chez la tomate, la laitue, le poivron, le haricot et le tabac (Elad *et al.*, 2004). Récemment, différentes souches bactériennes ont été isolées à partir de la rhizosphère. Ces souches ont été caractérisées comme agents de la protection efficace contre *B. cinerea* dans des conditions *in vitro* et identifiées comme *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152, *Bacillus subtilis* PTA-271, *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 et *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

Il existe aussi des éliciteurs physiques dits abiotiques et qui incluent des sels de métaux lourds comme des sels de cadmium, d'argent et de plomb, des détergents, des antibiotiques, des peptides synthétiques, des dérivés de l'acide salicylique comme le benzol (1,2,3)-thiadiazole-7-acide carbo-thioïque S-méthyl ester (BTH) (Benhamou et Bélanger 1998; Kessmann *et al.* 1994), ainsi que des stress environnementaux, comme le stress hydrique (Bray 1997). Une exposition prolongée à des radiations ultraviolettes ou à des doses élevées d'ozone atmosphérique peut aussi induire des réactions de défense chez les plantes (Baier *et al.* 2005; Charles *et al.* 2008c).

E/ LUTTE PHYSIQUE

Cette lutte est divisée en quatre groupes. Elle inclut toutes les techniques dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique.

1/ La lutte mécanique

Selon (Cervek 2012 ; La Luciole 2015) consiste à utiliser des moyens mécaniques pour le contrôle des bioagresseurs qui concerne les adventices (travail du sol, désherbage, fauche, etc) et les ravageurs (filets, pellicule plastique, pièges).

2/ La lutte pneumatique

Consiste en l'utilisation de système pneumatique combinant les courants d'air pulsée et une aspiration puissante ou une aspersion avec de l'eau sous pression des organes qui permet d'éliminer la majorité des individus nuisibles présents sur les plantes cultivées (Charles *et al.*, 2009).

3/ La lutte thermique

Par élévation ou diminution de la température (Lague *et al.*, 1999; Charles *et al.*, 2008a).

4/ La lutte par l'exploitation du rayons électromagnétiques

Consiste en l'application de rayonnements (gamma, X, UV-C, UV-B et UV-A), de microondes (Charles *et al.*, 2000). Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à cette méthode de lutte et plus particulièrement à la lutte par l'application de longueurs d'onde dans le domaine des UV-C (< 280 nm). Les rayons gamma et les rayons X étant très onéreux, le choix d'utilisation des UV et en particulier les UV-C semblent être convenable et novateur. En raison de leurs propriétés germicides, des sources de rayonnement artificiel (lampes) ont été développées (Guerrero and Barbosa 2004).

5/ Les rayonnements Ultra-violet

Les rayons UV sont classés dans trois catégories en fonction de leur longueur d'onde (Figure 3): Les UV-A (320- 400 nm) qui possèdent l'énergie la plus faible, les UV-B (280-320 nm) et UV-C (254-280 nm) qui possèdent l'énergie la plus élevée.

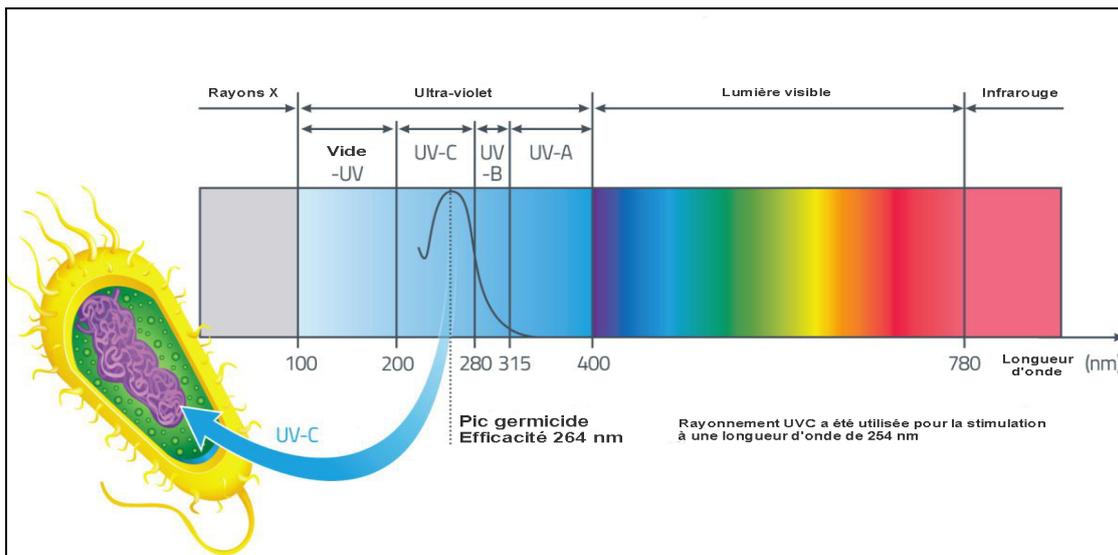


Figure 3: Les rayonnements ultra violet (UV) positionnés par rapport au reste du spectre lumineux. IR représente l'infrarouge. La partie d'UV-C est située entre 254 et 262 nm.

La réponse des plantes dépend de la longueur d'onde considérée, les UV-A sont moins délétères que les UV-B et les UV-C (Barta *et al.* 2004). Les rayons ultraviolets sont biologiquement actifs à toutes les longueurs d'onde. Leurs effets sur les organismes vivants varient selon les doses absorbées. A forte dose, les rayons ultraviolets sont délétères tandis que, administrés à dose dite hormétique, ils peuvent procurer des effets bénéfiques (Droby *et al.* 1993). L'absorption des rayons ultraviolets à des doses élevées provoque deux principaux types de dégâts : i) une altération de la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pouvant provoquer des mutations génétiques, et ii) des perturbations des processus physiologiques (Stapleton, 1992). L'atmosphère actuelle filtre efficacement les UV-C contrairement aux UV-B et aux UV-A. A des doses non délétères, les effets des UV-B peuvent être bénéfiques chez les plantes (Droby *et al.* 1993). Il a été montré qu'ils avaient des rôles importants dans de nombreux processus biochimiques et physiologiques comme, par exemple, la synthèse des composés phénoliques (Jenkins, 2009). Ces derniers sont des molécules essentielles pour la défense des plantes mais aussi des micronutriments pour les consommateurs, reconnus protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires par exemple. L'une des découvertes parmi les plus intéressantes est que les voies de signalisation en réponse aux UV-B et aux attaques de certains bioagresseurs sont largement partagées (Stratmann, 2003). Toutes ces observations fondent l'idée qu'on pourrait exploiter les UV-B à des fins de stimulation de la « valeur-santé » des produits végétaux (Jansen *et al.* 2008) et des défenses naturelles des plantes contre les pathogènes et les ravageurs (Stratmann 2003, Ballaré *et al.* 2011, Kuhlmann et Müller 2011). La stimulation des défenses naturelles des plantes est d'un intérêt majeur dans une perspective de limitation des pesticides qui sont des polluants pour l'environnement et ont des effets négatifs sur la santé humaine. De plus, des preuves significatives ont émergé au cours des dernières années, indiquant que la lumière, par l'intermédiaire de photorécepteurs spécifiques, peut être un modulateur important de voies de signalisations hormonales impliqué dans la défense des plantes (Ballaré 2011, Kazan et Manners, 2011). Le dernier à avoir été identifié et décrit est UVR8 (résistance aux UV LOCUS 8) (Rizzini *et al.* 2011, Christie *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012,

Jenkins 2014). Parmi les processus influencés par les UV-B et impliqués dans la résistance, on trouve l'accumulation de composés phénoliques de protection et la production d'acide jasmonique et d'acide salicylique (Rousseaux *et al.* 1998, Mazza *et al.* 1999, Stratmann 2003, Izaguirre *et al.* 2007, Kuhlmann et Müller 2009, Demkura *et al.* 2010, Gunasekera et Paul. 2007, Kunz *et al.* 2008, Demkura and Ballaré 2012). Malheureusement, exploiter les UV-B pose des problèmes concrets. En général une exposition prolongée est requise pour être efficace et les expositions prolongées sont difficiles à imposer dans la pratique. D'où notre idée d'exploiter plutôt les UV-C, plus fortement énergétiques, pour stimuler pendant un temps court la défense des plantes. De plus, le spectre d'absorption de UVR8 s'étend jusqu'aux rayonnements UV-C.

Mais peut-on vraiment exploiter les UV-C en lieu et place des UV-B sachant que les UV-C sont potentiellement très délétères pour les organismes? Globalement les connaissances concernant les effets bénéfiques des rayonnements UV-C sur les plantes et les mécanismes impliqués. Sont faibles l'atmosphère actuelle filtrant efficacement les UV-C n'a pas permis aux plantes de s'adapter à ces rayonnements. Mais, on sait que lorsque les UV-C sont appliqués de façon artificielle sur des organismes et à des doses élevées, ils produisent des espèces oxygénées hautement réactives (ROS) tels que le H_2O_2 , HO^- , O_2^- qui sont nocives pour les membranes cellulaires (Mahdavian *et al.* 2008a, Mahdavian *et al.* 2008b, Bornman *et al.* 1983). En effet, suite à la formation de ces radicaux libres, il a été observé une peroxydation des lipides membranaires chez de nombreuses espèces exposées aux UV-C (Bornman *et al.* 1983, Barka *et al.* 2000a). De plus, les UV-C agissent sur les membranes en les dépolarisant, en inactivant les pompes ioniques (ATPases), en altérant le flux des ions K^+ , Na^+ et Cl^- et en provoquant des fluctuations du pH cytoplasmique (Murphy *et al.* 1983). Etant donné leurs effets délétères, les radiations UV-C ont été utilisées essentiellement pour décontaminer les produits végétaux en post-récolte ou dans les processus pharmaceutiques et médicaux (Allende et Arte 2003, Gómez-López *et al.* 2007). Lors de ces travaux, des chercheurs ont voulu vérifier que les UV-C qu'ils appliquaient aux fruits et légumes pour les désinfecter n'affectaient pas négativement leur potentiel de conservation et leurs concentrations en micronutriments. Un certain nombre de

résultats intéressants ont été obtenus en utilisant des doses d'UV-C non délétères.

Barka et al. (2000b) et Allende et al. (2006) ont observé un effet positif des faibles doses d'UV-C sur la durée de vie de la tomate et la laitue rouge en quatrième gamme respectivement. Charles *et al.* (2008a,b) ont observé que l'application d'une dose d'UV-C de 3.7 kJ./m² sur des tomates vertes ralentissait la dégradation de la chlorophylle et retardait la sénescence. En effet, le ramollissement est l'un des processus impliqués dans la maturation et la sénescence du fruit, qui est affecté par les UV-C chez de nombreuses espèces comme la tomate, mais aussi la fraise et la mangue (Barka *et al.* 2000b, Maharaj 1995, González *et al.* 2001, Stevens *et al.* 1998). La réduction des dommages dus au froid a été aussi observée sur des fruits de piment traités aux UV-C (Vicente *et al.* 2005, González *et al.* 2004). L'utilisation des faibles doses d'UV-C en tant que traitement post-récolte s'est avérée donc bénéfique pour retarder la sénescence en réduisant l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation des parois (Barka et al. 2000b).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que lorsque les rayonnements UV-C sont administrés à des doses non délétères sur les plantes, ils peuvent induire des effets bénéfiques. Ces doses ont été qualifiées de doses hormétiques (Calabrese *et al.* 1997). Il s'agit donc d'utiliser un agent, potentiellement nocif pour la plante, à des doses faibles pour provoquer une réaction de stress bénéfique (Barka *et al.* 2000ab, Shama *et al.* 2005). En effet, dans le cadre de la thèse de C. Ouhibi, nous avons démontré que lorsque des plantes de laitue récoltées puis stimulées avec une dose non délétère d'UV-C (0,85 kJ./m²), ces dernières se conservent mieux que les laitues non traitées. Ce comportement est lié à une augmentation des composés phénoliques et une diminution moins importante de la chlorophylle et de la vitamine C chez les laitues traitées par comparaison aux laitues témoins au cours de leur conservation. D'autres auteurs ont observé aussi des effets stimulants des UV-C sur les concentrations en micronutriments (vitamines, provitamines, composés secondaires) des fruits et légumes après récolte (Mau *et al.* 1998, Cantos *et al.* 2001). Kim *et al.* (2008) ont observé que les concentrations en lycopène, en composés phénoliques totaux et en vitamine C pouvaient être

nettement augmentées chez la tomate. De même, des effets positifs ont été observés sur la concentration en quercétine de l'oignon (Rodov *et al.* 2007) et la concentration en stilbènes des baies de raisin (Voir article de synthèse de Poiroux-Gonord *et al.* 2010). La production de molécules d'intérêt pharmacologique peut, elle aussi, être améliorée par les UV-C. Moglia *et al.* (2008) ont observé une augmentation de plus de 60 % de la concentration en acide dicaffeoylquinique chez l'artichaut 24 heures après son exposition aux UV-C. Beaucoup de métabolites secondaires (caroténoïdes, flavonoïdes, glucosinolates) sont de puissants antioxydants et/ou présentent des propriétés anti-inflammatoires, ce qui suggère une implication possible dans la prévention des pathologies cardio-métaboliques. Face à une consommation insuffisante de fruits et légumes dans les pays développés comme dans les pays en développement, il est tentant de proposer aux consommateurs des produits plus riches en micronutriments.

De plus, beaucoup de métabolites secondaires sont impliqués dans les défenses des plantes contre les bioagresseurs (Friend 1979). L'application de rayonnements UV-C à une dose hormétique peut donc avoir un effet sur la résistance des végétaux en stimulant leur métabolisme secondaire, comme la synthèse des phytoalexines, des protéines de défense et de composés anti-fongiques (Calabrese *et al.* 1997, Allendes *et al.* 2003, El Ghaouth *et al.* 2003, Erkan *et al.* 2008, Muvunyi *et al.* 2012). En effet, à l'instar de ce qui a été observé avec les UV-B, les UV-C paraissent également capables de stimuler les défenses naturelles des végétaux après récolte. De nombreuses études ont clairement démontré que les rayons UV-C induisaient la résistance chez de nombreuses espèces en post-récolte (Tableau 3). De manière surprenante, les références concernant l'effet stimulant des rayonnements UV-C sur les défenses des plantes en culture et avant récolte sont rares, on peut citer l'exemple du pathosystème *Arabidopsis thaliana/Hyaloperonospora parasitica* (Kunz *et al.* 2008) et du *Pelargonium/Botrytis* (Darras *et al.* 2015). Cette stratégie de stimulation des plantes par des UV-C puis l'étude de comportement vis à vis des pathogènes est le principe de priming. Les stress spécifiques et modérés subis par les plantes peuvent les aider, dans certains cas, à mieux tolérer d'autres formes de stress ultérieurs (Beckers et Conrath, 2007). Le

priming ou la potentialisation est donc la préparation de la plante à un état physiologique qui permet à la plante d'induire plus vite et/ou plus intensément ses mécanismes de défense lorsqu'elle est soumise à un stress biotique ou abiotique (Conrath *et al.* 2006). La potentialisation peut être déclenchée via l'application exogène de plusieurs produits (acide salicylique, acide β -aminobutyrique) ou des microorganismes non pathogènes (*Bacillus subtilis*) ce qui conduit à la mise en place précoce de moyens de défense chez les plantes contre de futurs bioagresseurs (Mur *et al.* 1996, Kogel *et al.* 1994, Zimmerli *et al.* 2001). Il en résulte donc une meilleure résistance de la plante vis-à-vis de pathogènes.

Tableau 3 : Liste de références concernant les effets positifs des UV-C sur la résistance post-récolte à différents pathogènes.

Espèces	Pathogènes	Références
Tomate	<i>Alternaria alternata</i>	Liu <i>et al.</i> , 1993
Carotte	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Mercier <i>et al.</i> , 1993a, b, c, 2000, Mercier <i>et al.</i>
Poivron	<i>Botrytis cinerea</i>	2001
Patate douce	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Stevens <i>et al.</i> , 1990
Citron	<i>Penicillium digitatum</i>	Ben-Yehoshua, 1992
Pomme	<i>Alternaria sp</i>	Lu <i>et al.</i> 1991
Pêche	<i>Monilinia fructicola</i>	Stevens <i>et al.</i> 1998
Laitue	<i>Botrytis cinerea</i>	Ouhibi <i>et al.</i> 2014, 2015
Fraise	<i>Botrytis cinerea</i>	Nigro <i>et al.</i> 2000; Baka <i>et al.</i> 1999, Marquenie <i>et al.</i> 2002
Pamplemousse	<i>Penicillium digitatum</i>	Droby <i>et al.</i> 1993, D'hallewin <i>et al.</i> 2000

On peut donc conclure que, l'application des rayonnements UV-C à des graines en germination ou à des plantes en croissance au même titre que d'autres formes de traitements de potentialisation, pourrait préparer les plantes à mieux tolérer des stress biotiques. Si les doses d'UV-C appliquées varient en fonction des espèces étudiées, l'ensemble des travaux réalisés sur des produits végétaux en post-récolte confirme que les doses hormétiques correspondent à des faibles doses appliquées souvent une seule fois car le produit végétal entre en phase de sénescence et sa durée de vie est assez courte. Dans le cas des plantes en culture, la répétition des traitements d'UV-C peut être une solution pour augmenter la dose et probablement l'entretien et le maintien d'un effet bénéfique d'UV-C sans altérer le végétal.

Nous avons donc envisagé, dans le cadre de ma thèse, d'appliquer des rayonnements UV-C sur des plantes de laitue et de tomate (pour la première fois, nous avons testés, des cultures destinées à la consommation humaine) afin de diminuer leur sensibilité à *B. cinerea*. Nous avons procédé en quatre étapes: 1/ tester différentes doses de rayonnements UV-C pour déterminer les doses qui ne sont pas délétères pour les plantes. 2/ tester la répétition de doses non délétères une fois ou répétées sur la sensibilité des plantes à *B. cinerea*. 3/ optimiser l'effet de stimulation des défenses des plantes en combinant les traitements UV-C avec un agent de lutte biologique "*Bacillus subtilis*".

Chapitre II

**Les rayonnements UV-C, un moyen
pour stimuler les défenses de la
laitue en cours de culture contre
*Botrytis cinerea***

A/ ORIGINE ET DIVERSITE DE LA LAITUE

1/ Présentation

La laitue (*Lactuca sativa*) est une plante annuelle, herbacée en rosette, originaire de l'Asie de l'Ouest et appartenant à la famille botanique des Astééracées. D'après le botaniste Boissier, l'espèce *Lactuca sativa* pourrait provenir de formes sauvages *Lactuca serriola* originaires des montagnes du Kurdistan. Sa culture n'est pas très ancienne puisque les premières mentions indiscutables de culture de laitue ont été trouvées dans la littérature grecque et romaine. La laitue semble avoir été très populaire dans le monde grec (nom: tridax) et romain (nom: Lactuca).

La laitue possède 2 phases bien distinctes (Figure 4) : la phase végétative qui forme une pomme plus ou moins fermée. C'est à ce stade que la laitue est récoltée pour la commercialisation. La phase reproductrice durant laquelle la tige principale s'allonge (montaison) pour parvenir à la floraison et à la production de graine. La plante cultivée se distingue des formes sauvages par plusieurs caractères morphologiques dits de domestication: formation d'une pomme, mais aussi par un grand nombre de feuilles formant un paquet plus ou moins serré, absence d'épines sous les feuilles, diminution du latex et de l'amertume, capitules resserrés dans les bractées permettant de retenir les graines sur la plante à maturité (Pitrat et Foury, 2004).



Figure 4 : Phases végétative et reproductrice chez la laitue

2/ Les différents cultigroupes de laitue et production

En France, la laitue compte plusieurs centaines de variétés, différentes par la couleur, la forme et la saveur. Cinq principaux types de laitue sont commercialisés en France: beurre, à couper, batavia, romaine et grasse (Figure 5).



Figure 5: Les principaux types de laitue

Les laitues beurre, blondes ou brunes, présentent une pomme arrondie et des feuilles lisses ou légèrement cloquées, douce et fondante. **Les laitues batavia**, peuvent être blondes, brunes ou de type 'Iceberg' (celle que l'on rencontre le plus souvent en sachet, utilisée souvent en sandwich). La pomme est arrondie ou en forme d'œuf et les feuilles sont craquantes à bord sinué. **Les laitues à couper** ont la particularité de repousser après une première cueillette. Elles ne pomment pas et leurs feuilles adoptent des formes diverses selon les variétés. Les principales sont: la feuille de chêne blonde ou brune, très vendue

grâce à ses jolies couleurs, sa tendresse et son goût subtil de noisette. La 'Lollo' blonde ou brune, elle est tendre et colorée comme la feuille de chêne. **Les romaines** verte franche, possèdent une pomme haute et des feuilles lisses, allongées et étroites. Elle se révèle particulièrement croquante. Elle doit son nom au fait d'avoir été introduite en France via le fief papal d'Avignon. **Les laitues grasses**, en pomme arrondie, leurs feuilles épaisses et lisses, elles sont gourmandes et fondantes. Les principales variétés consommées en France sont la sucrine et la rougette.

Les principaux pays producteurs de laitue dans le monde sont la Chine (13 millions tonnes), Etats-Unis (5 millions tonnes) et l'Inde (1 millions tonnes) (Doré *et al.* 2006). La figure 6 montre les principaux pays producteurs de la laitue en Europe. L'Espagne avec 1 million de tonnes occupe la première place (32%) et la France occupe la quatrième place avec 293104 tonnes pour une surface de 10609 Ha (France AgriMer, 2016a).

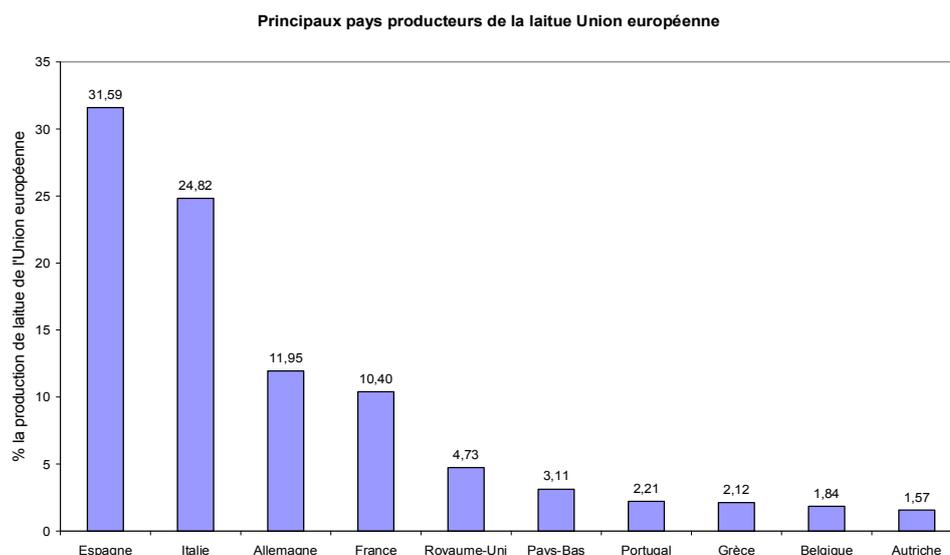


Figure 6 : Principaux pays producteurs de la laitue Union européenne

3/ Préférences pédo-climatiques et fertilisation

La laitue est une plante de saison froide, la température de culture optimale est de 20-23 °C le jour et 7 °C la nuit. La germination des semences est rapide à 15 °C (2-3 j). Les semences présentent 4 types de dormances: (1) une dormance de post-récolte qui dure un certain temps entre la récolte et la germination. Cette période dépend des variétés, (2) une dormance induite par

les hautes températures (supérieures à 18 °C; les graines doivent être exposées aux températures basses) pour pouvoir germer, (3) une autre dormance induite par les rayons infrarouges (il faut exposer les graines à la lumière visible pendant quelques jours avant le semis) et (4) une dormance induite par les jours longs (il y a risque de montée à graines en jours longs de l'été et à haute température). Les exigences en sol sont faibles, on cultive les laitues sur tous les types de sols. Le pH optimal du sol est compris entre 6 et 6,8. La culture répond bien à un apport en Cu, Mo et Mn, tolère l'excès de Bore et la carence en magnésium et très sensible à la salinité (Grubben and Denton 2004).

4/ Composition et conditions de conservation et de transport

Ce légume est de plus en plus prisé par les consommateurs à la recherche de fraîcheur (94% à 95% d'eau du poids total) et d'un équilibre alimentaire. La laitue dispose d'une faible concentration en nutriment mais riche en fibres ce qui facilite le transit intestinal (Pitrat *et al.*, 2003). Elle possède également de nombreuses vertus conférées par leurs composés phénoliques et les caroténoïdes qui sont bénéfiques pour la santé. Ce sont des antioxydants qui protègent l'organisme des radicaux libres responsables du vieillissement cellulaire et de l'apparition de certains cancers et de maladies cardiovasculaires.

Après récolte, le produit est fragile et rapidement périssable. Il faut le pré-refroidir avant de le transporter par camion frigorifique ou le stocker dans un local aéré à 1-2 °C et 95 % HR. Dans ces conditions, la durée de conservation peut être de l'ordre de 2-3 semaines. Il faut éviter l'éthylène dans la chambre froide de conservation qui peut induire des taches sur le feuillage, avec généralisation progressive du brunissement.

5/ Principales maladies de la laitue

Les feuilles tendres de laitue sont sujettes à de nombreuses attaques de pathogènes (virus, champignons, bactéries, insectes, etc) entraîne des risques phytosanitaires importants durant leur croissance (FranceAgriMer, 2015). Ces maladies peuvent être d'origine aérienne comme le Mildiou (*Bremia lactucae*), l'Oïdium (*Erysiphe cichoracearum*) ou bien le virus de la mosaïque de la laitue

transmis principalement par des insectes piqueur- suceurs. Mais elles peuvent être aussi d'origine tellurique comme la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le *Sclerotinia* ou Sclérotiniose (*Sclerotinia sclerotiorum* et *Sclerotinia minor*) le Rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*) ou la bactériose. Les insectes ravageurs peuvent causer aussi des dégâts chez les laitues (Beliard 2003). En effet, les limaces et escargots se nourrissent des feuilles de la laitue et provoquent ainsi de gros dégâts irréversibles (Figure 7).

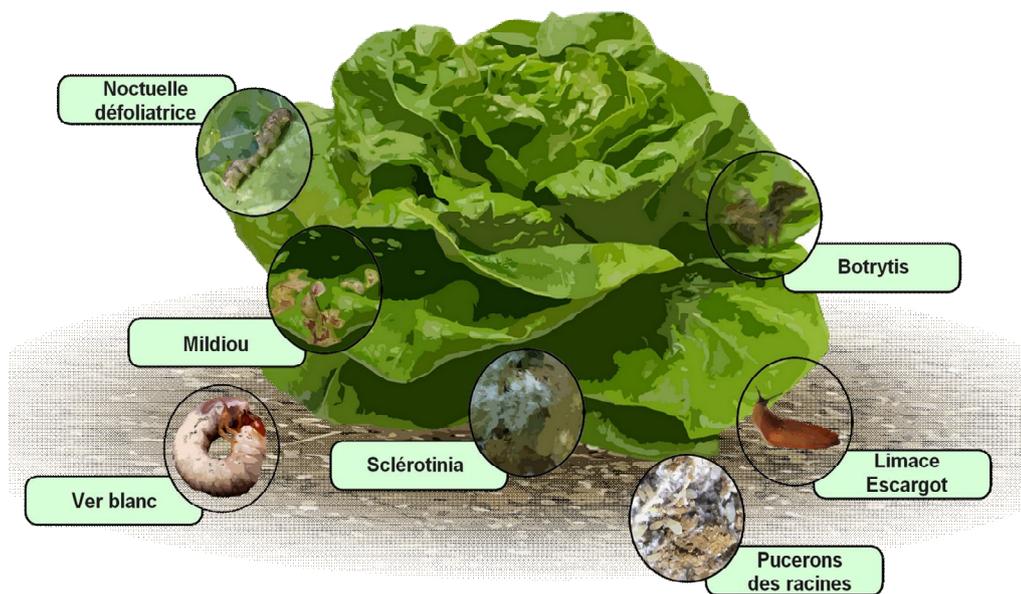


Figure 7: les principales maladies et les principaux ravageurs de la laitue (source: maladies-parasites-laitue-traitements-bio.html).

Les laitues sont principalement sensibles à trois maladies causées par des champignons qui sont *Botrytis*, *Sclerotinia* et *Rhizoctonia* (Lecompte *et al.*, 2013; Ceja *et al.*, 2008). *B. Cinerea* peut attaquer les plantes de la levée à la récolte, mais c'est surtout au moment de la pomaison qu'il va se développer et devenir difficile à maîtriser (Beliard, 2003). C'est un champignon opportuniste qui attaque plus facilement les feuilles sénescentes, blessées, ou ayant déjà été affaiblies par une maladie (van Kan, 2007). Il attaque notamment les feuilles âgées situées sous le couvert végétal et en contact avec le sol après la pomaison. Ces vieilles feuilles vont constituer une base nutritive propice à son installation sur les laitues (Blancard *et al.*, 2003).

B/ PRE HARVEST HORMETIC DOSES OF UV-C RADIATION CAN DECREASE SUSCEPTIBILITY OF LETTUCE LEAVES (*LACTUCA SATIVA L.*) TO *BOTRYTIS CINEREA L.*

Hilariòn Vàsquez^a, Chayma Ouhibi^{ab}, Yves Lizzi^a, Nasser Azzouz^a, Marine Forges^{ac}, Marc Bardin^c, Philippe Nicot^c, Laurent Urban^{a*}, Jawad Aarouf^{a*}

^a Laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes (UMR Qualisud), Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, 301 Rue Baruch de Spinoza, 84916 Avignon

Corresponding author. Tel : +33490842207

E-mail address: jawad.aarouf@univ-avignon.fr and Laurent.urban@univ-avignon.fr

^b Unité de Physiologie et Biochimie de la Réponse des Plantes aux Contraintes Abiotiques, Département de Biologie, FST, Université Tunis El Manar, 1068 Tunis, Tunisie

^c Plant Pathology, INRA, F-84140, Montfavet, France

RESUME

Les applications des rayonnements UV-C en post-récolte se sont avérées très efficaces pour réduire le développement des maladies post-récolte chez de nombreuses espèces comme la laitue (*Lactuca sativa* L.). D'autres études suggèrent que les rayonnements UV-C sont aussi efficaces en stimulant les défenses des plantes. Le traitement pré-récolte avec les rayonnements UV-C peut donc offrir un potentiel intéressant pour la protection de la laitue contre les bioagresseurs, à condition que les doses appliquées soient efficaces tout en excluant les effets délétères sur les plantes. Ici, nous fournissons la preuve que 0,85 kJ/m² et 1,70 kJ/m² représentent des doses de rayonnements UV-C qui ne sont pas délétères pour les plantes de la laitue. Nous avons utilisé plusieurs critères pour évaluer l'effet non délétère de ces deux faibles doses UV-C sur la plante: les observations histologiques, la concentration du malondialdéhyde (un indicateur de l'intégrité de la membrane) et les paramètres dérivés des mesures de la fluorescence de la chlorophylle comme l'efficacité maximale du photosystème II (Fv/Fm) et l'indice de performance de Strasser. Nous avons démontré aussi que lorsque les plantes sont traitées avec une seule dose d'UV-C à 0,85 kJ/m², les plantes présentent une légère diminution de la sensibilité à *B. cinerea* alors qu'une dose unique de 1,70 kJ/m² produit l'effet inverse. Lorsqu'une dose de 0,85 kJ/m² est appliquée 4 fois (tous les deux jours), les feuilles inoculées 2 jours après le dernier traitement d'UV-C montrent une diminution significative de la sensibilité à *B. cinerea* (- 30%) par rapport au témoin. Cette diminution significative est corrélée à une augmentation de la teneur totale en composé phénolique et une augmentation des activités de la PAL, de la CAT et de la MDAHR.

1. Abstract

Post-harvest applications of UV-C radiation have proven very efficient in reducing the development of post-harvest diseases in many species including lettuce (*Lactuca sativa* L.). Several studies suggest that UV-C radiation is effective not only because of its disinfecting effect but also because it may stimulate plant defenses. Pre-harvest treatment with UV-C radiation may thus offer an interesting potential for lettuce protection, provided that application doses are effective while excluding any harmful effects on the plants. Here we provide evidence that 0.85 kJ/m² and 1.70 kJ/m² represent doses of UV-C radiation that are not deleterious for lettuce plants. We used several criteria to evaluate the effect of UV-C radiation on the plant, including histological observations; the concentration of malondialdehyde, an indicator of membrane integrity, as well as parameters derived from measurements of chlorophyll fluorescence, such as maximal efficiency of photosystem II (F_v/F_m) and the Performance Index of Strasser. We observed that a single dose of 0.85 kJ/m² slightly increased plant resistance to grey mould (*Botrytis cinerea* L.) while a single dose of 1.70 kJ/m² had the opposite effect. When a 0.85 kJ/m² dose was applied 4 times, at two-day intervals, there was an increase in the total phenol content of leaves, and in PAL, CAT, and MDAHR activities. Leaves inoculated 2 days after the latter UV-C treatment showed significantly decreased sensitivity (-30%) when compared to the control.

Keywords: UV-C radiation, *Botrytis cinerea* L., *Lactuca sativa* L., photosystem II, membrane lipid peroxidation, plant resistance

2. Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is cultivated worldwide and is one of the green leafy vegetables most consumed in raw form for its good taste, low price, and high nutritive value, especially due to its vitamin, fiber, and mineral input to a diet. Several diseases can be particularly damaging for lettuce production. Some cause loss of quality with symptoms on leaves, while infection of young plants often results in plant mortality. Among diseases, grey mould caused by the fungus *Botrytis cinerea* is of major concern to growers. The most common and effective strategy to control grey mould is the application of fungicides (Barrière *et al.*, 2014). The use of these fungicides, however, can have a negative impact on the environment and human health. In addition, frequent use of fungicides can lead to the development of resistance (Russell, 1995; Komarek *et al.*, 2010). Thus, there are less and less active molecules officially authorized in the EU. There is thus a growing interest for innovative strategies based on the use of abiotic or biotic factors for stimulating plant natural defenses (Conrath, 2009). Light is an important regulator of the plant-pathogen interactions *via* distinct photoreceptors and signalling pathways (Jenkins, 2009; Magerøy *et al.*, 2010; Demkura and Ballare, 2012). In addition to the visible light, there are other electromagnetic radiations like infra-red light (IR) or ultraviolet light (UV). The UV portion of the electromagnetic spectrum includes long-wave UV-A radiations (315 - 400 nm), medium-wave UV-B radiations (280 - 315 nm), and short-wave UV-C radiations (200 - 280 nm) (Barta *et al.*, 2004). UV-B radiation (280-320 nm) has been reported to increase plant resistance to leaf pathogens (Gunasekera and Paul, 2007; Kunz *et al.*, 2008; Ballare *et al.*, 1996; Kuhlmann and Müller, 2011; Demkura and Ballaré, 2012). The resistance may be attributed to changes in plant tissue metabolites induced by UV-B radiation, which include accumulation of protective phenolic compounds and enhancement of jasmonic acid-dependent defense pathway (Rousseaux *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999; Izaguirre *et al.*, 2003; Foggo *et al.*, 2007; Izaguirre *et al.*, 2007; Kuhlmann and Müller, 2009; Demkura *et al.*, 2010; Ballare, 2011, Mazid *et al.*, 2011). In addition, UV-B radiation stimulates transcription of genes important for defense, including those encoding for phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase, two key-enzymes controlling the synthesis of

defense-related phenolic compounds, as well as pathogenesis-related proteins such as chitinase and β -1,3-glucanase (El Ghaouth *et al.*, 2003; Bonomelli *et al.*, 2004; Borie *et al.*, 2004). Conversely, we may expect UV-C radiation to be the most effective (and potentially harmful) due to their high energy level. However, besides the fact that it provokes oxidative stress, little is known about the biological effects of UV-C radiation on vegetative bodies and the mechanisms responsible for the stimulation of plant defenses (Urban *et al.*, 2016). Exposure to UV-C radiation has been reported to reduce post-harvest decay of several species such as *Allium cepa* (Lu *et al.*, 1987), *Ipomea batatas* (Stevens *et al.*, 1990), *Daucus carota* (Mercier *et al.*, 1993a; 1993b) and *Solanum lycopersicum* (Charles *et al.* 2008a, 2008b; Scott *et al.* 2016). Mercier *et al.* (2001) showed that the control of disease in bell pepper was obtained through induction of disease resistance rather than by fruit surface disinfection. Based on what is known about UV-B radiation and the induction of disease resistance in post-harvest crops by UV-C, it can reasonably be hypothesized that UV-C radiation could also exert an additional positive effect, indirectly by stimulating the resistance of plants against bio-aggressors. A large number of previously published works have shown that UV-C irradiation elicit defense responses in harvested horticultural crops (Charles *et al.*, 2008a, 2008b, 2008c). The induction of disease resistance in post-harvest crops in response to UV-C appears to involve the elicitation and accumulation of phytoalexins (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; Mercier *et al.*, 1993b; Sarig *et al.*, 1997; Charles *et al.*, 2008a), the ultra-structural modification of the epicarp leading to the formation of physical barriers (Charles *et al.* 2008b), the reinforcement of the cell walls by phenolic compounds, lignin and suberin (Charles *et al.* 2008c), and the enhancement of constitutive and inducible β -1,3-glucanases and chitinases (Charles *et al.* 2009).

We have recently shown that lettuce plants treated with a low dose of UV-C after harvest show increased resistance against *B. cinerea* and *Sclerotinia minor* (Ouhibi *et al.*, 2015a, 2015b). Surprisingly, observations about the effect of UV-C radiation against pathogens by stimulating natural plant defences during their growth are extremely scarce (Kunz *et al.*, 2008; Darras *et al.*, 2015). These authors observed that treating *Arabidopsis* or *Pelargonium* plants with UV-C radiation induces reduction of infection by *Hyaloperono sporoparasitica*

and *B. cinerea*, respectively. There is still a lack of references on crops destined for human consumption. Moreover the effect of intermittent exposures to UV-C has never been investigated so far.

Our objective is to test the hypothesis that non-damaging doses of UV-C radiation can be used to reduce lesions caused by *B. cinerea* L. in *Lactuca sativa* L. by stimulating their natural defenses. We proceeded in two steps: We, first, tested different doses of UV-C radiation to determine which doses are not deleterious. Secondly, we tested the effect of single and repeated non-deleterious doses of UV-C radiation on lesion development on inoculated leaves by *B. cinerea*.

3. Materials and methods

3.1. Production of plant material and UV-C treatment

Romaine lettuce seeds (cv Duende, De Ruyter Seeds) were sown in 1 cm³ rockwool cubes in a glasshouse. One week after sowing, the cubes, each containing one plantlet, were transferred into plastic pots (5 L) containing a commercial growing medium (Metro-Mix 350, Sun Gro, Canada). They were then grown for 3 or 4 weeks at a temperature of 24/16 C° (day/night). Five-week-old seedlings were used to identify non-deleterious doses of UV-C, while 4-week-old seedlings were used for a dose/repetition trial. Three independent experiments were conducted, the first between October and November 2013 (Mean cumulated global energy per m² and per day is 7.4 MJ/m²), the second one between March and April 2014 (Mean cumulated global energy per m² and per day is 13.7 MJ/m²) and the third one between October and November 2015 (Mean cumulated global energy per m² and per day is 7.5 MJ/m²).

To determine non-deleterious doses, the seedlings were exposed to UV-C light (254 nm, Spectroline, Model ZQJ-254, output 300 mW.c/m², USA) at a distance of 30 cm. The UV-C radiation dose was made to vary by modifying the duration of exposure. Light intensity measurements were performed with a radiometer (Data Logging Radiometer PMA 2100, Glenside, USA) positioned at 30 cm from the ceiling light. The duration of plant UV-C radiation are 1 min (which corresponded to a dose of 0.85 kJ/m²), 2 min (1.70 kJ/m²), 4 min (3.40 kJ/m²), and eventually 8 min (6.80 kJ/m²). In the second experiment, the 4-week-old seedlings were exposed for a period of 1 min every two days during one

week, which represents a cumulated dose of 3.40 kJ/m². In both trials, we used untreated plants as a control batch. To avoid the restorative effect of white light (Mercier *et al.*, 2001), All the UV-C treatments were initiated after sunset.

3.2. Measurements of chlorophyll a fluorescence using the Handy PEA

Chlorophyll a fluorescence was measured using a portable non-modulated Handy PEA fluorimeter (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Kings Lynn, UK). After adaptation of leaves to darkness, a single strong 1s light pulse (3500 $\mu\text{mol photon/ m}^2\cdot\text{s}^1$) was applied with the help of three light-emitting diodes (650 nm). Recorded fluorescence parameters included: F_o which represents the minimal fluorescence when all reaction centers are open, F_v/F_m which represents the maximum quantum yield of photosystem II (where F_m is the maximal fluorescence value and $F_v = F_m - F_o$), F_v/F_m is widely used to assess stress in plants. F_v/F_o estimates the maximum primary yield of photochemistry of photosystem II, F_v/F_o is an indicator of the energy trapping probability (Krause and Weiss, 1991). PI is the so-called performance index of Strasser (Strasser *et al.* 2000). PI is a multi-parametric expression of three independent steps contributing to photosynthesis, namely RC/ABS, F_v/F_o and $(1-V_j)/V_j$. RC/ABS is an indicator of the size of the chlorophyll antenna serving each reaction center whereas $(1-V_j)/V_j$ is an indicator of the performance due to the conversion of excitation energy to photosynthetic electron transport. PI is considered as a much more sensitive and discriminating stress indicator than F_v/F_m (Thach *et al.*, 2007). Measurements of chlorophyll fluorescence were performed on 20 leaves per treatment (two leaves per plant).

3.3. Epidermal cells microscopy observations

To determine the non-deleterious UV-C radiation dose, we assessed the visual appearance of the leaves 6 days after the different single UV-C treatments: 0.85 kJ/m², 1.70 kJ/m², 3.40 kJ/m² and 6.80 kJ/m². We moreover removed the epidermal cells with fine forceps, treated them with Neu's reagent and observed them under an epifluorescence microscope (Leica DM 2000, Bannockburn, USA) equipped with a filter at 365 nm excitation and 420 nm emission to reveal phenolic compounds. Five plants were used for each dose and three leaves per plant were examined.

3.4. Chlorophyll and carotenoid contents

Concentrations in chlorophylls *a* and *b* and total carotenoids were determined by extraction, using pure acetone (100%) as a solvent. One hundred milligrams of frozen powdered leaves was incubated 15 min on ice. Then, they were centrifuged for 5 min at 15000 g and 4°C. Quantification of chlorophyll and carotenoids was performed immediately after extraction. Absorbance readings were made at 662 nm and 645 nm for chlorophyll pigments, and at 470 nm for carotenoids. The concentrations were calculated according to Lichtenthaler (1987). Measurements were performed on 5 plants per treatment ($n = 5$).

$$\text{Chlorophyll } a = (11,24 \times A_{662}) - (2,04 \times A_{645})$$

$$\text{Chlorophyll } b = (20,13 \times A_{645}) - (4,19 \times A_{662})$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 1,9 \times \text{Chl}_a - 63,14 \times \text{Chl}_b) / 214$$

3.5. Lipid peroxidation

Two hundred milligrams of frozen powdered leaves were homogenized in 10 mL of 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and then centrifuged at 10000 g for 15 min. One mL of supernatant was then vortexed with 4 mL of 20% (w/v) TCA containing 0.5 % (w/v) 2-thiobarbituric acid (TBA), and the solution was heated for 30 min at 95°C. The samples were cooled on ice for 5 min and centrifuged again for 15 min at 10000 g. Absorbance of the supernatant at 532 nm was corrected for non-specific absorbance by subtracting absorbance at 600 nm. Malondialdehyde (MDA) concentration was estimated using $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ as the extinction coefficient (Heath and Packer, 1969). Assay was performed on 5 plants per treatment ($n = 5$).

3.6. Determination of total phenolic compounds

One gram of fresh lettuce leaves was homogenized with 20 mL ethanol 70 % and then milled again for 1 min with an Ultraturrax. After stirring in the dark for 30 min, the sample was filtered on a Büchner pump and the supernatant was made up to 50 mL. During this step, total soluble phenolic compounds were extracted. Assays were done according to the method of Marigo (1973). The absorbance was read at 760 nm and the quantification of total phenols was

made using a linear calibration curve obtained using extracted gallic acid (GA) standard at increasing concentrations (from 25 to 500 mg L⁻¹). The polyphenol content was expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram of dry matter (mg AGE/g DW). Assay was performed on 5 plants per treatment ($n = 5$).

3.7. Phenylalanine ammonia lyase activity

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity was measured as described by Siriphanich and Kader (1985). The extraction was done on 200 mg of frozen powdered leaves and powder was homogenized in cold with 4 mL of borate buffer 1 M (pH 8.6) containing 5 mM of 2-mercaptoethanol and 0.40 mM of polyvinylpyrrolidone. Then the mixture was centrifuged at 12000 g for 20 min at 4 °C. To quantify PAL activity, the reaction mixture consisted in the enzyme extract (0.5 mL) and borate buffer 0.1 M (pH 8.6) containing 5 mM of 2-mercaptoethanol and 0.1 M of phenylalanine. After 1 h incubation at 30 °C, 400 µL of 28 % trichloroacetic acid were added to the mixture to precipitate proteins. Then, the mixture was centrifuged at 12000 g for 20 min at 4 °C after spending 5 min at room temperature. PAL activity was measured by spectrometry at 290 nm to detect cinnamic acid. The enzymatic activity was expressed as mmol of trans-cinnamic acid produced/h¹.g¹ FW. Dosage was performed on 5 plants per treatment ($n = 5$).

3.8. Antioxidant enzyme activities

Four hundred milligram of frozen powdered leaves were homogenized in 4 mL of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8, containing 1 mM EDTA-Na₂, 5 mM DTT, 15 mM β-mercaptoethanol and 10 % (wt/vol) polyclar AT. The homogenate was centrifuged at 15 000 g for 15 min and the supernatant was stored at 4 °C.

Ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) activity was measured according to (Nakano and Asada, 1981) by monitoring the decrease in absorbance at 285 nm at 25 C. The reaction mixture (3 mL) contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.16 mM ascorbate, 0.1 mM EDTA-Na₂, and 3 mM H₂O₂. The concentration of oxidized ascorbate was calculated by

using extinction coefficient of $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. One unit of APX was defined as 1mmol/ml ascorbate oxidized/min.

Glutathione reductase (GR) (EC 1.6.4.2) activity was determined from the rate of NADPH oxidation measured by the change in absorbance at 340 nm at 25 °C, following Foyer and Halliwell (1976). The reaction mixture (3 mL) contained 100 mM tris buffer (pH 7.8), 2 mM EDTA- Na_2 , 50 μM NADPH, 0.5 mM GSSG and extract. GR activity was calculated using an extinction coefficient of $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) (EC 1.6.5.4) activity was determined spectrophotometrically by measuring the reduction of absorbance at 340 nm according to the technique described by Begara-Morales *et al.* (2015).

The 1 mL assay mixture contained 50 mM TRIS-HCl (pH 7.8), 0.2 mM NADH, 1 mM ascorbate, and sample. The reaction was initiated by adding 0.2 U of ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3 from Cucurbita; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA) and the decrease in absorbance at 340 nm, due to NADH oxidation, was monitored. One mill unit of activity was defined as the amount of enzyme required oxidizing 1 nmol NADH min^{-1} at 25 °C.

Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity was assayed in a mixture (3 mL) containing 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 6 mM H_2O_2 and extract. At 25 °C, the decomposition of H_2O_2 was monitored at 240 nm (Cakmak and Marschner, 1992). CAT activity was calculated using an extinction coefficient of $39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Each enzyme activity was assessed on 5 plants per treatment ($n= 5$).

3.9. Pathogen culture and inoculation tests on leaves

To assess the effect of UV-C radiation on the level of plant resistance to *B. cinerea*, we inoculated lettuce leaves with the strain SAS405. The inoculum was produced in three days on potato dextrose agar (39 g. L^{-1} Difco, Detroit, USA) in a growth chamber (Heliofroid, Le Beausset, France) at 21 °C with a 14h/10h photoperiod. Two days after UV-C treatment, 15 leaves (3 leaves per plant) per treatment were detached, placed in plastic Petri dishes on moistened filter paper, and inoculated by depositing a mycelium plug, 5 mm in diameter. The Petri dishes were then placed in a growth chamber at 22/16°C and a

photoperiod of 16h/8h. The leaves were photographed each 24 hours between three and seven days after inoculation and lesion areas were assessed with image analysis software (Image J, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The lesion areas were obtained by inoculating leaves with a mycelium plug of strains SAS405 of *B. cinerea* after exposing them to UV-C radiation. We therefore ensured that the effect of UV-C could not be attributed to a disinfecting effect.

3.10. Histopathological study

To study the penetration zone of pathogen in treated and untreated leaves, thirty leaves were inoculated with SAS405 by dropping mycelia implants on the main vein and nearby of the main vein. Leaf fragments of about 1 cm² were taken from the infected areas using a razor blade 24 hours after inoculation and were immersed in a cold fixative constituted by formalin-acetic acid-alcohol (1:1:8 V/V/V) during 48 hours at 4°C, rinsed in distilled water, and stored in 70% ethanol until required. They were then dehydrated in an ethanol series and embedded in resin (Kit Technovit 7100, Wehrheim, Germany). Sections (5 µm thickness) were serially cutted using a Leica microtome, collected on microscope slides and allowed to dry. Slides with hypocotyl sections were stained with 0.5% aqueous toluidine blue. Slides with root sections were stained to visualize polysaccharides and proteins using periodic acid-Schiff's reagent (PAS) and naphthol blue-black procedures, respectively (Aarrouf *et al.* 2008). The penetration zone of *B. cinerea* in each leaf was examined by a microscope (Optiphot-2, Nikon) observation and rated as follows, 1: presence in the cuticle; 2: presence under the epidermis and 3: presence in the parenchyma. Means were calculated based on 30 samples per treatment.

3.11. Statistical analyses

Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by multiple comparisons of means with Duncan's test. The data were expressed as means ± standard error and statistical significance was set at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using XLSTAT software (Addinsoft, Deutschland, Andernach, Germany).

4. Results

4.1. Identification of a non-deleterious dose of UV-C

4.1.1. Parameters derived from chlorophyll fluorescence measurements

During the 6 days after UV-C treatments, the chlorophyll fluorescence parameters F_v/F_m , F_v/F_o and PI of the lettuce seedlings varied depending on the doses of UV-C radiation (Fig. 1). Decreases in all chlorophyll fluorescence parameters became significant four days after the UV-C treatments at the doses of 3.40 and 6.80 kJ/m^2 . Parameters increased again and reached levels comparable to the control at the 6th day, with the exception of the highest dose treatment (6.80 kJ/m^2).

4.1.2. Microscopic observations of the epidermal cells

After the UV-C treatments, microscopic observations (Fig. 2) revealed an increasing level in the fluorescence of the walls with increasing doses of UV-C irradiation, associated with a progressive alteration of epidermal cells and stomata. The 3.40 kJ/m^2 and 6.80 kJ/m^2 UV-C doses induced the highest levels of damage as indicated by the dissociation of cells.

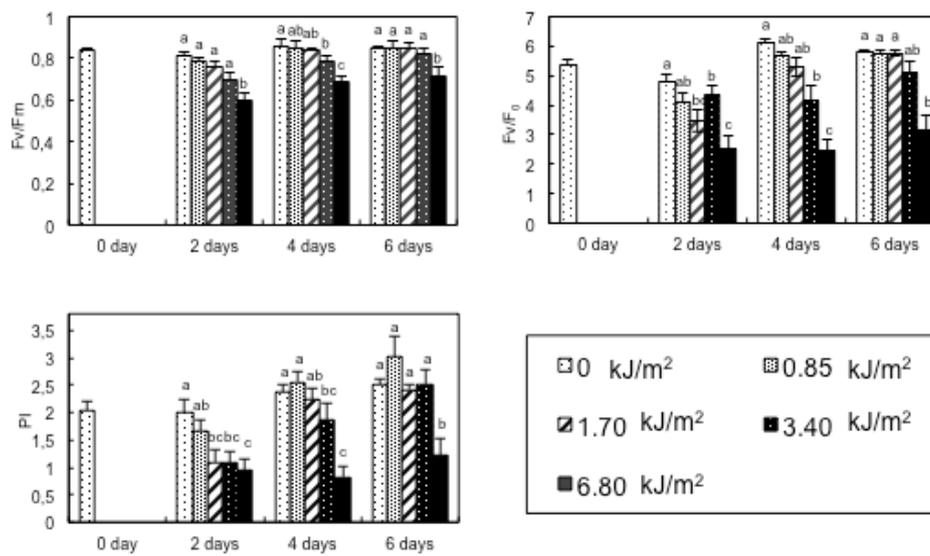


Figure 1: Effect of different doses of UV-C radiation on maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m and F_v/F_0), on the performance index (PI) and its components of leaves after a single exposure to UV-C radiation. Bars represent standard errors ($n = 20$). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P < 0.05$)

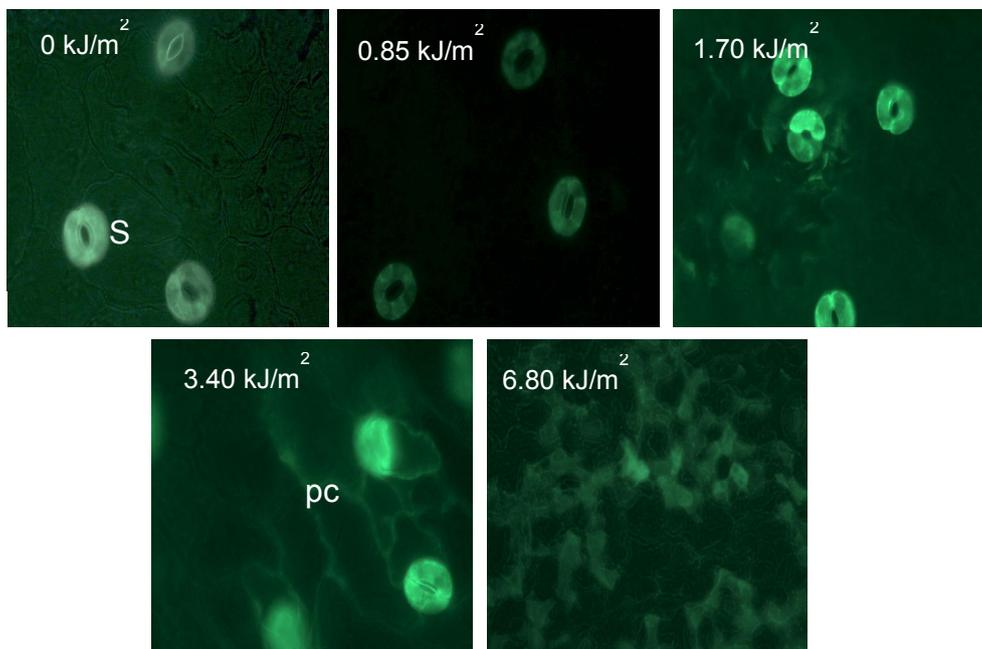


Figure 2: Effect of different doses of UV-C radiation on the cellular organization of the epidermis of leaves (S: stomata; pc: cell wall) after a single exposure to UV-C radiation.

4.1.3. Determination of pigments and malondialdehyde

Six days after the UV-C treatments, we observed no differences in the concentrations of chlorophylls a and b and of total chlorophyll for the 0.85 kJ/m² and 1.70 kJ/m² doses when compared to the control (Fig. 3). However, there was a decline in the amount of pigments in plants exposed to high doses of UV-C (3.40 kJ/m² and 6.80 kJ/m²).

Similarly, there was a significant decrease in the concentration of total carotenoids in plants exposed to high doses of UV-C (3.40 kJ/m² and 6.80 kJ/m²) when compared to the control (Fig. 3). No significant decrease was observed at 0.85 kJ/m² and at 1.70 kJ/m². There was an increase in the amount of MDA for UV-C doses of 3.40 and 6.80 kJ/m², but this increase was significant only at the dose of 6.80 kJ/m² (Fig. 3).

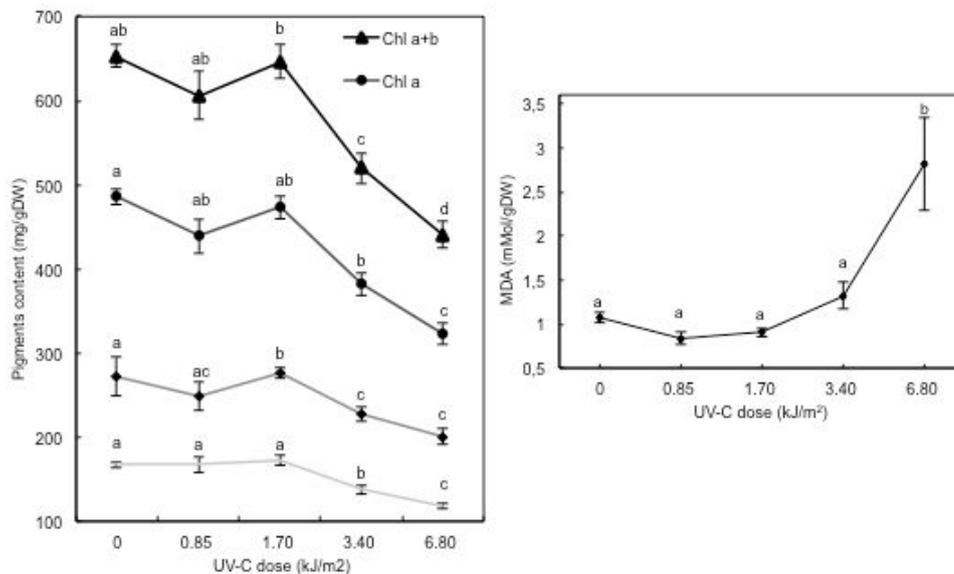


Figure 3: Effect of different doses of UV-C on the amount of (a) chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b), total chlorophyll (Chl a+b), total carotenoids and (b) membrane lipid peroxidation (MDA: malondialdehyde) of leaves after a single exposure to UV-C radiation. Bars represent standard errors (n = 5). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05).

4.2. Resistance to *B. cinerea* after irradiation with UV-C

4.2.1. Effect of a single exposure to UV-C radiation

The leaves exposed to a UV-C dose of 0.85 kJ/m² presented 10-20% smaller lesions than those of the control plants between the 6th and the 7th day after inoculation (Fig. 4). By contrast, lesions were significantly larger (by 21% to 75%) when the leaves were exposed to UV-C radiation at a dose of 1.70 kJ/m² (Fig. 4A). We have thus demonstrated that the dose of 1.70 kJ/m² increased the susceptibility of lettuce leaves to *B. cinerea* 48 h after exposure to UV-C radiation whereas the dose 0.85 kJ/m² slightly increased resistance.

Single doses of UV-C radiation of either 0.85 kJ/m² or 1.70 kJ/m² did not seem to provide any agronomic advantage, with 0.85 kJ/m² having a minor effect on disease resistance and 1.70 kJ/m² even increasing the susceptibility of lettuce to *B. cinerea*.

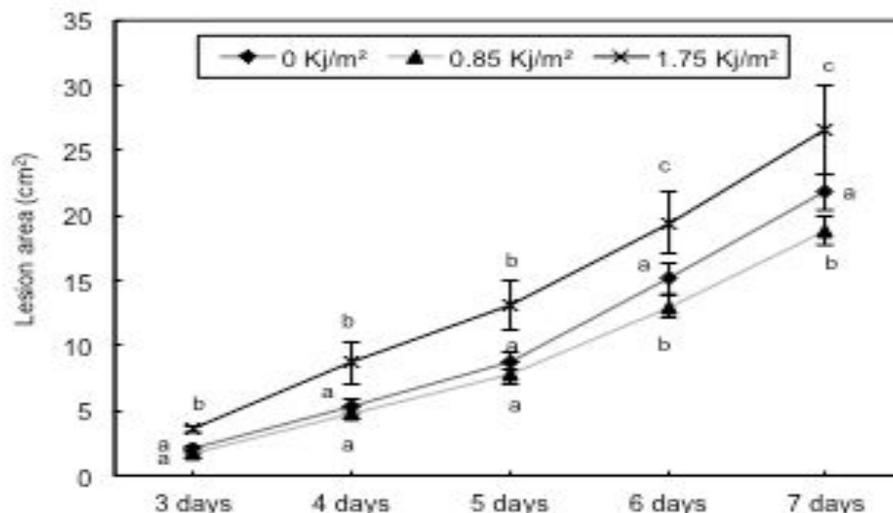


Figure 4: Effect of UV-C irradiation on lesion diameters (mm) on the leaves of lettuce. Plants exposed to a single and different doses of UV-C (0 kJ/m², 0.85 kJ/m² and 0.70 kJ/m²) and inoculated by *B. cinerea*, 48 hours after UV-C treatment. Bars represent standard errors (n = 15). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05).

4.2.2. Effect of four successive exposures to UV-C radiation

We conducted a last experiment that consisted in applying four successive doses of 0.85 kJ/m² on 4-week-old seedlings. The UV-C treatments were applied at 48 h intervals and represented a total dose of 3.40 kJ/m². Lettuce leaves inoculated with *B. cinerea* two days after the end of the UV-C treatments,

presented 26 % and 33 % smaller lesions areas when compared to the control on the 3rd and the 7th days after inoculation respectively (Fig. 4B). The histological study confirms findings regarding susceptibility. Penetration of *B. cinerea* (Table 1), in the main rib or nearby, is deeper in untreated plants than in control plants.

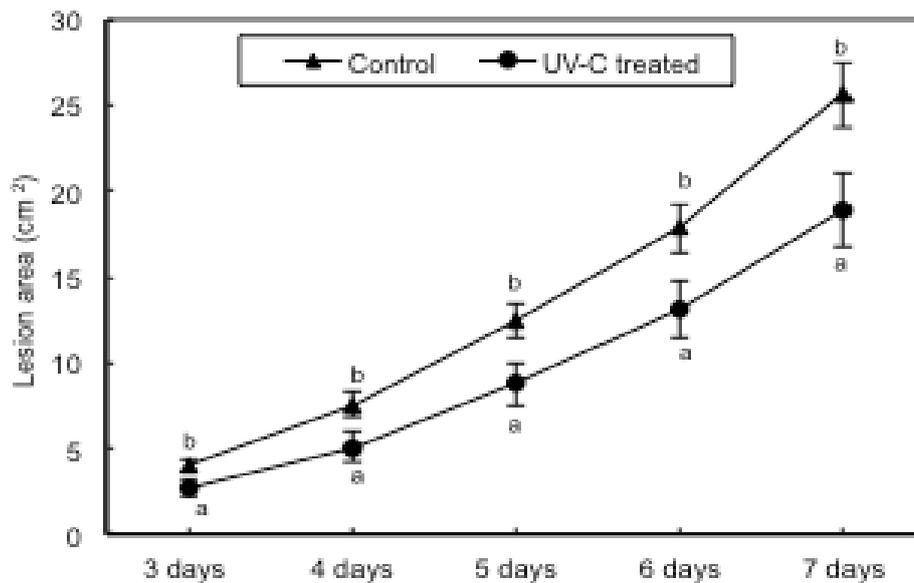


Figure 5: Effect of UV-C irradiation on lesion diameters (mm) on the leaves of lettuce. Plants exposed to four successive UV-C doses (each dose is equal to 0.85 kJ/m²) and inoculated by *B. cinerea*, 48 hours after UV-C treatment. Bars represent standard errors (n = 15). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05).

Treatments	On the rib		Next to the rib	
	Control	UV-C	Control	UV-C
Penetration index	1.45 ± 0,24	0.57± 0,07	1.87 ± 0,23	0.41± 0,10
p-value	0.002		0.0001	

Tab. 1: Penetration of *B. cinerea* in different cell layers of lettuce leaves 24 h after inoculation. Mycelia implants were placed on or near the main rib of leaves. Penetration was assessed by histology and noted as follows: 0, absence of pathogen; 1, presence of pathogens under the cuticle; 2, presence of pathogens under the epidermis; 3, presence of pathogens in parenchyma. Data represent means ± standard errors (n=30). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P< 0.05).

4.3. Physiological plant responses of four successive doses of UV-C radiation

4.3.1. Parameters derived from chlorophyll fluorescence measurements

Two days after successive UV-C treatments, the maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) was found lower in leaves treated when compared to untreated control plants (Table 2). Similarly, the value of PI in the treated leaves appears low when compared to the control. This decrease can be attributed to a decrease in the light reactions of primary photochemistry (F_v/F_0). The density of active reaction centres on a chlorophyll basis (RC/ABS), and the dark reactions ($(1-V_j)/V_j$) remained similar to the control (Table 2).

4.3.2. Pigments, malondialdehyde, total phenols and enzymatic activities

Repeated exposure to a dose of 0.85 kJ/m^2 did not impact negatively the concentrations in total chlorophylls and total carotenoids (Table 3). Similarly, there was no significant difference in concentrations of MDA as a consequence of repeated exposure to UV-C radiation (Table 3). However, we observed an increase in total phenols content and PAL activity in plants treated with successive doses of UV-C radiation compared to the control (Table 3 and 4). The activities of SOD, GR and APX were not affected by the UV-C treatment. In contrast, CAT and MDAHR activities were increased (Table 4).

	Control	UV-C treatment	p-value
F_v/F_0	6.067 ^a ±0.085	5.664 ^b ±0.096	0.009
F_v/F_m	0.858 ^a ±0.001	0.849 ^b ±0.002	0.007
PI	2.701 ^a ±0.106	2.363 ^b ±0.141	0.037
RC/ABS	0.815 ^a ±0.021	0.771 ^a ±0.035	0.147
$(1-V_j)/V_j$	0.545 ^a ±0.008	0.535 ^a ±0.013	0.381

Tab. 2: Evolution of F_v/F_0 , F_v/F_m , PI, RC/ABS and $(1-V_j)/V_j$ of plant leaves exposed to four successive UV-C doses (each dose was equal to 0.85 kJ/m²). Data represent means ± standard errors (n = 20). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05).

	Control	UV-C treated	p-value
Chl T ($\mu\text{g g}^{-1}$ FM)	1265.5 ^a \pm 189.1	1143.9 ^a \pm 159.74	0.095
Car T ($\mu\text{g g}^{-1}$ FM)	271.62 ^a \pm 31.22	245.55 ^a \pm 39.91	0.210
MDA (nmol g^{-1} FM)	4.90 ^a \pm 0.80	4.10 ^a \pm 0.42	0.322
PAL ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ FM)	11.05 ^a \pm 0.02	16.60 ^a \pm 0.02	0.001
Tot phe (mg EAG g^{-1} FM)	2.69 ^a \pm 0.16	3.40 ^b \pm 0.19	0,008

Tab. 3: Effect of four successive doses of UV-C radiation on the amount of total chlorophyll (Chla+b), total carotenoids, membrane lipid peroxidation (MDA: malondialdehyde), total phenolic (Tot Ph)s and Phenylalanine lyase (PAL). Data represent means \pm standard errors (n = 5) Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05).

	Control	UV-C treated	p-value
CAT (nmol mg ⁻¹ FM)	0.320 ^a ± 0.02	0.580 ^b ± 0.04	0.011
SOD (U mg ⁻¹ FM)	3.970 ^a ± 0.77	3.830 ^a ± 0.31	0.832
GR (nmolmg ⁻¹ FM)	15.07 ^a ± 2.15	13.17 ^a ± 1.03	0.285
MDAHR (mg g ⁻¹ FM)	17.06 ^a ± 1.33	21.26 ^b ± 1.01	0.028
APX (mg g ⁻¹ FM)	1.357 ^a ± 0.16	1.460 ^a ± 0.19	0.346

Tab. 4: Effect of four successive doses of UV-C radiation on the activities of CAT, SOD, GR MDAHR and APX. Bars represent standard errors (n = 5). Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05).

5. Discussion

The response of plants subjected to UV radiation depends on the rate, the duration, the dose and the wavelength of the UV treatment (Pontin *et al.*, 2010). UV-B irradiation has often been observed to induce resistance against pathogens in a number of plant species during growth (Gunasekera and Paul, 2007; Ballare 2011; Kuhlmann and Müller, 2011; Demkura and Ballaré, 2012). It is therefore tempting to exploit them as an alternative method to pesticides. But UV-B radiation requires lengthy periods of exposure to be effective, typically several days or even weeks. Hence the idea to use UV-C radiation treatments, which are able to supply large amounts of energy in a very short period of time. There is however a difficulty when dealing with UV-C radiation. UV-C radiation can be easily damaging and even lethal to plants, even more so than UV-B radiation. The lethal effect of relatively mild doses of UV-C radiation has been exploited successfully to control post-harvest diseases, thus extending the shelf life of fruits and vegetables (Lu *et al.*, 1987; Baka *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 1993a; Liu *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1997; Mercier *et al.*, 2001; Charles *et al.* 2008a; Siddiqui *et al.*, 2011). While illustrating the potent damaging effect of UV-C radiation, these studies at the same time demonstrate that it is possible to define doses, which deliver the desired effect without negative side effects on the stored plant organs.

Several studies even point out that UV-C radiation may stimulate the secondary metabolism, which is known to play a role in both the health benefits of harvested organs and defenses of plants (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2015). Surprisingly, observations about the effect of UV-C radiation against pathogens during plant growth are extremely scarce (Urban *et al.*, 2016), with one study demonstrating that treatment of *Arabidopsis* plants with UV-C radiation induced resistance against the oomycete pathogen *Hyaloperonospora parasitica* (Kunz *et al.*, 2008). To our knowledge, the results presented here are the first to demonstrate a similar effect on a crop plant. They are also the first observations demonstrating a superior effect when doses are repeated at regular intervals of time.

One of our major challenges in the present study was to find a dose that is both effective against the targeted pathogen and harmless for plants. We exploited data from the literature to define the doses we selected for the trial.

Mercier *et al.*, (1993b; 2001) found that a dose as low as 0.88 kJ/m² was sufficient to induce resistance in stored carrots and bell peppers. Doses of 3.7 and 5.0 kJ/m² were found to be necessary to induce resistance in tomato (Maharaj *et al.*, 1999; Charles *et al.*, 2008a) and lemon (Ben-Yehoshua *et al.* 1992), respectively. Doses ranging from 3.6 kJ/m² to 7.5 kJ/m² were effective in controlling natural infections in apple, peach, onion and sweet potato (Lu *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 1990).

Clearly the higher doses of UV-C radiation (3.40 kJ/m² or 6.80 kJ/m²) tested here were strongly damaging to lettuce, as shown by yellowing of leaves and destruction of epidermal cells. It has been repeatedly observed that exposure to abiotic or biotic stresses increase the production of reactive oxygen species (ROS) in plants (Ait-Barka *et al.*, 2000; Mazid *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2007; Ballhorn *et al.*, 2009). When ROS are not scavenged effectively and accumulate, cytotoxic effects can be observed, including damage to membranes, proteins, chlorophylls and nucleic acids (Scandalios, 1997; Hollósy, 2002). In the present study, the high levels in MDA observed in leaves as a consequence of UV-C radiation at 3.40 kJ/m² and 6.80 kJ/m² suggest that oxidative stress was strong enough at these doses to damage membranes. UV-C radiation at 3.40 kJ/m² and 6.80 kJ/m² also affected the photosynthetic apparatus as shown by F_v/F_m, F_v/F₀ and PI data.

Our observations are consistent with what is known about the potential damaging effect of both UV-B and UV-C radiation on the structure of thylakoids (Bornman *et al.*, 1983). While both high doses of UV-C radiation were undoubtedly damaging, the picture appears more contrasted for the two lower doses of 0.85 kJ/m² and 1.70 kJ/m². On one side the PI data suggest that 1.70 kJ/m² is a dose with negative effects (day 2), and on the other hand, neither MDA data nor visual and microscopic observations, pigment or F_v/F_m data were modified, knowing that the performance index (PI) is one of the most sensitive indicators of stresses in plants (Poiroux-Gonord *et al.*, 2013). Moreover the negative effect we observed on PI for the 1.70 kJ/m² treatment was reversible, since the parameter had recovered by day 4. At any rate, the lowest dose of UV-C radiation (0.85 kJ/m²) did not affect any of the parameters of this trial, suggesting strongly that this dose is truly harmless. The impact difference on leaves physiology between the 0.85 kJ/m² and the 1.70 kJ/m² treatments was

slight. Hence, we carried out further experiments with both doses for the evaluation of infection severity.

According to our observations of lesion areas, submitting plants to a single low dose of 0.85 kJ/m^2 did not substantially increase the resistance of lettuce against *B. cinerea*, whereas the dose of 1.70 kJ/m^2 increased its susceptibility, indicating the harmful effect of this higher dose. Thus, we examined the effect of the lower dose of 0.85 kJ/m^2 applied for times intermittently. This time we observed a substantial positive effect on lesion areas, which became apparent 3 days after inoculation and increased until the end of the trial, i.e. 7 days after inoculation. At that time, the reduction in lesion area had reached 33% in the plants inoculated two days after the end of the UV-C treatment. This is in contrast to the observation of Mercier *et al.* (2001) on post-harvest bell pepper fruit, where two successive applications of UV-C dose of 0.88 kJ/m^2 was less effective, suggesting differences in the response to UV-C between senescing plant bodies and growing vegetative bodies. Our new treatment depressed PI and even F_v/F_m and F_0/F_m . However this latter negative effect was a very moderate one because repeated exposure to a dose of 0.85 kJ/m^2 did not affect pigments and MDA. The activities of CAT and MDAHR leaves of UV-C stressed plants were significantly stimulated compared to control plants. The induction of these enzymes coincided with stable concentrations of MDA in UV-C treated plants when compared to the control. Oxidative stress and low damage certainly play a role, suggesting the induction of defense mechanism, probably involving production of antioxidants and activation of antioxidative enzymes. Oxidative signaling has been shown to be involved in cross-talk responses (Fujita *et al.*, 2006) and in priming mechanisms. Our results clearly show that low and successive UV-C treatments are perceived by plants and have positive impact on the susceptibility of lettuce to *B. cinerea*. In this study, the successive UV-C doses applied on lettuce plants caused significant increases in PAL activity and total phenolics. The production of phenolic compounds such as lignin and suberin that deposit on cell walls and serve as reinforced barriers against pathogen attack. UV-C induced ultrastructural modification of the tomato fruit epicarp, causing the formation of a zone of stacked cell walls which were later to be impregnated with lignin and suberin rendering cell walls less prone to degradation by hydrolytic enzymes secreted by *B. cinerea* (Charles *et al.* 2008c,

2008d) and the enhancement of fungal cell wall hydrolases in the plant tissue (Charles *et al.* 2009). Most of the above mentioned defense-related compounds are involved in the line of defense against the necrotrophic fungus *B. cinerea* (Jarvis, 1980). Our results show a slower penetration of *B. cinerea* in the UV-C treated leaves compared to the control leaves.

The observations we made of the stimulating effect on plant defenses of UV-C treatments applied before inoculation, are very encouraging. The agronomic perspectives of UV-C radiation are sufficiently exciting to provide a strong incentive for studies in the future aiming at improving our understanding of the mechanisms of UV-C perception and signalling in relationship with plant defenses. Our observations are encouraging: the potential for UV-C light to be at the origin of plant defences during their growth becomes more and more evident. However, little information is available about the effects of UV-C light on the mechanisms responsible for the stimulation of plant defences. Thus, a clear understanding of the way UV-C radiation are perceived by plants and translated to defense mechanisms is necessary, before the use of UV-C be recommended for field use.

Chapitre III

**Les rayonnements UV-C, un moyen
pour stimuler les défenses de la
tomate en cours de culture contre
*Botrytis cinerea***

A/ ORIGINE ET DIVERSITE DE LA TOMATE :

1/ Présentation

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) appartient à la famille des solanacées qui regroupe plus de 3000 espèces, aussi bien alimentaires dont notamment (la pomme de terre, la tomate, l'aubergine ou le piment) qu'ornementales (pétunia). Certaines espèces, riches en alcaloïdes, sont mondialement connues pour leurs usages médicaux et leurs effets psychotropes (le tabac). Originaires des Andes péruviennes, la tomate a vraisemblablement été domestiquée pour la première fois au Mexique, puis sa culture s'est développée en Europe suite à l'arrivée des «conquistadores» (Petit 2013).

La tomate est une plante herbacée pérenne (dans des conditions climatiques adaptées) mais elle est cultivée comme une plante annuelle dont le développement végétatif se caractérise par une architecture sympodiale. Les plants se caractérisent soit par une croissance indéterminée, c'est-à-dire qu'ils produisent une tige unique qui continue de croître lorsque les branches latérales sont supprimées, soit déterminée, c'est-à-dire qu'ils se terminent par un petit groupe d'inflorescences dont la structure rappelle celle d'un buisson (Figure 8).



Figure 8: Inflorescence chez la tomate.

La tomate possède sur ses feuilles et sur ses tiges des trichomes, poils glandulaires sécrétant des substances de défenses (acylglycérols, sesquiterpènes) vis-à-vis d'un grand nombre de ravageurs et de maladies. La fécondation chez la tomate cultivée est autogame. Le fruit de la tomate est une baie composée d'un péricarpe charnu et une pulpe (placenta) qui renferme les graines.

2/ La production de tomate

Si la plupart des cultures de tomates se pratiquent en plein champ, la production sous des serres en verre ou des tunnels recouverts de bâches en plastique est de plus en plus courante pour l'approvisionnement des marchés en fruits frais. Les cultures de tomates sous serre peuvent être maintenues pour une durée de 11 mois, contrairement aux cultures en plein champ qui durent 5 mois.

La tomate constitue environ 25 % des surfaces cultivées en légumes et environ 20% de la production mondiale de légumes hors pomme de terre (Hutin 2011). En 2012, il a été produit dans le monde 164,5 millions de tonnes de tomate sur une surface de 4,7 millions d'hectares contre 64 millions de tonnes en 1988 (FAOstat, 2012). La culture de la tomate sous serre dans le monde représente environ 2,4 millions d'hectares dont 45 000 hectares sont constitués de serres en verre (van Lenteren, 2006). En Europe, la tomate constitue une part très importante de la production légumière totale, avec environ 28 % en volume pour 17,7 millions de tonnes produites (Eurostat, 2015). En France, la production représente 800 000 tonnes pour une superficie développée de 4950 ha dont 2 000 ha de serre (Baros 2016).

3/ Préférences pédo-climatiques et fertilisation

Les tomates aiment les saisons chaudes et craignent le gel à n'importe quel stade de leur croissance. La plage de température optimale pour la culture des tomates est comprise entre 18 et 27 °C. Les températures supérieures à 27 °C restreignent la formation des fleurs. Pour cette raison, la plupart des cultures de plein champ sont situées dans des régions à climat tempéré, entre les 30^{ème}

et 40^{ème} parallèles, aussi bien dans l'hémisphère nord que dans l'hémisphère sud. Toutefois, avec l'introduction de variétés modernes, les tomates sont de plus en plus cultivées dans des conditions climatiques tropicales à températures plus élevées. L'humidité relative optimale des cultures sous serre varie de 60 à 80 %. Dans le cas des cultures hydroponiques, l'humidité relative nocturne et diurne se monte en général respectivement à 75 % et 85 %.

Les tomates sont sensibles aux conditions de faible luminosité. Elles exigent un minimum de 6 heures d'ensoleillement direct pour fleurir. Toutefois, en cas de trop grande intensité du rayonnement solaire, des fentes, des brûlures solaires et une coloration inégale peuvent apparaître au stade de maturité.

Les tomates s'accommodent d'une vaste gamme de sols à condition qu'ils soient bien drainés et structurés. Le plant de tomate élabore une masse racinaire fibreuse capable d'exploiter le sous-sol en l'absence d'horizons compactés. La majorité du système racinaire se concentre généralement dans la couche arable (60 cm de profondeur) et 70 % de ce volume réside dans les 20 cm supérieurs de cette couche. Les tomates nécessitent une nutrition appropriée. Ainsi, les meilleures cultures sont obtenues sur les sols plus fertiles.

Le pH optimal du sol se situe entre 6,0 et 6,5. Les tomates sont toutefois cultivées sur des sols dont le pH est compris entre 5,0 à 7,5. Lorsque le pH est inférieur à 5,5, la disponibilité en magnésium et en molybdène diminue. Lorsqu'il est supérieur à 6,5, les niveaux de zinc, de manganèse et de fer deviennent insuffisants.

Un excès d'eau dans des conditions de sol anaérobies entraîne cependant l'asphyxie des racines, ainsi qu'un retard dans la floraison la nouaison. Et de nombreux troubles des fruits comme le problème de fendillement. Le stress dû à une insuffisance en eau peut également affecter la floraison.

4/ Composition et conditions de conservation et de transport

Outre ses qualités gustatives, son principal atout nutritionnel est sa richesse particulière en vitamine C et lycopène, substances anti-oxydantes dont les effets protecteurs sur la santé ont largement été démontré. Riche en eau

(environ 95 %), la tomate ne dépasse guère 15 calories aux 100 grammes. L'essentiel de son apport énergétique est assuré par ses glucides (fructose et glucose). On trouve aussi des fibres composées de celluloses, d'hémicelluloses, et de pectines. Les protéines et les lipides ne sont présents qu'en toute petite quantité. Elle constitue une bonne source de vitamine C et B (notamment B3, B5 et B9). Elle contient également des caroténoïdes: des carotènes, précurseurs de la vitamine A. La tomate contient aussi du potassium, du phosphore et du magnésium, ainsi que des oligo-éléments: fer, zinc, cobalt, nickel, fluor, bore... concentrés dans sa peau et ses graines.

La tomate fraîche ferme est moins susceptible d'être endommagée et bénéficie d'une durée de conservation plus longue. De forts niveaux de calcium dans la paroi cellulaire améliorent la fermeté des fruits et par conséquent, leurs caractéristiques de transport et d'entreposage. Lorsqu'elles sont destinées à la mise en conserve, les tomates doivent posséder une paroi épaisse et ferme afin de conserver leur forme lors de la cuisson. Le pédoncule doit également être facile à retirer du fruit. La fermeté des fruits diminue au fur et à mesure qu'ils mûrissent. L'utilisation de calcium contribue à réduire la dégradation des pectines en maintenant la cohérence de la matière pectique et donc la robustesse de la paroi cellulaire.

5/ Principales maladies de la tomate

Bien que des solutions existent, des problèmes se posent à la culture de tomate quant à la lutte contre de nombreuses attaques parasites qui sont les ravageurs, les virus, les bactéries et les champignons. Ces pathogènes sont capables de développer des résistances suite à l'emploi répété des pesticides. Parmi les maladies fongiques on trouve: le mildiou causé par *Phytophthora infestans*, l'alternariose dont le mycète responsable est *Alternaria tomatophila*, la septoriose causée par *Septoria lycopersici*, l'oïdium: du à *Oidium neolycopersici*, la fusariose provoqué par *Fusarium oxysporum* et la verticilliose causée par *Verticillium albo-atrum* et *Verticillium dahliae*. En fin la moisissure grise causée par *Botrytis cinerea*, qui est une maladie très répandue dans les cultures de tomate sous abris. Les symptômes observables sur fleurs, fruits, tiges et feuilles se traduisent généralement par un pourrissement des tissus

infectés, suivi par l'apparition d'un feutrage gris due a une production importante de spores (Figure 9). *Botrytis cinerea* peut entrainer des pertes de rendements importantes en affaiblissant les plantes et en les détruisant (Williamson *et al.*, 2007).



Figure 9: Les différents symptômes causés par *B. cinerea*

B/ LES RAYONNEMENTS UV-C, UN MOYEN POUR STIMULER LES DEFENSES DE LA TOMATE CONTRE BOTRYTIS CINEREA EN COURS DE CULTURE

1/ Résumé

Les applications post-récolte du rayonnement UV-C se sont avérées très efficaces pour réduire le développement des maladies post-récolte dans de nombreuses espèces, y compris la tomate. Plusieurs études suggèrent que les rayonnements UV-C sont efficaces non seulement en raison de leur effet désinfectant, mais aussi parce qu'ils peuvent stimuler les défenses des plantes. Le traitement pendant la culture des plantes de tomate avec les rayonnements UV-C peut donc offrir un potentiel intéressant pour la protection de la tomate contre les bioagresseurs. Dans ce travail, nous avons démontré que des traitements d'UV-C de $0,85 \text{ kJ/m}^2$ ou $1,70 \text{ kJ/m}^2$ apportés en une seule fois permettent de stimuler les défenses des plantes de tomate contre *Botrytis cinerea*. La diminution de la sensibilité des plantes de tomate traitées aux rayonnements d'UV-C est liée à une augmentation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes comme la glutathion réductase (GR), la catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX) chez ces plantes par rapport aux plantes témoins.

2/ Introduction

La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est une maladie sévère sur un large éventail de cultures d'importance économique (Jarvis, 1980). Le contrôle chimique reste la principale mesure pour réduire l'incidence de ce pathogène dans la plupart des cultures, mais la résistance de *B. cinerea* à la plupart des fongicides a été signalée dans le monde entier (Leroux, 2004). De plus, des inquiétudes sont exprimées concernant les effets potentiellement néfastes des intrants chimiques sur la biodiversité intrinsèque des écosystèmes, mais également les nuisances potentielles sur la santé des consommateurs. Dans ce contexte, le développement de nouvelles méthodes non polluantes serait nécessaire.

Les rayonnements UV-C ont été étudiés de manière approfondie pour réduire la détérioration des maladies post-récolte pour les produits horticoles récoltés en exerçant un effet germicide direct et / ou en stimulant leur défense (Terry et Joyce, 2004). Ceux-ci incluent l'induction d'une large gamme d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la peroxydase (POD), la polyphénol oxydase (PPO) et l'ascorbate peroxydase (APX) (Kim *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2011; Darras *et al.*, 2012a), la production de phytoalexines telles que la rhishitine (Charles *et al.*, 2008a) et la camalexine (Ahuja *et al.*, 2012), les PR-protéines des familles PR2, PR3 (Charles *et al.*, 2009), P4, P8 et P11 (Liu *et al.*, 2011), les flavonoïdes (Shimazaki *et al.*, 1988, Cerovic *et al.*, 2002) et des composés phénoliques tels que la lignine et la subérine qui se déposent sur les parois cellulaires et servent de barrières renforcées contre l'attaque des agents pathogènes (Charles *et al.*, 2008b). La plupart des composés mentionnés ci-dessus sont impliqués dans la ligne de défense contre le champignon nécrotrophe qu'est *Botrytis cinerea* (Jarvis, 1980). Récemment, Vasquez *et al.* (2017) ont démontré que des plantes de laitue traitées aux rayonnements UV-C pendant leur croissance manifestent une diminution de sensibilité vis à vis de *B. cinerea*. Cette diminution est liée à une augmentation de l'activité de la PAL, CAT, et MDAHR et un ralentissement de la progression du pathogène au niveau de l'épiderme des feuilles de laitue traitées aux UV-C.

L'infection des plantes de tomate par *B. cinerea* et les symptômes qui se développent ont fait l'objet de nombreuses études (Bardin *et al.*, 2008; Nicot and Baille, 1996). Les symptômes d'infection peuvent apparaître sur les tiges, les feuilles et les fruits sous forme de lésions nécrotiques gris foncé ou noir. Cela peut entraîner de graves pertes économiques pour les producteurs et les vendeurs du monde entier (Jarvis, 1992; Williamson *et al.*, 2007). Charles *et al.* (2008c, 2008d 2009) ont montré des modifications ultrastructurales de l'épisperme des fruits tomates induites par les rayonnements UV-C, provoquant ainsi la formation d'une zone de paroi cellulaire épaisse imprégnée par la lignine et la subérine rendant les fruits de tomates résistants à des attaque de *B. cinerea*. Il serait donc intéressant de tester l'effet des rayonnements UV-C sur le comportement des feuilles de tomate en croissance vis à vis de *B. cinerea*.

L'objectif de ce travail est de confirmer les résultats obtenus chez la laitue à savoir que les rayonnements UV-C sont capables de stimuler aussi la défense des plantes de tomate contre *B. cinerea*. Ce travail est réalisé en deux parties : 1/ déterminer la dose hormique d'UV-C. 2/ Analyser quelques mécanismes susceptibles d'intervenir dans la défense des plantes contre *B. cinerea* après traitement aux rayonnements UV-C.

3/ Matériels et méthodes

3.1/ Matériels végétaux

Tout au long de nos expériences, des tomates (*Solanum lycopersicum*) de la variété Monalbo/INRA' ont été utilisées. Le semis, la plantation, l'entretien et la récolte des tomates ont été réalisés dans des pots sur des tablettes, sous serre de verre en conditions contrôlées (température : 24°C jour 16°C nuit, photopériode : 16 h de lumière 8 h d'obscurité) et sous filet afin d'éviter toute contamination par des insectes ou autres ravageurs. Les graines ont été semées dans des bacs à semis de 72 puits contenant du terreau (Klasmann TS3 standard 425), composé de tourbes de sphaignes. Après l'obtention de plantes, au stade de quatre feuilles (après une semaine), les plantules ont été repotées individuellement dans des pots contenant le même terreau que celui utilisé pour les semis pendant 5 semaines (Figure 10).



Figure 10: Plantes de tomate âgées de 5 semaines

L'irrigation est réalisée par arrosage automatique avec piquets diffuseurs, chaque pot contient 2 piquets (60 ml) dans un premier temps, puis 3 (90 ml) à l'arrivée des grosses chaleurs.

3.2/ Traitements aux rayonnements UV-C

Le dispositif utilisé lors des traitements est une enceinte UV-C comportant un plafond lumineux avec 9 lampes UV-C (254 nm) (Figure 11).



Figure 11: Système de traitement à base d'UV-C

Le calcul de la dose est effectué grâce à des mesures d'intensité lumineuse selon un temps donné: les mesures d'intensité lumineuse ont été réalisées avec un radiomètre positionné à 30 cm du plafond lumineux.

Des doses et des fréquences d'application ont été choisies:

Application unique des UV-C : 0,21 – 0,40 – 0,85 – 1,70 kJ/m².

Les rayonnements UV-C ont été testés sur des plantes de tomate âgées de plus de 5 semaines. Chaque dose a été administrée une fois aux plantes 48h avant leur inoculation. Comme la lumière blanche semble avoir un effet réparateur des effets des UV-C en activant des photolyases (Mercier *et al.*, 2001). Pour éviter cette interaction, les plantes sont mises à l'obscurité pendant 12 h après chaque traitement UV-C.

3.3/ Mesures de la fluorescence

Le comportement de photosystème II (PSII) peut être évalué au moyen d'une cinétique rapide de la fluorescence de la chlorophylle a (Chl a) émise par des feuilles des plantes soumises à l'obscurité et suivi d'un éclairage avec une lumière saturante. La fluorescence de la chlorophylle a été utilisée pour évaluer l'état des plantes de tomate au moment de chaque expérimentation. La fluorescence de la chlorophylle a été mesurée en utilisant un Handy (PEA, Hansatech, Royaume-Uni). Les feuilles de tomate sélectionnées ont été placées durant 30 minutes à l'obscurité. Puis, la fluorescence a été déterminée après un court flash d'une intensité lumineuse de 3000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les paramètres de fluorescence ont été calculés automatiquement au niveau du Handy PEA et les données ont ensuite été extraites et traitées avec le logiciel Excel.

3.4/ Détermination de la teneur en chlorophylle totale et des caroténoïdes

Les teneurs en chlorophylle a et b et en caroténoïdes ont été déterminées après leur extraction à partir de 100 mg de matière fraîche (MF), précédemment broyées dans de l'azote liquide, dans 1 ml d'acétone pure à 100% (Solvant). Les échantillons ont ensuite été incubés 15 min à l'obscurité dans de la glace. Puis ils ont été centrifugés à 4 °C durant 5min à 15000 g. La détermination des quantités de chlorophylles et de caroténoïdes a été effectuée immédiatement après l'extraction. Les lectures d'absorbance ont été effectuées à 662 et 645 nm pour les pigments de chlorophylle et 470 nm pour les caroténoïdes à l'aide d'un

spectrophotomètre Biochrom, libra S6. La teneur a été calculée en utilisant de la formule de Lichtenthaler (1987) :

$$\bullet \text{Chla } (\mu\text{g/ml}) = 11.24\text{DO662} - 2.04\text{DO645}$$

$$\bullet \text{Chlb } (\mu\text{g/ml}) = 20.13\text{DO645} - 4.19\text{DO662}$$

$$\bullet \text{Car } (\mu\text{g/ml}) = (1000\text{DO470} - 1.90\text{Chla} - 63.14\text{Chlb}) / 214$$

Ces résultats sont ramenés au poids frais des échantillons préalablement pesés ($\mu\text{g/g}$ de Matière fraîche, MF).

3.5/ Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

Après broyage des feuilles avec un broyeur à billes environ 200 mg mélangée avec 1 ml d'acide trichloracétique (TCA 0.1%) puis centrifugé à 4°C durant 15 min à 15000g. Un volume de 0.5 ml de surnageant est prélevé puis supplémenté avec 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA 0.5% préparé dans du TCA 20%). Ces échantillons sont ensuite été incubés 30 min dans un bain marie à 95°C puis la réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans de la glace pilée pendant 30 min. Afin d'éviter l'apparition des bulles dans les tubes, chaque échantillon a été transféré dans un tube à hémolyse et du Butanol a été ajouté (au même volume que l'échantillon). Deux phases apparaissent, la phase colorée est récupérée et les absorbances sont mesurées à 532 et 600 nm. Après soustraction de l'absorbance non spécifique lue à 600nm, la concentration du malondialdéhyde est calculée à l'aide de son coefficient d'extinction molaire ($155\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3.6/ Dosage et caractérisation des polyphénols

Environ 200 mg de MF broyée est supplémenté avec 20 ml d'éthanol 70% puis broyé à nouveau pendant 1 min avec un ultraturrax. Après agitation à l'obscurité pendant 30 min, l'échantillon est filtré sur un Büchner puis le surnageant est complété à 50 ml. Lors de cette étape, les composés phénoliques solubles sont extraits. L'extraction des composés phénoliques liés dans les feuilles de tomate se fait à partir des résidus provenant de précédentes extractions de phénols solubles. Les résidus ont subis des traitements successifs afin d'éliminer les phénols solubles résiduels par 2 lavages avec du

méthanol à 70 %, un lavage avec de l'acétone à 80 % et 3 lavages avec de l'acétone pure. Chaque lavage est réalisé avec 6 mL de solvant puis le surnageant est éliminé entre chaque bain. L'ensemble des résidus est ensuite séché à température ambiante et conservé à -20 °C. L'extraction des composés liés a eu lieu à partir de 40 mg de matière sèche auxquels on ajoute 5 mL d'hydroxyde de sodium à 4 N préalablement bullé sous azote liquide. L'extrait est ensuite incubé 1 h à 121 °C puis le pH est abaissé avec de l'acide chlorhydrique à 8 N et centrifugé à 5000 g pendant 5 min et à 4 °C. Le surnageant est conservé à 4 °C et à l'obscurité jusqu'au dosage des composés phénoliques liés.

Les dosages se font selon la méthode de Swain and Hillis modifié par Marigo (1973). La quantité de composés phénoliques liés est réalisée par rapport à une courbe d'étalonnage d'acide gallique. Pour la caractérisation des composés phénolique, 980 µL des extraits phénols solubles sont prélevés et filtrés puis mis dans des flacons HPLC (600 µl min) dans lequel 20µL de méthoxyflavone (étalon interne) sont ajoutés. L'analyse des composés phénoliques présents dans les échantillons est effectuée sur une chaîne HPLC (chromatographie liquide haute performance) Water 600 F.

3.7/ Activité de la phénylalanine ammonium lyase (PAL)

L'activité de la PAL a été mesurée comme décrit par Siriphanich et Kader (1985). Environ 200 mg de MF foliaire est homogénéisée à froid avec 4 ml de tampon borate 1 M (pH 8,6) contenant 5 mM de 2-mercaptoéthanol et 0,40 g. de polyvinylpyrrolidone. Ensuite, le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 20 min à 4 ° C et l'extrait est prélevé. Pour déterminer l'activité enzymatique, un mélange réactionnel est préparé avec l'extrait enzymatique de l'échantillon (0,5 ml) et 4 mL de tampon borate 0,1 M (pH 8,6) contenant 5 mM de 2-mercaptoéthanol et 0,1 M de phénylalanine. Après 1 heure d'incubation à 30 ° C, 400 mL d'acide trichloroacétique à 28% ont été ajoutés au mélange pour précipiter les protéines. Le mélange a été centrifugé à 12000 g pendant 20 min à 4 ° C après avoir passé 5 minutes à température ambiante. L'activité de la PAL est mesurée par spectrométrie à 290 nm est exprimée en mmol d'acide

trans-cinnamique produit/h¹.g¹ MF. L'analyse a été effectuée sur 5 plantes par traitement (n = 5).

3.8/ Activités enzymatiques antioxydantes

Environ 400 mg de feuilles en poudre sont homogénéisés dans 4 mL de tampon de phosphate de potassium 100 mM, pH 7.8, contenant 1 mM d'EDTA-Na₂, 5 mM de DTT, 15 mM de β-mercaptoethanol et 10% (% en poids) de polyclar AT. L'homogénat est centrifugé à 15 000 g pendant 15 min et le surnageant est stocké à 4 °C.

L'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) (EC 1.11.1.11) est mesurée selon la méthode Nakano et Asada (1981) en suivant la diminution de l'absorbance à 285 nm à 25 °C. Le mélange réactionnel (3 ml) contenait du tampon phosphate de potassium 50 mM (PH 7,0), 0,13 mM d'ascorbate, 0,1 mM d'EDTA-Na₂ et 3 mM de H₂O₂. La concentration d'ascorbate oxydé est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 2,8 mM⁻¹.cm⁻¹. Une unité d'APX est définie comme 1 mmol/ml d'ascorbate oxydé/min.

L'activité de la glutathion réductase (GR) (EC 1.6.4.2) a été déterminée à partir du taux d'oxydation du NADPH mesuré par la modification de l'absorbance à 340 nm à 25 °C, selon Foyer et Halliwell (1976). Le mélange réactionnel (3 ml) contenait du tampon tris 100 mM (pH 7,8), de l'EDTA-Na₂ 2 mM, du NADPH 50 uM, du GSSG 0,5 mM et de l'extrait. L'activité GR a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 6,2 mM⁻¹.cm⁻¹.

L'activité catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) a été analysée dans un mélange (3 mL) contenant 100 mM de tampon phosphate de sodium (pH 7,0), 6 mM d'H₂O₂ et d'extrait. À 25 °C, la décomposition de H₂O₂ est suivie à 240 nm (Cakmak et Marschner, 1992). L'activité CAT a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction de 39,4 M⁻¹.cm⁻¹.

L'activité superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) est mesurée en utilisant la méthode modifiée d'Oberley et Spitz (1984). Le mélange réactionnel contient 100 µl d'extrait, 800 µl d'une solution contenant (1 mM de tampon d'acide diéthylènetriaminepentaacétique (pH 7,8), 1,25 unité de catalase, 0,07 mM nitrobleu tétrazolium (NBT), 0,2 mM de xanthine) et 100 µl de 0,104 unités

de xanthine oxydase. Une unité de SOD a été définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de la vitesse de réduction NBT à 560 nm et à 25 °C. Chaque activité enzymatique a été évaluée sur 5 plantes par traitement (n = 5).

3.9/ Matériel fongique et tests phytopathologiques

La souche BC 1 de *Botrytis cinerea* (fournie par l'Unité de Phytopathologie, INRA Avignon) a été expérimentée au cours de cette étude. Des spores congelées ont été prélevées de manière stérile puis placées sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et incubées dans un phytotron 48 heures à 72 heures à 20°C pour favoriser le développement du champignon (Figure 13).

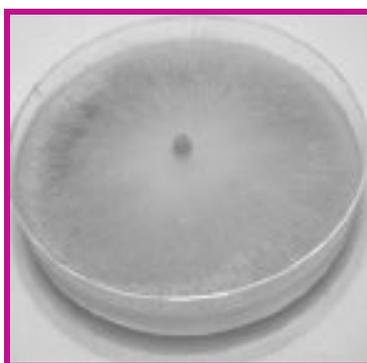


Figure 12 : Mycélium de *B. cinerea* âgé de 3 jours

Après traitements aux rayonnements UV-C, des feuilles de laitues ont été prélevées et déposées dans des boîtes de 20 cm de côté et 2 cm de hauteur contenant un papier joseph plié en 4 et 2 papiers filtres stériles imbibés de 50 ml d'eau distillée. Chaque boîte pouvant contenir 4 feuilles. Des implants mycéliens de 5 mm de diamètre sont prélevés en bordure de la souche âgée de 2 à 3 jours et déposés au centre de la feuille de tomate. Les boîtes sont ensuite placées dans un phytotron à la température de 22°C/16°C et une photopériode de 16h/8h. Des feuilles témoins, c'est à dire n'ayant subies aucun traitement ont également été inoculées par le champignon et placées dans le phytotron.

Des photos des boîtes contenant les feuilles inoculées sont prises après 3 jours afin de pouvoir évaluer une potentielle résistance de tomate face à *Botrytis*

cinerea (Figure 13). La résistance est estimée par des mesures de la surface des lésions grâce à un logiciel d'image 'image j' qui permet de mesurer en pixel la taille d'un objet puis les données ont été traitées sur Excel afin de les convertir en cm².



Figure 13 : Feuilles de tomate 3 jours après inoculation

3.10/ Observations microscopiques

Des fragments de feuille d'environ 1 cm² ont été prélevés à l'aide d'une lame de rasoir sur les feuilles traitées ou non aux UV-C après 24h d'inoculation par *B. cinerea*. Afin de maintenir les échantillons dans un état cellulaire aussi proche que possible de leur état naturel, les fragments ont été immédiatement fixés dans un mélange de paraformaldéhyde (4%), glutaraldéhyde (1%) et de caféine (1%) supplémenté avec une goutte de tween 80 pendant 24 heures. Durant la fixation, le vide a été réalisé plusieurs fois afin de faciliter la pénétration du fixateur dans les tissus. Les échantillons ont ensuite été rincés abondamment à l'eau distillée, puis déshydratés progressivement par des bains successifs d'éthanol (25, 50, 70, 85, 95 et 100%, voir tableau 3).

Puis les fragments de feuilles ont été imprégnés dans un mélange (1:1) d'éthanol absolu et de résine de synthèse (kit Technovit 7100, Kulzer) pendant une nuit puis dans de la résine pure pendant 24 heures. Ils sont ensuite inclus dans la même résine à laquelle est ajouté un durcisseur qui induit sa

polymérisation à température ambiante. Après polymérisation, les blocs ont été coupés à l'aide d'un microtome à rétraction automatique (Jung-Kulzer Supercut 2065 de Leica). Ces coupes de 3 µm d'épaisseurs ont été réalisées de manière sériée. Les rubans de résine contenant les sections des échantillons sont ensuite déposés délicatement sur une bassine remplie d'eau distillée afin de les déplier. Les sections sont collectées sur des lames porte-objets puis séchées sur une plaque chauffante avant de subir pour certaines une double coloration réactif de Schiff/Naphtol Blue Black. La double coloration a l'avantage de colorer les produits polysaccharidiques en rose et les protéines en bleu. Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle dans de l'Acrytol avant d'être observées à l'aide d'un microscope photonique (Leica DM 2000) équipé d'une caméra numérique (DFX 100).

3.11/ Analyses statistiques

Les moyennes sont effectuées à partir de 5 à 15 valeurs selon les manipulations. L'effet des différents traitements a été mis en évidence au moyen du test ANOVA de Duncan avec un seuil de signification $\alpha = 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel XLSTAT sur Microsoft Excel en comparant les moyennes obtenues entre les plantes traitées et les plantes témoins. Les niveaux de significativités sont représentés par des lettres qui mettent en valeur les différences significatives entre les plantes traitées et les plantes témoins. Les expériences ont été réalisées deux fois à des périodes différentes.

4/ Résultats

4.1/ Tests phytopathologiques

Les feuilles de tomate traitées aux UV-C ont été inoculées deux jours après la fin des traitements puis la surface nécrotique a été mesurée trois jours après l'inoculation. Les mesures représentées dans la figure 14, montrent une diminution significative ($Pr < 0.0001$) de la sensibilité des plantes de tomates traitées avec les doses 0.85 kJ/m² et 1.74 kJ/m² appliquées une fois. Cependant, cette diminution semble plus marquée pour la doses 0.85 kJ/m² que la dose 1.74 kJ/m².

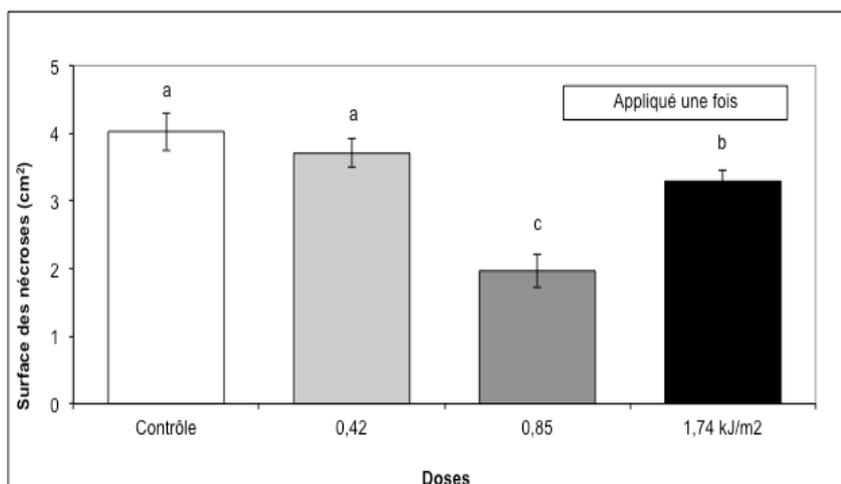


Figure 14 : Evolution de la surface nécrotique sur des feuilles de tomate exposées à différentes doses d'UV-C (0.21, 0.42, 0.85 et 1.74 kJ/m²) puis inoculées après 48h par *B. cinerea*.

4.2/ Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

L'effet des UV-C sur la peroxydation des lipides a été évalué en dosant le MDA dans les plantes traitées avec les différentes doses d'UV-C. La figure 15 montre une augmentation significative (Pr < 0.0001) de la quantité de MDA à 1,74 kJ/m² par comparaison aux plantes témoins non traitées. La quantité de MDA c'est à dire des lipides membranaires peroxydés est donc plus importante lorsque les laitues sont exposées à un rayonnement UV-C de 1,74 kJ/m².

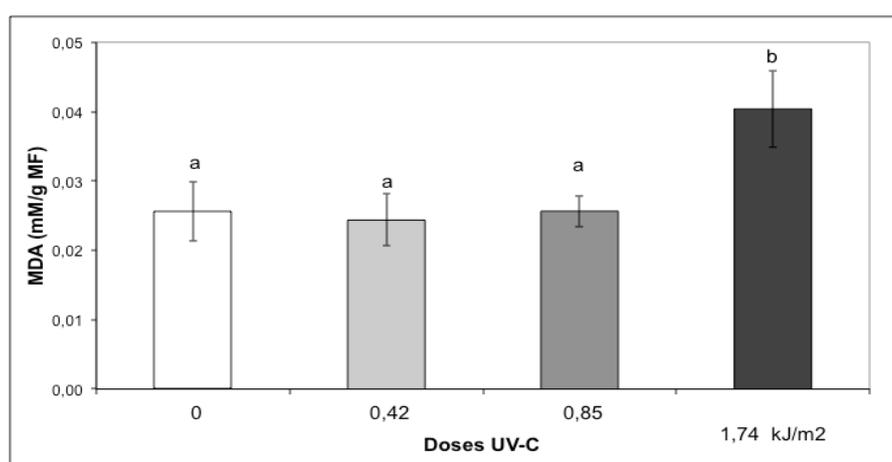


Figure 15 : Evolution de la teneur en MDA dans les feuilles de tomate exposées à différentes doses d'UV-C (témoin, 0.42, 0.85 et 1.74 kJ/m²) puis inoculées après 48h avec *B. cinerea*.

4.3/ Dosage des pigments

Les résultats montrent une augmentation de la teneur en chl_a, chl_b et en caroténoïdes lorsque les plantes ont été traitées avec les doses les plus élevée, 0,85 kJ/m² et 1,74 kJ/m² par comparaison aux plantes témoins non traitées (Figure 16).

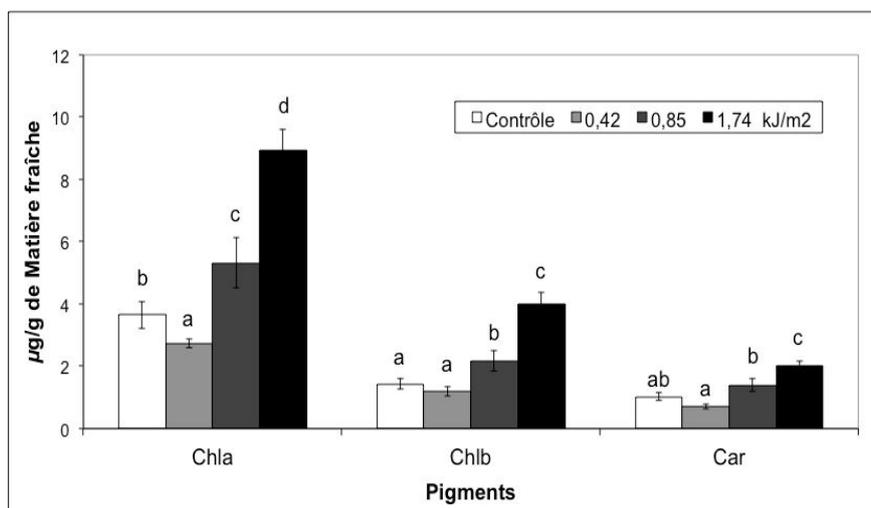


Figure 16. Evolution de la teneur des pigments dans les feuilles de tomate exposées à différentes doses d'UV-C (0, 0.42, 0.85 et 1.74 kJ/m²) puis inoculées après 48h par *B. cinerea*.

4.4/ Etude cytologique

L'étude histologique confirme les résultats obtenus suite aux tests pathologiques et les mesures de la nécrose. La pénétration de *B. cinerea* (Figure 17), est plus profonde dans les plantes non traitées que dans les plantes témoins. De plus, les mycéliums présents à la surface des feuilles traitées semblent moins vigoureux que ceux présents à la surface des feuilles témoins (Figure 18).

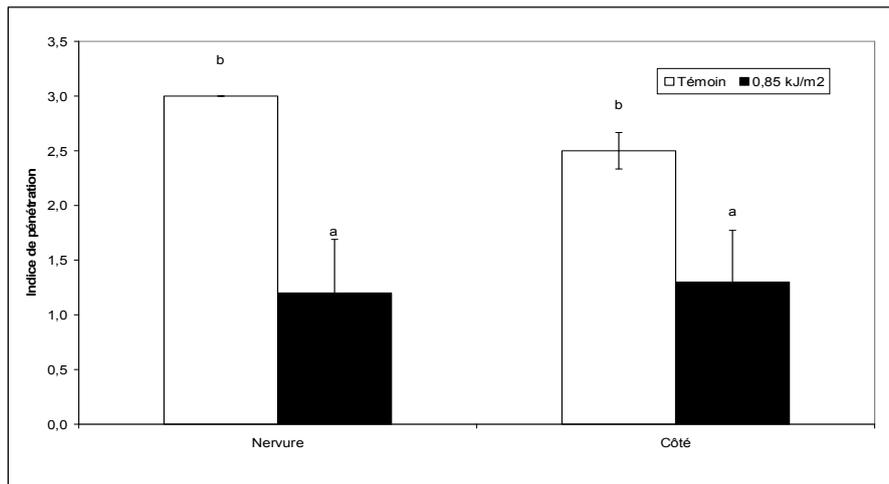


Figure 17 : Evaluation de la pénétration de *B. cinerea* dans différentes couches cellulaires de feuilles de tomate 24 h après inoculation. Les implants de mycélium ont été placés sur ou près de la nervure principale des feuilles. La pénétration a été évaluée par histologie et notée de la manière suivante : 0, absence de pathogène; 1, présence du pathogène sous la cuticule; 2, présence du pathogène sous l'épiderme; 3, présence du pathogène dans le parenchyme. Les données représentent des moyennes \pm erreurs standard ($n = 30$). Des lettres différentes indiquent des différences significatives selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

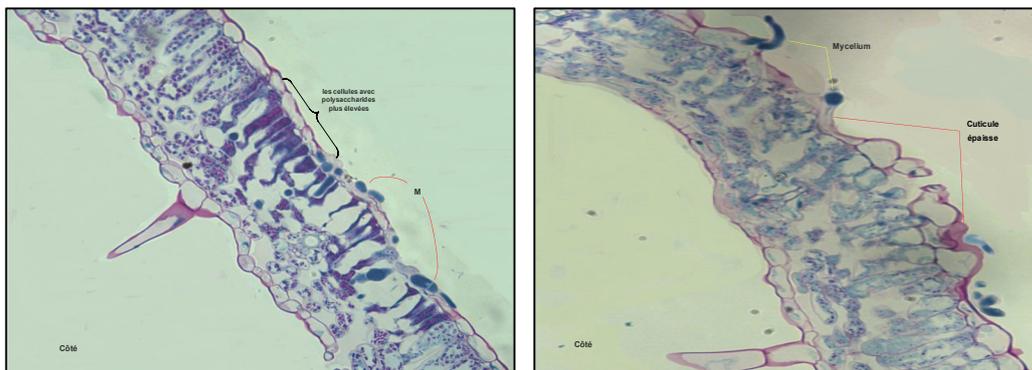


Figure 18. Observation microscopique des feuilles de tomate témoin (0 kJ/m^2) et traitée aux UV-C (0.85 kJ/m^2) 24h après inoculation avec *B. cinerea*.

4.5/ Dosage des composés phénoliques

L'effet des UV-C sur la teneur des composés phénoliques solubles et liés a été évalué chez les plantes témoin et traitées avec les différentes doses avant inoculation. La figure 19 montre une légère augmentation des composés phénoliques liés et solubles à $0,42 \text{ kJ/m}^2$ et $0,84 \text{ kJ/m}^2$ respectivement par comparaison aux plantes témoin non traitées.

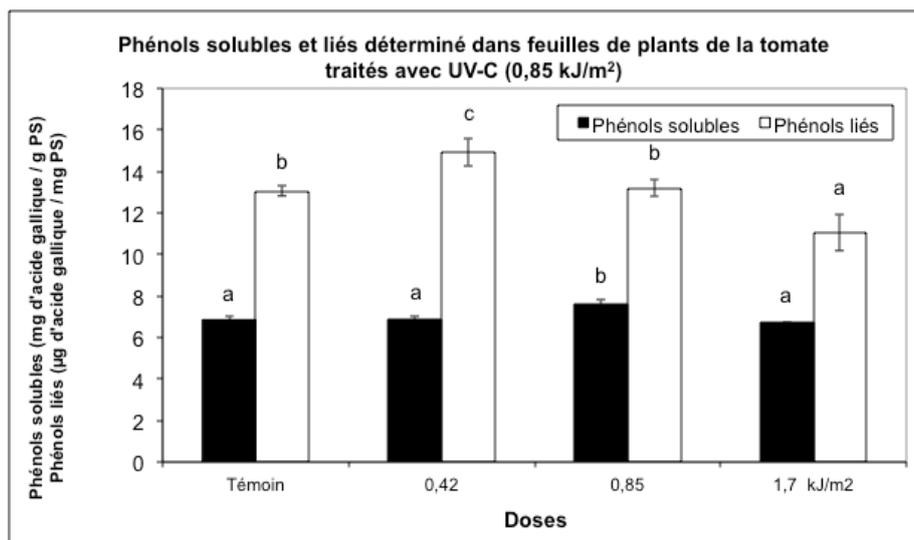


Figure 19. Effets de différentes doses d'UV-C (témoin, 0,42, 0,85 et 1,74 kJ/m²) sur la teneur des composés phénoliques solubles et liés dans les feuilles de tomate.

4.6/ Dosage de la PAL

Les plantes traitées avec la dose 0,85 kJ/m² présente une activité de la PAL plus élevée que les plantes témoins contrairement aux plantes traitées avec les doses 0,42 kJ/m² et 1,74 kJ/m² (Figure 20).

4.7/ Dosage des enzymes antioxydants

La figure 21 montre l'activité des enzymes antioxydants chez les plantes témoins et les plantes traitées aux rayonnements UV-C avant inoculation. Les résultats indique une augmentation de l'activité de la GR, CAT et APX essentiellement chez les plantes traitées avec les doses 0,85 kJ/m² et 1,74 kJ/m² par comparaison aux plantes témoins non traitées.

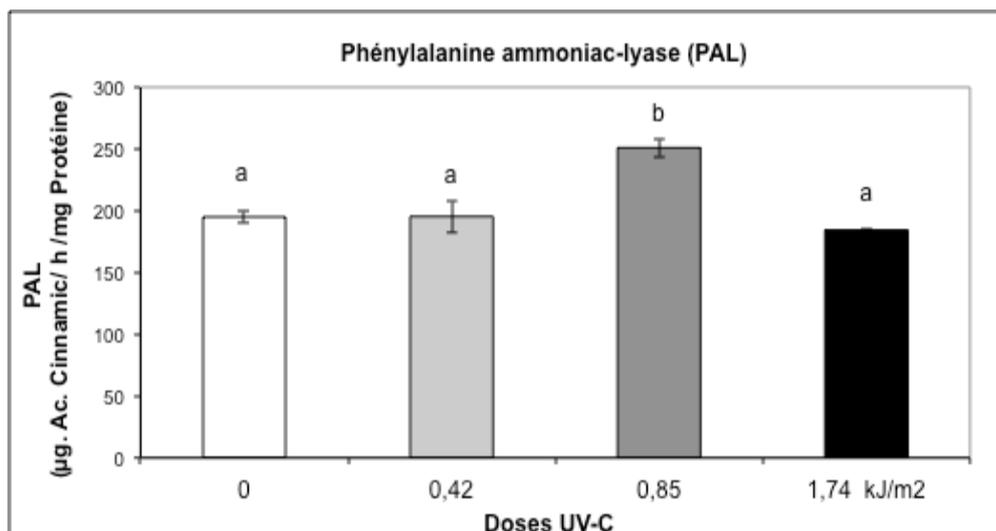


Figure 20. Effets des différentes doses d'UV-C (0, 0.42, 0.85 et 1.74 kJ/m²) sur l'activité de la PAL dans les feuilles de tomate.

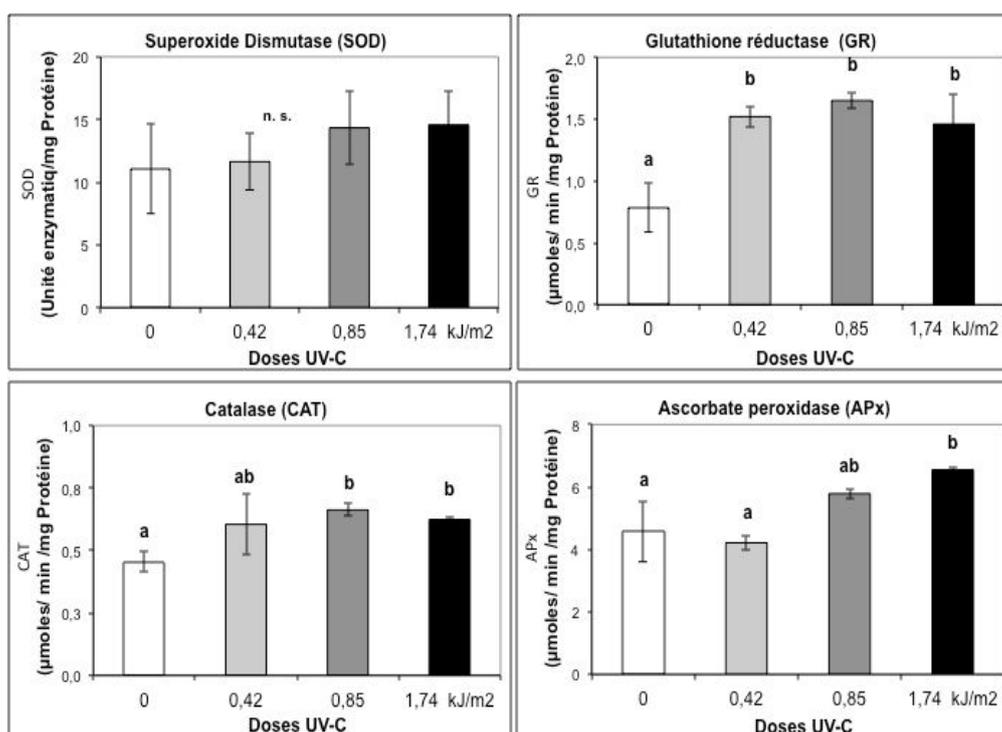


Figure 21. Effets de différentes doses d'UV-C (témoin, 0.42, 0.85 et 1.74 kJ/m²) sur l'activité de la SOD, de la GR, de la CAT et de l'APx dans les feuilles de tomate.

4.8/ Mesures de la fluorescence

Les mesures de fluorescence de la chlorophylle montrent une augmentation de Fv/Fm qui semble attribuable à une augmentation de Fo. Par

ailleurs, on note une diminution légère de Sm et de N dans les trois traitements par rapport au témoin. L'augmentation de Plabstot est substantielle pour les trois traitements, atteignant quasiment 50 % dans le traitement à 0.42 kJ/m². Cette augmentation significative de Plabstot est attribuable à l'augmentation non significative des quatre composantes de ce paramètre : Fv/Fo, RC/ABS (dans le tableau 4 on voit une diminution de ABS/RC), (1-Vj)/Vj (sauf pour le traitement à 0.42 kJ/m²) et $\delta RE_{10}/(1-\delta RE_{10})$ qui est un paramètre lié à l'efficacité du transport d'électrons jusqu'aux premiers accepteurs du photosystème I. Ce dernier paramètre est lié à REo/TRo qui augmente dans les trois traitements.

Trat	0,42	0,85	1,70
Fo	-11,07	-4,95	-2,22
Fm	-2,74	0,22	10,47
Fv	-0,60	1,56	13,74
Fv/Fm	2,22	1,25	2,98
Fv/Fo	11,76	6,43	16,85
Vk	-13,17	-3,57	13,99
Vk/Vj	-8,97	-4,61	9,63
1-Vj/Vj	10,03	0,88	-5,32
Sm	-5,07	-10,58	2,48
N	-13,79	-15,61	10,28
ABS/RC	-10,62	-5,69	5,52
Dio/RC	-18,35	-10,24	-6,22
TRo/RC	-8,62	-4,51	8,57
ETo/RC	-4,91	-5,28	4,15
REo/RC	0,53	-0,53	14,51
ETo/TRo	4,09	-0,26	-3,36
REo/TRo	10,54	5,75	7,08
ETo/ABS	6,41	1,05	-0,42
REo/ETo	6,03	5,39	10,27
REo/ABS	12,83	6,59	10,37
Dio/ABS	-8,61	-4,84	-11,53
PIabs	37,86	16,88	9,27
PItotal	49,42	25,82	29,33
Mo	-13,16	-3,56	13,98

Échelle de couleurs

-20 -10 0 30 60

Tableau 4 : Différences relatives (par rapport au témoin) des paramètres de fluorescence de la chlorophylle a, mesurée sur des plants de tomate traités avec trois doses d'UV-C (1.18, 2.35, et 4.70 kJ/m²). Les pourcentages ont été établis sur une échelle de couleurs (vert au rouge pour haute et basse). Les différences sont significatives pour les chiffres en italiques, soulignés (Tukey ou Kruskal-Wallis).

5/ Discussion

L'immunité innée des plantes vis-à-vis de microorganismes pathogènes est activée en réponse à la reconnaissance de molécules pathogènes extracellulaires ou intracellulaires par des récepteurs transmembranaires ou des protéines de résistance, respectivement. Les voies de signalisation de défense partagent des composants avec ceux impliqués dans les réponses des plantes aux stress abiotiques (théorie du cross-talk). Nous avons démontré dans le chapitre 2 que les plantes de laitue traitées aux rayonnements UV-C réagissent par une diminution de leur sensibilité à *B. cinerea*. Cependant, la réponse des plantes soumises à des rayonnements UV dépend de la durée, de la dose et de la longueur d'onde du traitement (Pontin *et al.* 2010, Darras *et al.* ; 2015, Vasquez *et al.* 2017). Les rayonnements UV-C sont capables de fournir de grandes quantités d'énergie en très peu de temps et stimuler les défenses des plantes en culture mais ils peuvent aussi facilement endommager les plantes.

En se basant sur les données de la littérature et sur nos propres résultats obtenus sur la laitue, nous avons traitées des plantes de tomates avec des doses d'UV-C comprise entre 0,42 et 1,74 kJ/m². Les tests pathologiques montrent que les plantes traitées avec la dose 0,85 kJ/m² présentent des surfaces nécrotiques 52% inférieures à celles observées chez les plantes témoins. Nous avons donc confirmé les résultats obtenus chez la laitue (Vasquez *et al.* 2017) mais avec une seule application d'UV-C alors que chez les plantes de laitue quatre applications successives de dose de 0,85 kJ/m² sont nécessaires pour avoir une diminution de la sensibilité à *B. cinerea* (Vasquez *et al.* 2017). Ceci suggère donc des différences dans la réponse des plantes aux rayonnements UV-C. De plus, la diminution de la sensibilité n'est que de 19% chez les plantes de tomate traitées avec la dose d'UV-C 1,74 kJ/m² alors que chez la laitue cette dose augmente la sensibilité des plantes à *B. cinerea*. Il semblerait que au dessus de 1,74 kJ/m² les UV-C peuvent devenir délétères. A forte dose les rayonnements UV-C peuvent induire un stress photo-oxydatif et la production des espèces réactives d'oxygènes responsables de la peroxydation des lipides au niveau cellulaire (Jansen *et al.*, 1998; Tao *et al.*, 2013). Cependant, lorsque les stress sont modérés, les plantes sont capables

de maîtriser ces dégâts par la mise en place des systèmes de contrôle enzymatique et non enzymatique.

La production de métabolites secondaires via la voie de l'acide shikimique est fortement renforcée par l'irradiation UV-C (Charles *et al.*, 2008b) et principalement liée à des augmentations significatives de l'activité de la phénylalanine ammonium lyase (PAL) (El Ghaouth *et al.*, 2003; Lemoine *Et al.*, 2007; Pombo *et al.*, 2011) et / ou d'autres enzymes liées à la défense telles que la SOD, la CAT, la POD, la PPO et l'APX (Kim *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010; Rai *et al.* , 2011; Darras *et al.*, 2012a). Dans ce travail, nous avons démontré une augmentation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes comme la GR, la CAT et l'APX au moins chez les plantes traitées avec la dose de 0,85 kJ/m² et 1,74 kJ/m² d'UV-C. La CAT et APX sont des enzymes qui détoxifie H₂O₂ responsables de la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides membranaires observée dans les feuilles de tomate traitées avec la dose la plus élevée de 1,74 kJ/m², ne doit pas être vue uniquement comme un processus dangereux. Elle est peut-être à l'origine d'une signalisation.

Les produits de l'oxydation de l'acide linoléique servent de précurseurs à la synthèse de l'acide jasmonique, une hormone de la famille des oxylipines qui joue un rôle majeur dans la réponse des plantes aux pathogènes (Browse, 2009). Ceci expliquerait la diminution, même faible, de la sensibilité des plantes de tomates à *B. cinerea* après traitement à 1,74 kJ/m². Les dosages des pigments montrent clairement qu'il n'y a pas eu de dégât majeur sur la machinerie photosynthétique même avec la dose de 1,74 kJ/m². Effet surprenant, nous avons une augmentation de la teneur en Chl_a, en Chl_b et en caroténoïdes chez les plantes traitées avec 0,85 kJ/m² et 1,74 kJ/m² doses d'UV-C.

Taiz et Zeiger (1998) ont avancé l'idée que les rayonnement UV-B et UV-C stimulent la photosynthèse ce qui se traduirait par une croissance plus élevée par rapport aux plantes non traitées aux UV. Darras *et al.* (2012, 2015) ont obtenu une augmentation significative du poids frais et sec et du nombre de feuilles chez les plantes de géranium traitées aux rayonnements UV-C. Des résultats similaires ont été obtenus chez l'*Arabidopsis* et d'autres espèces (Mendez *et al.*, 1999; Mackerness, 2000; Petropoulou *et al.*, 2001; Kakani *et al.*,

2003; Hectors *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2013). L'augmentation des caroténoïdes chez les plantes traitées à forte dose d'UV-C permettrait de les protéger de l'effet néfaste de ces rayonnements.

Charles *et al.* (2008) ont montré que la production de métabolites secondaires via la voie de l'acide shikimique est fortement renforcée par les traitements aux UV-C. Nous avons démontré une augmentation des composés phénoliques solubles dans les feuilles traitées et de l'activité de la PAL avec 0,85 kJ/m² d'UV-C par comparaison aux plantes témoins. Nous avons constaté aussi l'apparition de la rutine dans les extraits des feuilles traitées aux rayonnements UV-C. Cette molécule est impliquée dans la résistance des plantes contre certaines maladies, voire contre des herbivores (Johnson 2005, Mittelstra *et al.* 2006).

Les feuilles de tomate sont caractérisées par des poils qui tapissent leur surface. Ces trichomes sont riches en métabolites secondaires et jouent un rôle primordial dans la défense contre les bioagresseurs. D'après Calo *et al.* (2006), les trichomes contiennent des composés anti-fongiques susceptibles de réduire la progression de *B. cinerea* chez *Arabidopsis thaliana*. Ils sont capables aussi de sécréter des exsudats avec une activité antifongique comme l'a été démontré chez le pathosystème *Solanum berthaultii/Phytophthora infestans* (Lai *et al.*, 2000).

Nous suggérons que, dans l'interaction tomate-Botrytis, la résistance induite est éventuellement due à la libération de métabolites secondaires à la surface de la feuille sous l'effet des rayonnements UV-C. En effet, notre étude histologique montre que les filaments mycéliens présents à la surface des feuilles traitées sont moins vigoureux que chez les plantes témoins ce qui expliquerait aussi leur faible pénétration dans le parenchyme foliaire. Dans la plupart des cas, les barrières structurales de l'épiderme servent de première ligne de défense dans le cas du pathosystème hôtes-Botrytis (Jarvis, 1980; Elad, 1997), tandis que la production de phytoalexines et les réponses médiées par l'éthylène, acide jasmonique (JA) sont successivement induites et jouent un rôle tout aussi important dans le ralentissement du développement des champignons (Jarvis, 1980; Stratmann, 2003, Windram *et al.*, 2012). L'initiation de l'infection par *B. cinerea* stimule la production de lignine et de subérine au

niveau du site d'infection pour renforcer les parois cellulaires et restreindre la colonisation de l'hôte (Darras *et al.*, 2006; Charles *et al.*, 2008). L'augmentation de l'activité de certaines enzymes (Darras *et al.*, 2012a; Williamson *et al.*, 2013) et la production de composés antifongiques tels que les phytoalexines (Charles *et al.*, 2008a, Windram *et al.*, 2012) peuvent aussi avoir une incidence létale sur les hypes de *B. cinerea*.

Chapitre IV

Combinaison de rayonnements UV-C
avec un agent biologique dans le but
d'amplifier la stimulation des
défenses de plantes vis a vis de
Botrytis cinerea.

1/Résumé

Pour obtenir une efficacité maximale de protection des végétaux et dans le cas d'une gestion intégrée des maladies parasitaires, l'utilisation du traitement UV-C combiné avec un agent de bio-contrôle est envisagé. Les rayonnements UV-C stimulent les défenses des plantes et *B. subtilis* agit directement sur les bioagresseurs. Par leur mode d'action différent, ces deux méthodes de lutte semblent compatibles pour réduire davantage le développement de *B. cinerea* sur la laitue et la tomate. Cependant, nos résultats montrent que le traitement combiné UV-C/*B. subtilis* n'a pas permis d'avoir un effet synergique ou même additif par rapport à un traitement simple UV-C ou simple *B. subtilis*.

2/ Introduction

Le mot bio-contrôle (biocontrol) est l'abrégié du terme anglo-américain « biological control » utilisé dans différents domaines de la biologie, comme l'entomologie et la phytopathologie. Le bio-contrôle peut être défini comme l'ensemble des méthodes de protection des cultures s'appuyant sur des mécanismes naturels de régulation des bio-agresseurs. Le bio-contrôle fait partie des techniques de lutte intégrée. Selon l'Association Française des Fabricant de Produits de Bio-contrôle (IBMA), les produits de bio-contrôle se répartissent en cinq familles : macro-organismes, micro-organismes, médiateurs chimiques et attractifs/répulsifs naturels, substances naturelles et tous les produits nouveaux et toutes les technologies nouvelles à faible risque.

Les microorganismes (virus, bactéries, protozoaires, levures, oomycètes ou champignons supérieurs) sont des éléments majeurs de la régulation naturelle des populations de nuisibles. Contre les maladies des plantes, leurs mécanismes d'action relèvent soit d'interactions directes entre agents protecteurs et pathogènes (parasitisme, antibiose, compétition), soit d'interactions indirectes où entrent en jeu les réactions de défense de la plante (Elad, 1996; Reglinski *et al.*, 2005; Alabouvette *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Benhamou and Rey 2012; Latorre *et al.*, 2016). La protection biologique contre *B. cinerea* à l'aide de microorganismes a été intensivement étudiée au cours des dernières décennies (Droby *et al.*, 2009; Elmer and Reglinski, 2006; Janisiewicz, 1998; Mari *et al.*, 2003; Paulitz and Belanger, 2001; Van Lenteren, 2000). *B. cinerea* est très sensible à l'absence de nutriments: il a, par exemple, besoin de nutriments d'origine extérieure pour assurer la germination de ses spores (Elad, 1996). Certains microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) peuvent ainsi inhiber la germination des conidies de cet agent pathogène *via* la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro- éléments présents dans le milieu (Blakeman and Fokkema, 1982; Elad and Stewart, 2004; Filonow, 1998).

Bacillus subtilis est une bactérie non pathogène qui vit dans le sol, souvent en association avec les racines de plantes supérieures. Les cellules *B. subtilis*

sont capables de former des spores dormantes résistant aux conditions extrêmes et peuvent donc être facilement formulées et stockées (Piggot et Hilbert, 2004). *B. subtilis* produit également une variété de composés biologiquement actifs avec un large éventail d'activités vers des phytopathogènes et qui sont capables d'induire une résistance systémique de l'hôte (Bais *et al.*, 2004; Stein, 2005; Butcher *et al.*, 2007; Nagorska *et al.*, 2007; Ongena *et al.*, 2007; Ongena et Jacques, 2008, Arkhipova *et al.*, 2005; Vasileios 2008; Barrière 2015). Ces microorganismes produisent aussi des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible.

Des substances responsables de l'antibiose ont pu être caractérisées chez différentes souches de *Bacillus subtilis*, les gènes impliqués dans la production de certaines de ces substances ont été identifiés (Duffy *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2002). Il a été également montré que diverses souches de *B. subtilis* étaient capables de former des structures multicellulaires ou des biofilms protecteurs contre des bioagresseurs (Branda *et al.*, 2001, Hamon et Lazazzera, 2001, Bais *et al.*, 2004). En raison de son efficacité, *B. subtilis* est de plus en plus utilisé en tant qu'agent de contrôle biologique contre de nombreuses maladies fongiques. En effet, il a été rapporté que certaines souches de *B. subtilis* peuvent effectivement supprimer la maladie de la moisissure grise *B. cinerea* dans les cultures de laitue et tomate en serre et sur le terrain au cours de la culture de la plante (Bordiec 2010; Ajouz 2009).

Cependant, le contrôle biologique avec les microorganismes présente une variabilité d'efficacité inhérente notamment aux différents modes d'action des plantes hôtes et des organismes impliqués. De plus, les effets des facteurs abiotiques externes dans les conditions de terrain représentent une autre source importante de variabilité dans l'efficacité. Par conséquent, le contrôle biologique de la maladie sur le terrain, sur la base d'un seul mode d'action, peut entraîner une efficacité modérée et très variable et être peu intéressant d'un point de vue commercial. La combinaison de différents modes d'action est largement considérée comme une stratégie pour surmonter la variabilité dans le contrôle biologique des agents pathogènes, y compris *B. cinerea* (Elmer et Reglinski, 2006; Romanazzi *et al.*, 2016). Des méthodes de stimulation des défenses des plantes combinées à un agent de bio-contrôle antagoniste comme

B. subtilis peuvent contribuer à la réduction, voire la suppression de la croissance des agents pathogènes (Teixidó et al., 2001).

Pour une efficacité maximale de protection des végétaux et dans la cas d'une gestion intégrée des maladies post-récoltes, l'utilisation du traitement UV-C combiné avec l'agent de bio-contrôle *Cryptococcus laurentii* a été évaluée pour son efficacité à mieux contrôler les maladies post-récolte des fruits de tomate, notamment *B. cinerea* et *alternaria alternata*. La combinaison des rayonnements UV-C et de *C. laurentii* a fourni un niveau supérieur de contrôle des maladies sur les fruits par rapport à l'un ou l'autre des traitements. Des résultats similaires ont été aussi obtenus par Huang et al. (2015) en utilisant des rayonnements UV-C combinés à *Pichia cecembensis* contre le *Fusarium oxysporum* et *alternaria alternata* du melon.

Dans le cas de lutte contre les bioagresseurs des plantes en croissance, il est aussi indispensable de combiner plusieurs méthodes de lutte dans un programme de lutte intégrée. Les rayonnements UV-C stimulent les défenses des plantes et *B. subtilis* agit directement sur les bioagresseurs. Par leur mode d'action différent, ces deux méthodes de lutte semblent compatibles et peuvent donc être combinées pour réduire davantage le développement de *B. cinerea* sur la laitue et la tomate.

Le but de ce travail est donc d'évaluer l'efficacité d'un traitement combiné de rayonnements UV-C à dose hormique et de l'agent de lutte biologique *B. subtilis* sur des plantes de laitue ou de tomate contre *B. cinerea* par comparaison à chaque traitement séparé (UV-C ou bio-contrôle).

3/ Matériels et méthodes

3.1/ Matériel végétal

Des plantes de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) et de laitue (*Lactuca sativa*) ont été utilisées pour cette expérience. Le semis et la plantation des laitues et des tomates ont été réalisés dans les mêmes conditions de culture décrites dans les chapitres II et III.

3.2/ Traitements aux rayonnements UV-C

Le dispositif utilisé lors des traitements est le même que celui utilisé pour les traitements des plantes de tomate dans le chapitre III.

Les plantes de laitue ont été traitées avec 4 doses d'UV-C à 0,85 kJ/m² (voir chapitre II) et les plantes de tomates ont été traitées avec une dose d'UV-C à 0,85 kJ/m² (voir chapitre III).

La lumière blanche semble avoir un effet réparateur des effets des UV-C en activant des photolyases (Mercier *et al.*, 2001). Pour éviter cette interaction, les plantes sont mises à l'obscurité pendant 8 h après chaque traitement UV-C.

3.3/ Traitement de bio-contrôle

Le produit commercial Serenade Max est composé de *Bacillus subtilis* QST 713, une bactérie d'origine naturelle qui a été isolée pour la première fois en 1995 à partir d'un sol californien. Cette bactérie et les composés qu'elle produit naturellement présentent un large spectre d'activité sur des maladies fongiques et bactériennes. L'utilisation du produit biologique Serenade (souche QST 713 de *Bacillus subtilis*) contre les attaques de *B. cinerea* sur vigne est recommandée en pulvérisation sur l'ensemble du feuillage (voir ACTA, 2008 et <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>). Une solution de $4,1 \times 10^{10}$ CFU/ml a été préparée dans l'eau puis vaporisée sur l'ensemble des feuilles de tomate et de laitue 48 h après les traitements UV-C.

3.4/ Matériel fongique et tests phytopathologiques

Les souche SAS404 et BC21 de *Botrytis cinerea* ont été expérimentées au cours de cette étude. Un fragment de mycélium a été prélevé de manière stérile à l'aide d'un scalpel, placé sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et incubé dans un phytotron pendant 48 heures à 20°C pour favoriser le développement du champignon.

48 heures après exposition partielle aux UV-C, les feuilles de tous les traitements et des témoins ont été prélevées et déposées dans des boîtes (de 20 cm de côté et 2 cm de hauteur) contenant deux papiers filtres stériles

imbibés de 50 ml d'eau distillée. Des implants mycéliens de 5 mm de diamètre ont été prélevés en bordure de la souche SAS404 et BC21 âgée de 2 jours et déposés au centre des feuilles de laitue et de tomate respectivement. Les boîtes ont été ensuite placées dans un phytotron à une température de 22°C/16°C et une photopériode de 16h/8h. Des feuilles témoins, c'est-à-dire n'ayant subi aucun traitement ont également été inoculées par le champignon et placées dans le phytotron.

Des photos des boîtes contenant les feuilles ont été prises 3 jours après l'inoculation afin de pouvoir évaluer la résistance des tomates à *B. cinerea* à partir des surfaces de lésion. La résistance à *B. cinerea* a été estimée à travers des mesures des surfaces de lésions réalisées grâce à un logiciel d'image (J).

3.5/ Analyses statistiques

Les moyennes ont été effectuées à partir de 15 valeurs. L'effet des différents traitements a été mis en évidence au moyen du test de Ducun avec un seuil de signification $\alpha = 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel XLSTAT sur Microsoft Excel en comparant les moyennes obtenues avec les plantes traitées et celles correspondant aux plantes témoins. Les différences significatives à date égale sont représentées par des lettres différentes.

4/ Résultats:

Après 6 jours d'inoculation, les résultats montrent une diminution de la sensibilité des plantes de laitue de 21,51%% et 44,70% après traitement aux UV-C et Sérénade respectivement. Lorsque les plantes reçoivent un traitement combiné, la diminution de la sensibilité est n'est qu'intermédiaire (35,39%).

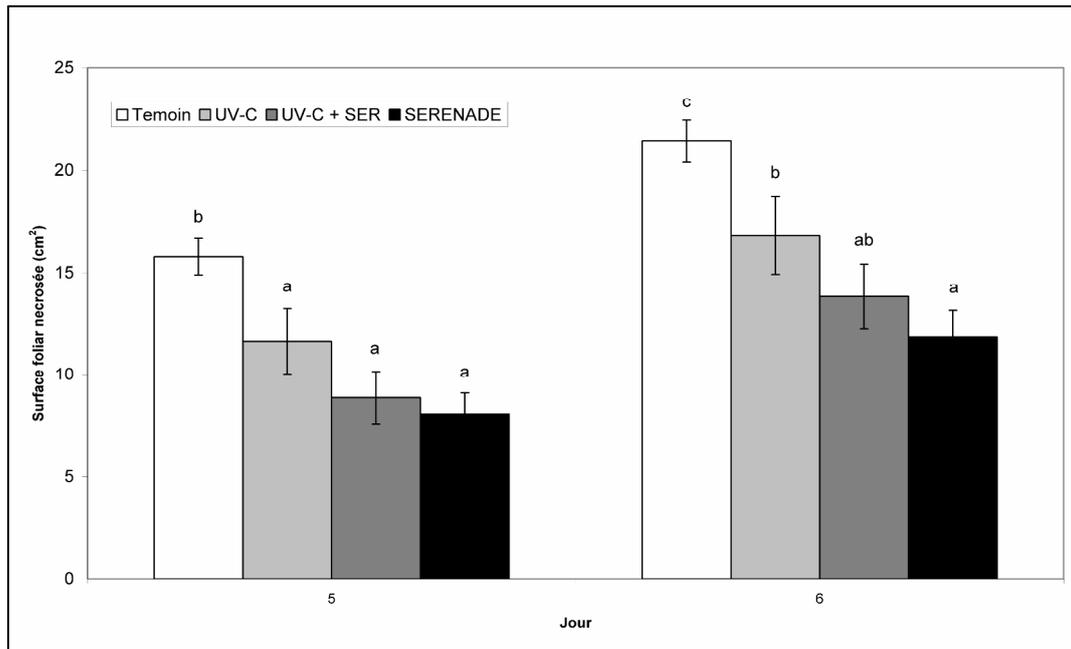


Figure 22: Evolution de la surface nécrotique sur des feuilles de plantes de laitue âgées de 5 semaines après exposition à $0,85 \text{ kJ/m}^2$ d'UV-C 4 fois (tous les deux jours) puis un traitement avec *Bacillus subtilis*. Les feuilles ont été inoculées avec *Botrytis cinerea* souche SAS405, 48h après la fin des traitements. Les données représentent les moyennes \pm les erreurs standard ($n = 25$). Différentes lettres soulignent des différences significatives selon le test Duncan ($P < 0,05$).

Chez la tomate, les différences d'évolution de la nécrose entre les plantes témoins et les plantes traitées apparaissent 4 jours après l'inoculation : une diminution de sensibilité de 17,54%, 32,86%, et 45,86% est mise en évidence chez les plantes traitées avec Sérénade, aux UV-C/Sérénade et aux UV-C respectivement.

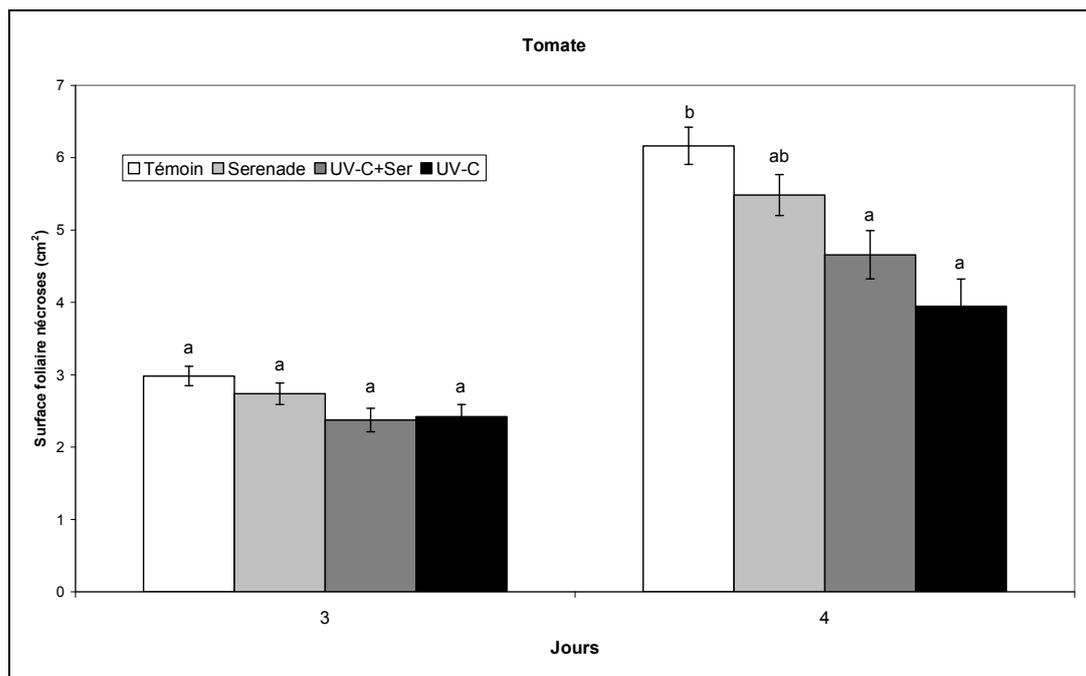


Figure 23: Evolution de la surface nécrotique sur des feuilles de plantes de tomate âgées de 5 semaines après exposition à 0,85 kJ/m² d'UV-C une fois puis un traitement avec *Bacillus subtilis*. Les feuilles ont été inoculées avec *Botrytis cinerea*, souche BC21, 48h après la fin des traitements. Les données représentent \pm les erreurs standard ($n = 25$). Différentes lettres soulignent des différences significatives selon le test Duncan ($P < 0,05$).

Aucun des paramètres de fluorescence qui sont potentiellement des indicateurs de dégâts (Fv/Fm, Fo, Sm et Vk/Vj) n'ont évolué significativement, suggérant qu'aucun des traitements n'a été à l'origine de dommages chez la tomate et chez la laitue (Figure 24), sur la machinerie photosynthétique (Ripoll et al. 2016).

L'augmentation de PI_{abs}^{tot} (PI total dans la figure 24) chez la tomate traitée aux UV-C + Sérénade et, dans une moindre mesure, chez la tomate traitée aux UV-C seuls suggère même un effet positif de ces traitements. L'image est différente pour la laitue chez laquelle on observe, au contraire, une diminution substantielle de PI_{abs}^{tot} . Chez la tomate, l'augmentation de PI_{abs}^{tot} est corrélée à une augmentation des paramètres REo/ETo, REo/ABS et REo/TRo et donc clairement attribuable à une augmentation de l'efficacité du transport d'électrons en direction des premiers accepteurs du PSI (Figure 24).

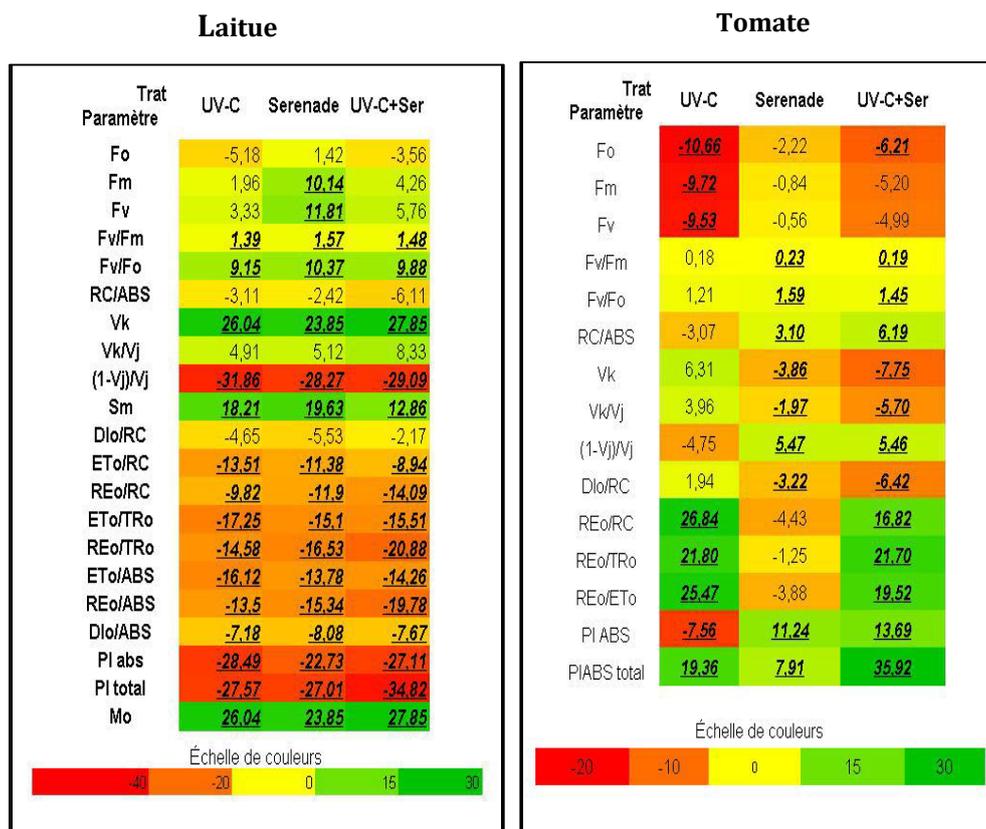


Figure 24 : Différences relatives (par rapport au témoin) des paramètres de fluorescence de la chlorophylle a, mesurée sur des plants de laitue et de tomate traités avec un dose de 0,85 kJ/m² d'UV-C (quatre fois pour la laitue et une fois pour la tomate) combiné avec *Bacillus subtilis*. Les pourcentages ont été établis sur une échelle de couleurs (vert au rouge pour haute et basse). Les différences sont significatives pour les chiffres en italiques soulignés (Tukey ou Kruskal-Wallis).

Au contraire, chez la laitue, malgré l'augmentation de RC/ABS (diminution de ABS/RC dans la figure 24), on observe une diminution de PI_{abs}^{tot} qui semble attribuable à une diminution de l'efficacité du transport d'électrons en direction des premiers accepteurs du PSI (diminution des paramètres REo/ETo, REo/ABS et REo/TRo), et cela dans les trois traitements. On observe aussi chez la laitue une augmentation du paramètre Dlo/ABS. Ce dernier correspond à la quantité d'énergie dissipée autrement que par photochimie par rapport à la quantité d'énergie absorbée (Govindjee 2011). Cette augmentation de la quantité d'énergie dissipée est logique puisqu'il y a eu une diminution de la quantité d'énergie piégée et convertie en flux d'électrons pour la photosynthèse, diminution dont la diminution du paramètre PI_{abs}^{tot} et l'augmentation du paramètre Mo (la vitesse de fermeture des centres réactionnels du PSII), entre autres, rendent compte.

5/ Discussion

Les mesures de fluorescence suggèrent qu'on ne prend *a priori* aucun risque à traiter des plants de tomate avec des UV-C à la dose de 0.85 kJ/m² ou avec Sérénade, ou avec une combinaison des deux. Chez la laitue, ces traitements, sans qu'on puisse affirmer qu'ils soient clairement délétères, entraînent la mise en œuvre de mécanismes adaptatifs typiques des réponses aux stress (Ripoll *et al.* 2016). Il serait certainement intéressant de confirmer dans des essais ultérieurs leur effet stimulant chez la tomate, et leur effet potentiellement inhibiteur chez la laitue, par des mesures de photosynthèse nette ou de rendement.

Cependant, nos résultats montrent que le traitement combiné UV-C/*B. subtilis* n'a pas permis d'avoir un effet synergique ou même additif par rapport à un traitement simple UV-C ou *B. subtilis*. Au contraire, il y a eu une réduction de l'efficacité de l'agent de lutte biologique chez les plantes exposées aux rayonnements UV-C chez la tomate et Serenade chez la laitue. La réduction de l'efficacité du micro-organisme peut indiquer une interférence potentielle entre les deux traitements. Nous avons démontré dans les chapitres 2 et 3 que le traitement des plantes de laitue ou de tomate par des rayonnements UV-C provoque une production de composés phénoliques et de MDA. La production des composés phénoliques et des ROS serait probablement responsable de la diminution de l'efficacité de *B. subtilis*. D'après Riesenman and Nicholson (2000), *B. subtilis* est très sensible à la production plus élevée de peroxyde d'hydrogène dans les plantes.

Cependant, des méthodes physiques (par exemple, traitement UV-C et eau chaude) avec un contrôle biologique à l'aide de microorganismes antagonistes, a montré un meilleur contrôle des maladies post-récolte des fruits par rapport à un traitement seul (Janisiewicz et Conway 2010). Le traitement par UV-C ou par l'eau chaude à des doses appropriées pourrait provoquer une réponse de la défense chez les fruits hôtes, contribuant à l'effet synergique avec le contrôle biologique (Zong *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2013). Les souches de *B. subtilis* produisent plusieurs lipopeptides cycliques (Falardeau *et al.*, 2013). Deux souches bactériennes (de la même espèce ou de différentes espèces) peuvent être utilisées ensemble, chacune présentant un mode

d'action différent (Magnin-Robert *et al.*, 2013). Différents modes d'action peuvent être utilisés à des moments différents, selon l'étape de développement de la maladie. Certains modes d'action spécifiques et directs peuvent être plus appropriés que d'autres à certains stades épidémiologiques clés.

Ces données et les résultats obtenus par Zhang *et al.* (2013) sur des fruits en post-récolte nous confortent dans notre idée de poursuivre ce travail. Ainsi, l'utilisation du traitement UV-C combiné avec l'agent de bio-contrôle *Cryptococcus laurentii* a été évaluée pour son efficacité à mieux contrôler les maladies post-récolte des fruits de tomate, notamment *B. cinerea* et *Alternaria alternata*. La combinaison des rayonnements UV-C et de *C. laurentii* a fourni un niveau supérieur de contrôle des maladies sur les fruits par rapport à l'un ou l'autre des traitements. Des résultats similaires ont été aussi obtenus par Huang *et al.* (2015) en utilisant des rayonnements UV-C combinés à *Pichia cecembensis* contre le *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata* du melon.

Une recherche fondamentale et appliquée est donc nécessaire pour concevoir des programmes d'application plus affinés, qui fourniront dans un proche avenir des solutions fiables pour la protection de la production végétale en agriculture conventionnelle comme en agriculture biologique. En ce qui concerne les bactéries, différents modes d'action peuvent exciter (Lahlali *et al.*, 2013). Ces différents modes d'action peuvent être utilisés à des moments différents, selon l'étape de développement de la maladie. Certains modes d'action spécifiques et directs peuvent être plus appropriés que d'autres à certains stades épidémiologiques clés. D'autre part, la combinaison des traitements aux UV-C avec des microorganismes non bactériens et/ou avec des produits naturels peut également être envisagée, soit dans des applications conjointes, soit en se concentrant sur des étapes épidémiologiques clés.

Chapitre IV

Discussion générale

Conclusion et perspectives

A/ DISCUSSION GENERALE

L'un de nos principaux défis dans la présente étude était de trouver une dose à la fois efficace pour stimuler les défenses des plantes et qu'elle soit non délétère pour ces plantes. Nous avons exploité les données de la littérature pour définir les doses que nous avons sélectionnées pour nos essais. Mercier *et al.*, (1993b; 2001) ont constaté qu'une dose aussi faible que $0,88 \text{ kJ/m}^2$ était suffisante pour induire une résistance chez la carotte et le poivron en post-récolte. Des doses de $3,7$ et $5,0 \text{ kJ/m}^2$ ont été jugées nécessaires pour induire une résistance de la tomate (Maharaj *et al.*, 1999; Charles *et al.*, 2008a) du citron (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992), respectivement, contre des bioagresseurs. Des doses comprises entre $3,6 \text{ kJ/m}^2$ et $7,5 \text{ kJ/m}^2$ ont été efficaces pour lutter contre les infections naturelles chez la pomme, la pêche, l'oignon et la patate douce (Lu *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 1990).

Nos travaux démontrent clairement que l'effet délétère ou hormique des rayonnements UV-C sur les plantes est fonction de la dose et de l'espèce végétale. Chez la laitue des doses de rayonnements UV-C de $3,40 \text{ kJ/m}^2$ et $6,80 \text{ kJ/m}^2$ induisent des dégâts importants, comme la peroxydation des lipides, le jaunissement des feuilles et la destruction des cellules épidermiques (Vasquez *et al.* 2017) alors que chez la tomate, une dose de $1,74 \text{ kJ/m}^2$ suffit pour induire une peroxydation des lipides. Il est connu que la peroxydation des lipides est fortement associée à la production des d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Dans de nombreux travaux, il a été démontré que l'exposition des plantes à des forts stress abiotiques ou biotiques augmente la production des ROS chez les plantes (Ait-Barka *et al.*, 2000; Mazid *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2007; Ballhorn *et al.*, 2009). Lorsque les ROS ne sont pas éliminés efficacement et s'accumulent, des effets cytotoxiques peuvent être observés, y compris la dégradation des membranes, des protéines, de la chlorophylle et des acides nucléiques (Scandalios, 1997; Hollósy, 2002). Dans notre travail, le niveau élevé de MDA observé dans les feuilles de laitue après traitement avec des UV-C à $3,40 \text{ kJ/m}^2$ et $6,80 \text{ kJ/m}^2$ et les feuilles de tomate après traitement avec des UV-C à $1,74 \text{ kJ/m}^2$ suggèrent, qu'à ces doses, le stress oxydatif pouvait endommager les membranes.

Nos observations sur la laitue sont cohérentes avec ce qui est connu sur l'effet potentiellement délétère des rayonnements UV-B et UV-C sur la structure des chloroplastes, des mitochondries et, d'une manière générale, sur les membranes. Les rayonnements UV-C à 3,40 kJ/m² et 6,80 kJ/m² ont induit une diminution de la teneur des pigments et ont également affecté l'appareil photosynthétique comme le montrent les valeurs basses des paramètres Fv/Fm, Fv/F0 et PI par rapport aux témoins. À partir des chloroplastes, une destruction directe a été observée sur les plastoquinones par la lumière UV-C (Bishop, 1961, Shavit et Avron, 1963). Il existe des données montrant que le spectre d'action des photosystème II (PSII) atteint un pic à 250-260 nm où absorbent les plastoquinones oxydées (Vass *et al.*, 2005), et que les plastoquinones sont détruites par la lumière UV-C (Bishop, 1961; Shavit and Avron, 1963). Dans la région à rayons courts (UV-C) de la lumière UV, il existe une étroite similitude entre le spectre d'action par l'absorbance des radicaux tyrosine oxydés et, dans une moindre mesure, par la plastoquinone oxydée. Nos observations personnelles sur l'effet de la lumière UV-C sur les paramètres dérivés de l'analyse des courbes d'induction de fluorescence, réalisées sur les feuilles de laitue sont compatibles avec l'idée d'un effet néfaste de la lumière UV-C sur les plastoquinones. Nous avons observé en effet une diminution de Sm (Govindjee, 2011), la zone normalisée de la courbe d'induction de fluorescence (données non publiées). Sm est supposé proportionnel au nombre de réduction et d'oxydation d'une molécule de Q_A jusqu'à ce que la fluorescence maximale soit atteinte, donc liée au nombre de porteurs d'électrons par chaîne de transport d'électrons de PSII et à un indicateur de la taille du pool de plastoquinone (Yordanov *et al.*, 2008).

L'effet potentiellement dommageable de la lumière UV-B et UV-C sur la structure des thylakoïdes, non seulement sur les plastoquinones, a également été évoqué dans la littérature (Bornman *et al.*, 1983). Les observations faites sur les feuilles de betterave à sucre suggèrent que la lumière UV-C peut entraîner un manque d'intégrité des thylakoïdes lorsqu'elles subissent une fusion et l'accumulation d'amidon. De même, Mantai *et al.* (1970), avaient déjà attribué l'inhibition de la photosynthèse par la lumière UV-C à une perturbation

de l'intégrité structurelle des membranes lamellaires, ce qui entraîne la perte de l'activité PSII et des réactions associées.

Il est prouvé que la lumière UV-B entrave le transport d'électrons photosynthétiques (Moon *et al.*, 2011) et peut donc endommager les protéines D1 et D2 (Jansen *et al.*, 1996). Cela n'a jamais été observé formellement avant pour la lumière UV-C, mais il est probable que cette dernière exerce un effet similaire, sans doute à des doses encore plus faibles que la lumière UV-B. Plus récemment, Wituszynska *et al.* (2015) a observé que la lumière UV-C provoque des dommages aux chloroplastes dans *Arabidopsis thaliana* et déclenche des changements morphologiques apoptotiques dans les cellules du mésophylle. Wituszynska *et al.* (2015) ont montré que la lésion simulant la maladie 1 (LSDE1) et la susceptibilité à la maladie améliorée 1 (ESD1) sont des régulateurs antagonistes de la signalisation photo-oxydante induite par UV-C et de la mort cellulaire programmée. En plus des chloroplastes, les mitochondries sont clairement des cibles potentielles pour les effets néfastes de la lumière UV-C sur les plantes supérieures. Des recherches sur la mort cellulaire programmée dans les plantes utilisant l'exposition aux UV-C comme facteur déclencheur ont montré que la lumière UV-C pourrait en effet affecter les mitochondries, entraînant une perte de potentiel transmembranaire mitochondrial, des changements dans la mobilité et la distribution et la production de ROS (Gao *et al.*, 2008).

Dans le cas de la tomate, le traitement UV-C provoque plutôt une augmentation de la teneur des pigments avec une augmentation de l'indice de performance. Ainsi, en plus de la stimulation des défenses des plantes, les rayonnements UV-C administrés à des doses non délétères peuvent stimuler aussi la croissance des plantes en agissant sur leur capacité photosynthétique. Darras *et al.* (2015) ont observé un développement plus important des plantes de géranium traitées aux rayonnements UV-C. Ces auteurs attribuent cet effet à l'augmentation de l'assimilation du CO₂, de la conductance stomatique et de la transpiration chez ces plantes par rapport aux plantes témoins.

Lorsque les plantes ont été traitées avec une dose faible de 0,85 kJ/m², les feuilles de la laitue et de la tomate ne présentaient aucun dégât visuel ni peroxydation lipidique. Dans le cas de ces deux espèces végétales cette dose

d'UV-C non délétère peut être qualifiée d'hormique car elle nous a permis de stimuler les défenses des deux espèces végétales contre *B. cinerea*. Lorsque les stress sont modérés, les plantes sont capables de maîtriser les dégâts par la mise en place des systèmes de contrôle enzymatique et non enzymatique.

La production de métabolites secondaires via la voie de l'acide shikimique est fortement renforcée par les rayonnements UV-C (Charles *et al.*, 2008b) et principalement liée à des augmentations significatives de l'activité de la phénylalanine lyase (PAL) (El Ghaouth *et al.*, 2003; Lemoine *Et al.*, 2007; Pombo *et al.*, 2011) et / ou d'autres enzymes liées à la défense telles que la SOD, la CAT, la POD, la PPO et l'APX (Kim *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2011; Darras *et al.*, 2012a). Dans notre étude, les doses hormiques d'UV-C appliquées sur les plantes de laitue et de tomate ont provoqué des augmentations significatives de l'activité de la PAL et des composés phénoliques totaux.

La production de composés phénoliques tels que la lignine et la subérine qui se déposent sur les parois cellulaires et servent de barrières renforcées contre les attaques des pathogènes. Les modifications ultra-structurales induites par les UV-C de l'épiderme de tomate provoquent la formation d'une zone de parois cellulaires empilées qui est imprégnée plus tard par la lignine et la subérine ce qui rend les parois cellulaires moins sujettes à la dégradation par des enzymes hydrolytiques sécrétées par *B. cinerea* (Charles *et al.* 2008c, 2008d). La plupart des composés mentionnés ci-dessus sont impliqués dans la défense contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea* (Jarvis, 1980). Nos résultats montrent une pénétration plus lente de *B. cinerea* dans les feuilles traitées par les UV-C par rapport aux feuilles témoins et un effet toxique sur les filaments du pathogène à la surface des feuilles dues probablement à la présence des composés phénoliques à la surface foliaire. Nous avons observé aussi une augmentation l'activité de certains enzymes antioxydants comme la GR, la CAT et l'APX chez les plantes de tomate traitées au moins avec la dose 0,85 kJ/m² d'UV-C. La CAT et l'APX sont des enzymes de détoxification contre H₂O₂ responsables de la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides membranaires observée dans les feuilles de tomate traitées avec la dose la plus élevée de 1,74 kJ/m², ne doit pas être vue uniquement comme un processus

dangereux. Elle est peut-être à l'origine d'une signalisation. Les produits de l'oxydation de l'acide linoléique servent de précurseurs à la synthèse de l'acide jasmonique, une hormone de la famille des oxylipines qui joue un rôle majeur dans la réponse des plantes aux pathogènes (Browse, 2009). Ceci expliquerait la diminution, même faible, de la sensibilité des plantes de tomates à *B. cinerea* après traitement à 1,74 kJ/m². Il semblerait que le traitement hormique d'UV-C agit à deux niveaux lors de la stimulation des défenses des plantes, une phase à un niveau local et une phase à un niveau plus systémique. Lors de la phase locale, l'augmentation de la teneur des composés phénoliques permettrait à la plante de se protéger des effets néfastes des rayonnements UV-C et de s'opposer à la pénétration du pathogène dans les feuilles par la formation d'une nécrose bloquante ou par la libération des petites molécules phénoliques toxiques. La production des ROS ou les lipides peroxydés permettraient la diffusion d'un signal à l'ensemble de la plante et la mise en place une stratégie de défense systémique. Il faut noter que lors de l'exposition des plantes aux rayonnements UV-C, seule une partie des feuilles reçoivent le traitement mais toute les feuilles acquièrent la résistance à *Botrytis*.

Nous avons démontré clairement que les rayonnements UV-C stimulent les défenses des plantes lorsqu'ils sont administrés à des doses non délétères. Cependant la dose et la fréquence peuvent être différentes selon les espèces végétales. Une seule application d'UV-C à 0,85 kJ/m² a suffit pour stimuler les défenses de la tomate et quatre applications successives de dose de 0,85 kJ/m² et 1,70 kJ/m² sont nécessaires pour obtenir une diminution de la sensibilité à *B. cinerea* (Vasquez *et al.* 2017). Ces derniers résultats sont contradictoires avec les observations de Mercier *et al.* (2001) sur les fruits de poivrons en post-récolte, où deux applications successives de dose de 0,88 kJ/m² ont été moins efficaces, ce qui suggère des différences dans la réponse aux UV-C entre les espèces et probablement les végétaux post-récolte et les végétaux en culture.

Les observations que nous avons réalisées sur la laitue et la tomate en culture sont très encourageantes, elles démontrent que les rayonnements UV-C stimulent les défenses des plantes. Les perspectives agronomiques du rayonnement UV-C sont suffisamment excitantes pour nous inciter fortement à les tester sur d'autres espèces. Dans ce cadre nous avons testé aussi l'effet de

stimulation des rayonnements UV-C sur le fraisier dont les résultats confirment ceux obtenus sur la laitue et la tomate (voir annexe, projet d'article dans le cadre de la thèse de M. Forges).

L'obtention d'une résistance totale est un objectif difficile à atteindre avec seulement les rayonnements UV-C comme méthode de stimulation des défenses. De plus, le contrôle biologique de la maladie sous serre ou en plein champs, sur la base d'un seul mode d'action, peut entraîner une efficacité modérée et très variable et être peu intéressant d'un point de vue commercial. La combinaison de différents modes d'action est largement considérée comme une stratégie pour surmonter la variabilité dans le contrôle biologique des agents pathogènes, y compris *B. cinerea* (Elmer et Reglinski, 2006; Romanazzi *et al.*, 2016).

Les méthodes de stimulation des défenses des plantes par les rayonnements UV-C combinées à un agent de bio-contrôle antagoniste comme *B. subtilis* peuvent contribuer à la réduction, voir la suppression de la croissance des agents pathogènes. Cependant, dans notre travail et malgré que les modes d'action des UV-C et *B. subtilis* semblent différentes, nos résultats montrent que le traitement combiné UV-C/*B. subtilis* n'a pas permis d'avoir un effet synergique ou même additif par rapport à un traitement simple UV-C ou *B. subtilis*. Au contraire, il y a une réduction de l'efficacité de l'agent de lutte biologique chez les plantes exposées aux rayonnements UV-C. La réduction de l'efficacité du micro-organisme peut indiquer une interférence potentielle entre les deux traitements. Nous avons démontré dans les chapitre 2 et 3 que le traitement des plantes de laitue ou de tomate par des rayonnements UV-C provoque une production de composés phénoliques et la production des composés phénoliques et des ROS serait probablement responsable de la diminution de l'efficacité de *B. subtilis*. D'après Riesenman and Nicholson (2000) *B. subtilis* est très sensible à la production plus élevée de peroxyde d'hydrogène dans les plantes.

Conclusion et perspectives

Il est évident que plus d'observations seront faites dans un proche avenir, renforçant l'idée que la lumière UV-C est un outil puissant pour stimuler les mécanismes d'adaptation des plantes aux contraintes biotiques mais aussi abiotiques. Nous prévoyons, en outre, que d'autres observations seront faites en démontrant que la lumière UV-C est dotée d'une puissante capacité à stimuler la synthèse et l'accumulation des métabolites secondaires avant et après récolte qui sont bénéfiques pour la santé humaine mais permettant aussi de prolonger la durée de conservation des produits végétaux frais. Ce qui est en jeu ici, c'est d'obtenir une adaptation des cultures à la pression croissante des bioagresseurs et l'aptitude à répondre aux attentes des consommateurs pour des produits végétaux avec moins de résidus de pesticides.

L'utilisation de la lumière UV-C pendant le cycle de développement des cultures nécessitera la recherche de doses efficaces en excluant les dommages causés aux plantes. La définition des doses les plus efficaces de lumière UV-C représente le défi majeur pour l'avenir. La réponse des plantes soumises à la lumière UV-C dépend de la fréquence, de la durée, de la dose et des longueurs d'onde des traitements UV-C. Ensuite, les effets de la lumière UV-C ne doivent pas être considérés indépendamment des effets d'autres longueurs d'ondes (UV-A, UV-B et lumière visible) qui peuvent tous interagir avec la lumière UV-C, par exemple en contribuant à une réparation par les photo-lyases d'éventuels dégâts causés par les UV-C.

En outre, conformément à ce que nous savons sur les réponses croisées entre les stress biotiques et abiotiques, les effets de la lumière UV-C devraient inclure des interactions avec d'autres facteurs environnementaux. D'autre part, combiner les traitements aux rayonnements UV-C avec des agents de bio-contrôle, soit dans des applications conjointes, soit en se concentrant sur des étapes épidémiologiques clés nécessite davantage de recherche. À court terme, la lumière UV-C sera toujours livrée à base de lampes à mercure ou de xénon, mais à long terme, la lumière UV-C sera probablement livrée par des lampes à LED utilisant des programmes d'application sophistiqués, en tenant compte des mécanismes d'action avec d'autres longueurs d'onde en agissant sur d'autres voies de perception et de signalisation.

Les perspectives agronomiques de la lumière UV-C sont suffisamment excitantes pour inciter fortement les prochaines études à s'intéresser à la compréhension des mécanismes de perception et de signalisation des rayonnements UV-C en relation avec le fonctionnement de la plante et les interactions avec d'autres facteurs environnementaux.

Annexe : Article en cours de rédaction

Impact of UV-C radiations on the sensitivity of three strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa*) against *Botrytis cinerea*

M. Forges^{ab}, H. Vàsquez^a, F. Charles^a, D. Chabane Sari^c, L. Urban^a, Y. Lizzi^a, M. Bardin^b, J. Aarrouf^a

a Unité Mixte de Recherche Qualisud, Laboratoire de Physiologie des fruits et Légumes, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 301 Rue Baruch de Spinoza, BP2139 – 84916, Avignon, France

b Pathologie Végétale, INRA, 84140 Montfavet, France

c Institut d'Electronique et des Systèmes, Université de Montpellier, 34090 - Montpellier

ABSTRACT

Some fungi are very harmful for plant crops. Among the damaging fungus, *Botrytis cinerea*, responsible for gray mold, occupies a prominent position due to its wide range of host plants and to the significant losses that it causes at crop cultivation. Nowadays, regulatory restrictions regarding fungicides require finding alternative solutions such as stimulation of plant defenses. Despite many theoretical advantages, stimulation of plant defenses using physical methods remains poorly studied compared to biological and chemical stimulation.

One of the objectives of this article is to test on strawberry plant, the hypothesis that it is possible to reduce the sensitivity of plant to the pathogen by application of non-deleterious dose of the highly energetic UV-C light (254 nm), on leaves of strawberry.

First tests were carried out on three cultivars of strawberry (Cirafine, Charlotte, Candiss) to optimize the doses of UV-C to apply on plants and to test the sensitivity of these three cultivars. After confirming that these three cultivars have different levels of susceptibility to *B. cinerea* on leaves, different treatments combining different doses of UV-C and frequency of application were applied on plants (9 modalities). These trials resulted i) in the selection of non-deleterious doses for strawberry plant by measuring plant physiological

parameters (chlorophyll fluorescence, leaf color, plant growth), and ii) in the identification of hormetic doses by testing the susceptibility of leaves to two strains of *B. cinerea* under controlled conditions. UV-C treatments applied on plants resulted in a decrease of susceptibility to *B. cinerea* on leaves of Candiss. This protection (around 25%) is significant against one strain of *B. cinerea* when UV-C is applied at 0.85 and 1.70 kJ/m², 4 times every second day (p-value = 0.05). Our observations show that exposing strawberry plants to low repeated doses of UV-C can improve their resistance against gray mold, while avoiding apparently any negative effect on plants.

Bibliographie

Aarouf, J., Garcin, A., Lizzi, Y. and El Maataoui, M. (2008). Immunolocalization and histocytopathological effects of *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* on naturally infected leaf and fruit tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Phytopathology*, 156, 338-345.

Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 922 p.

Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73-90.

Ajouz, S. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse du *PhD*, Sciences agricoles. Université d'Avignon, Avignon. Français. 213 p.

Alabouvette, C., Olivain, C. and Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European journal of plant pathology*, 114(3), 329-341.

Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanesaki, Y. and Murata, N. (2002). Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of *psbA* genes in *Synechocystis*. *Plant Physiology*, 130, 1443-1453.

Allende, A. and Artes, F. (2003). UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. *Food Research International*, 36, 739-746.

Allende, A., McEvoy, J.L., Luo, Y., Artes, F. and Wang, C.Y. (2006). Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed 'Red Oak Leaf' lettuce. *Food Microbiology*, 23(3), 241-249.

Arkipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko E.V. and Kudoyarova, G.R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, 201-209.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen species and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601-639.

Avenot, H., Sellam, A. and Michailides, T.J. (2009). Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology*, 58, 1134-1143.

Baier, M. and Dietz, K.J. (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1449-1462.

Bais, H.P., Fall, R. and Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1), 307-319.

Baka, M., Mercier, J., Corcuff, R., Castagne, F. and Arul, J. (1999). Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, 64, 1068-1072.

Ballare, C.L. (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Sciences*, 16, 249-257.

Ballhorn, D.J., Kautz, S., Heil, M. and Hegeman, A.D. (2009). Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defense in nature. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 735-745.

Bardin, M., Fargues, J. and Nicot, P.C. (2008). Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control*, 46, 476-483.

Barka E.A., Siamak, K., Makhlof, J. and Joseph, A. (2000b). Effects of UV-C irradiation on lipid peroxidation markers during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *Functional Plant Biology*, 27, 147-152.

Barka, E.A., Kalantari, S., Makhlof, J. and Arul, J. (2000a). Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48(3), 667-671.

Baros, C. (2016). Les études du CTIFL. La consommation de la tomate. Étude qualitative. CTIFL, Édition numérique, 38 p.

Barrière, V. (2015). Gestion des bio-agresseurs et réduction des pesticides en culture de laitue sous abris froids: apports croisés d'expérimentations factorielles et systémiques. Sciences Agricoles. Université d'Avignon, Français, 134 p.

Barta, C., Kaàlai, T., Hideg, K., Vass, I. and Hideg, E. (2004). Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Functional Plant Biology*, 31, 23-28.

Beckers, G.J.M. and Conrath U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 425-431.

Beliard, E. (2003). Maladies et ravageurs de la laitue et de la chicorée à salade en AB. TECHN'ITAB, maraîchage, Institut Technique de l'Agriculture Biologique (ITAB), Fédération Régionale de Défense contre les Ennemis des Cultures, 6 p.

Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7), 233-240.

Benhamou, N. (2009). La résistance chez les plantes. Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Éditions Tec & Doc - Lavoisier, Paris. 376 p.

Benhamou, N. and Bélanger, R.R. (1998). Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. *Plant Physiology*, 118(4), 1203-1212.

Benhamou, N. and Picard, K. (1999). La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80(3), 137-168.

Benhamou, N. and Rey, P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection*, 92(1), 1-23.

Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J.J. and Carmeli, S. (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1217-1221.

Bernard, J.L. and Bugaret, Y. (2002). Prophylaxis and crop protection. Indirect control methods. *Phytoma. La santé des végétaux*, 14-19.

Biffen, R.H. (1905). Mendel's Laws of Inheritance and Wheat Breeding. *The Journal of Agricultural Science*, 1(1), 4-48.

Bishop, N.I. (1961). The possible role of plastoquinone (Q-254) in the electron transport system of photosynthesis. *In: CIBA Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport*. G. E. W. Wolstenholme and C. M. O'Conner, ed. Churchill Press. 385 p.

Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1), 167-190.

Blancard, D., Lot, H. and Maisonneuve, B. (2003). Maladies des salades: Identifier, connaître et maîtriser, éditions Quae, Inra, Paris, pp 217-276.

Blanchard, A. and Limache, F. (2005). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). Ensam, Ensar & Ina P-G. 18 p.

Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 343-350.

Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Ait Barka, E., Kauffmann, S., Jeandet, P.J., Mazeyrat, G.F., Clément, C., Baillieul, F. and Dorey, S. (2010).

Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *Journal of experimental botany*, 62(2), 595-603.

Bornman, J.F., Evert, R.F. and Mierzwa, R.J. (1983). The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma*, 117, 7-16.

Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. and Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11621-11626.

Bray, E.A. (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2331-2341.

Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual review of plant biology*, 60, 183-205.

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.

Butault, J.P., Dedryver, C.A., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Meynard, J.M., Nicot, P., Pitrat, M., Reau, R., Sauphanor, B., Savini, I. and Volay, T. (2010). Écophyto R&D: Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides. Résultats de l'étude sur les itinéraires culturaux économes en pesticides, lancée par l'INRA en 2007, à la demande des ministères en charge de l'environnement et de l'agriculture. INRA. 90 p.

Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T. and Clardy, J. (2007). The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1506-1509.

Cakmak, I. and Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98, 1222-1227.

Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. (1997). The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *International Journal of Toxicology*, 16, 545-559.

Calo, L., García, I., Gotor, C. and Romero, L.C. (2006). Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1, 3-glucanase. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3911-3920.

Cantos, E., Espín, J.C. and Tomás-Barberán, F.A. (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new "functional" fruit?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 5052-5058.

Card, S.D. (2005). Biological control of *Botrytis cinerea* in lettuce and strawberry crops. Thèse de doctorat, Lincoln University, New Zealand, 199 p.

Carlen, C., Faby, R., Karjalainen, R., Pommier, J.J. and Steffek, R. (2003). Control of air borne diseases in strawberries with natural and synthetic elicitors. *Acta Horticulturae*, 649, 237-240.

Ceja, L.F., Mora, G., Téliz, D., Mora, A., Sánchez, Prometeo, Muñoz, C., Tlapal, B. and De La Torre., R. (2008). Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico. *Agrociencia*, 42, 451-461.

Cerovic, Z.G., Ounis, A., Cartelat, A., Latouche, G., Goulas, Y., Meyer, S. and Moya, I. (2002). The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell & Environment*, 25, 1663-1676.

Cervek, C. (2012). Intégrer la biodiversité dans les systèmes d'exploitation agricole: le projet IBIS. *Innovations Agronomiques*, 25, 143-154.

Cervone, F., De Lorenzo, G., Caprari, C., Clark, A.J., Desiderio, A., Devoto, A. and Toubart, P. (1993). The interaction between fungal endopolygalacturonase and plant cell wall PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). In *Mechanisms of plant defense responses*, Springer Netherlands. pp, 64-67.

Chapeland, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M. and Leroux, P. (1999). Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64(2), 85-100.

Charles, M.T., Benhamou, N. and Aral, J. (2008a). Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 27-40.

Charles, M.T., Goulet, A. and Aral, J. (2008b). Physiological basis of UV-C-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. IV. Biochemical modification of structural barriers. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 41-53.

Charles, M.T., Mercier, J., Makhlouf, J. and Arul, J. (2008c). Physiological basis of UV-C- induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. I. Role of pre- and post- challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 10-20.

Charles, M.T., Tano, K., Asselin, A. and Aral, J. (2009). Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. V. Constitutive defence enzymes and inducible pathogenesis-related proteins. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 414-424.

Charles, V., Panneton, B. and Fleurat-Lessard, F. (2000). La lutte physique en phytoprotection, éditions Quae, Canada, 347 p.

Charles, V., Phyllis, G.W., Guy, J.H. and Fleurat-Lessard, F. (2009). Chapter 24. Insect management with physical methods in pre- and post-harvest situations. *In: Integrated Pest Management*. Ed. Edward B.R., Hutchison W.D. and Cancelado, R.E. Published by Cambridge University Press. pp. 309-323.

Chaves, N. and Wang, A. (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense*, 28(2), 73-85.

Christie, J. M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M. Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., Jenkins G.I. and Getzoff, E.D. (2012). Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science*, 335(6075), 1492-1496.

Conrath, U., Beckers, G.J., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. and Pugin, A. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062-1071.

Conrath, W. (2009). Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, 5, 362-384.

Couderchet, M. (2003). Review. Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne. *Vitis*, 42(4), 165-171.

Darras, A.I., Bali, I. and Argyropoulou, E. (2015). Disease resistance and growth responses in *Pelargonium hortorum* plants to brief pulses of UV-C irradiation. *Scientia Horticulturae*, 181, 95-101.

Darras, A.I., Demopoulos, V. and Tiniakou, C. (2012a). UV-C irradiation induces defence responses and improves vase life of cut gerbera flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 64 pp. 168-174.

Darras, A.I., Joyce, D.C., Terry, L.A. and Vloutoglou, I. (2006). Postharvest infection of *Freesia hybrida* flowers by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*, 35, 55-63.

De Meyer, G. and Hofte, M. (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, 87, 588-593.

Demkura, P.V. and Ballaré, C.L. (2012). UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant*, 3, 642-652.

Demkura, P.V., Abdala, G., Baldwin, I.T. and Ballaré, C.L. (2010). Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet-B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology*, 152, 1084-1095.

D'hallewin, G., Schirra, M., Pala, M. and Ben-Yehoshua, S. (2000). Ultraviolet C Irradiation at 0.5 kJ/m² Reduces Decay without Causing Damage

or Affecting Postharvest Quality of Star Ruby Grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48(10), 4571-4575.

Dik, A.J. and Wubben, J.P. (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses, *in: Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 319-331.

Donmez, M.F., Esitken, A., Yildiz, H. and Ercisli S. (2011). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(4), 758-763.

Doré, C. and Varoquaux, F. (2006). Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées, INRA, éditions Savoir-faire, Paris. 812 p.

Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., and Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137-145.

Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 501-538.

Duhoux, É. and Nicole, M. (2004). Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes. Éditeur, Dunod-IRD, Paris, 166 p.

Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 719-732.

Elad, Y. (1997). Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72, 381-422.

Elad, Y. and Shtienberg, D. (1995). *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews*, 1, 15-29.

Elad, Y. and Stewart, A. (2007). Microbial control of *Botrytis* spp. *In Botrytis: biology, pathology and control*. Springer, Netherlands. pp. 223-241.

Elad, Y., Köhl, J. and Fokkema, N.J. (1994b). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 100, 315-336.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (2004). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, edition Springer, Kluwer academic publisher, Netherlands. 412 p.

El-Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., and Benhamou, N. (1997). Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 183-194.

El-Ghaouth, A., Wilson, C.L. and Callahan, A.M. (2003). Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology*, 93, 349-355.

Elmer, P.A.G. and Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55, 155-177.

Erkan, M., Shiow, Y., Wang B., Chien, Y. and Wang, A. (2008). Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 163-171.

Eurostat, (2015). Agriculture, forestry and fishery statistics, Statistical books, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015 edition. 206 p.

Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L. and Avis, T.J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 869-878.

Fiddaman, P.J., O'Neill, T.M. and Rossall, S. (2000). Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*). using leaf disc bioassays. *Annals of Applied Biology*, 137, 223-235.

Filonow, A.B. (1998). Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology*, 8(2), 243-256.

Finkers, R., Bai, Y.L., van den Berg, P., van Berloo, R., Meijer, F., ten Have, A., van Kan, J., Lindhout, P. and van Heusden, A.W. (2008). Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. *Euphytica*, 159, 83-92.

Foyer, C.H. and Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbate acid metabolism. *Planta*, 133, 21-25.

FranceAgriMer. (2015). Les salades d'hiver en 2014-2015, Bilans de campagne, 4 p.

FranceAgriMer. (2016a). Les filières des fruits et légumes, Fruits et légumes, Données 2014, 96 p.

Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337-359.

Friend, J. (1979). Phenolic substances and plant disease. *In* Biochemistry of plant phenolics. Springer US. pp. 557-588.

Gao, C., Zhang, L., Wen, F. and Xing, D. (2008). Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 197-198.

Gianinazzi, S., Martin, E. and Vallee, J.E. (1970). Hypersensibilité aux virus, températures et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Application de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Series D*, 270(19), 2383-2386.

Gomez, V.M., Ragaert, P., Debevere, J. and Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(9), 464-473.

González, G.A., Wang, C.Y. and Buta, G.J. (2004). UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(5), 415-422.

González, G.A., Wang, C.Y., Buta, J.G., and Krizek, D.T. (2001). Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe 'Tommy Atkins' mangoes. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(7), 767-773.

Govindjee, A. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophylla fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104, 236-257.

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

Grubben, G.J.H. and Denton, O.A. Editeurs. (2004). Ressources végétales de l'Afrique. Tropicale 2. Légumes. [traduction de: Plant Resources of Tropical Africa 2: Vegetables. 2004]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas/Blackhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas / CTA Wageningen, Pays-Bas, 737 p.

Guerrero, J.A. and Barbosa, G.V. (2004). Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light. *Food Science and Technology International*, 10(3), 137-147.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E. and Dinoor, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92, 976-985.

Gunasekera, T.S. and Paul, N.D. (2007). Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B: 320-290 nm). radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 513-519.

Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133-141.

Hamon, M.A. and Lazazzera, B.A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 42(5), 1199-1209.

Hang, N.T., Oh, S.O., Kim, G.H., Hur, J.S. and Y.J. Koh. (2005). *Bacillus subtilis* S1-0210 as a Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* in Strawberries. *Plant Pathology Journal*, 21(1), 59-63.

Hayes, R. and Edward, J. (2007). Introgression of Novel Alleles for Partial Resistance to Big Vein Disease from *Lactuca virosa* into Cultivated Lettuce. *Hortscience*, 42(1), 35-39.

Hectors, K., Prinsen, E., De Coen, W., Jansen, M.A. and Guisez, Y. (2007). Arabidopsis thaliana plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist*, 175(2), 255-270.

Hege, H. and Fluhr, D.R. (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 65-74.

Hoffland, E., van Beusichem, M.L., and Jeger, M.J. (1999). Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil*, 210(2), 263-272.

Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33, 179-197.

Huang, K., Zou, Y., Luo, J. and Liu, Y. (2015). Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental science and pollution research international*, 22(18), 14307-14313.

Huber, D.M. and Watson, R.D. (1974). Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 139-165.

Hutin, C. (2011). Le marché de la tomate: la place de la France dans le contexte international. *Infos CTIFL*, 273, 9-13.

Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Svatos, A., Baldwin, I.T. and Ballare, C.L., (2007). Solar ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger partially overlapping phenolic responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflora*. *Annals of Botany*, 99, 103-109.

Janisiewicz, W.J. (1998). Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits - challenges and opportunities. *in: Plant-microbe interactions and biological control*. G. J. Boland and L. D. Kuykendall, eds. Marcel Dekker Inc., NY, USA. pp. 171-198.

Janisiewicz, W.J. and Conway, W.S. (2010). Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. *Stewart Postharvest Review*, 6(1), 1-16.

Jansen, M.A.K., Gaba, V. and Greenberg, B.M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in plant science*, 3(4), 131-135.

Jarvis, W.R. (1980). Taxonomy. In: Coley-Smith, J.R., Verhoef, K., Jarvis, W.R. (Eds.), *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, pp. 1-18.

Jarvis, W.R. (1989). Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease*, 73 (3), 190-194.

Jeandet, P., Adrian, M., Breuil, A.C., Sbaghi, M., Debord, S., Bessis, R., Weston, L.A., and Harmon, R. (2000). Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: Application to the control of grey mould in the vineyard. *Acta Horticulturae*, 528, 591-596.

Jeandet, P., Adrian, M., Joubert, J.M., Hubert, F., and Bessis, R. (1996). Stimulating the natural defences of grape. A complement to phytosanitary control of *Botrytis*. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, 488, 21-25.

Jenkins, G.I. (2009). Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 407-431.

Jenkins, G.I. (2014). The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *The Plant Cell*, 26(1), 21-37.

Karadimos, D.A., Karaoglanidis, G.S., and Tzavella-Klonari, K. (2005). Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. *Crop Protection*. 24(1), 23-29.

Kazan, K. and Manners J.M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4087-4100.

Kessmann, H., Staub T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 439-59.

Khana, M.F.R. and Smith, L.J. (2005). Evaluating fungicides for controlling *Cercospora* leaf spot on sugar beet. *Crop Protection*, 4(1), 79-86.

Kim, H.J., Fonseca, J.M., Kubota, C., Kroggel, M. and Choi, J.H. (2008). Quality of fresh - cut tomatoes as affected by salt content in irrigation water and post - processing ultraviolet - C treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 1969-1974.

Kim, J.H. and Jander, G. (2007). *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on *Arabidopsis* induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *The Plant Journal*, 49, 1008-1019.

Klaus, B.T. (2007). Morphology and cellular organisation in *Botrytis* Interactions with plants *in: Mechanisms involved in the biological control of Botrytis cinerea* incited diseases. Elad, Y., *et al* (eds), Springer, pp 67-84

Kobayashi, I., Murdoch, L.J., Hardham, A.R. and Kunoh, H. (1995). Cell biology of early events in the plant resistance response to infection by pathogenic fungi. *Canadian journal of botany*, 73(S1), 418-425.

Kogel, K., Beckhove, U. Dreschers, J. Miinch, S. and Rommé, Y. (1994). Acquired resistance in barley. The resistance mechanism induced y 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology*, 106, 1269-1277.

Korsten, L. and De Jager, E.E. (1995). Mode of Action of *Bacillus subtilis* for Control of Avocado Postharvest Pathogens. *South African Avocado Growers Association Yearbooks*, 18,124-130.

Kuhlmann, F. and Müller, C. (2009). Development-dependent effects of UV radiation exposure on broccoli plants and interactions with herbivorous insects. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 61-68.

Kuhlmann, F. and Müller, C. (2011). Impacts of ultraviolet radiation on interactions between plants and herbivorous insects: a chemo-ecological perspective. *Progress in Botany*, 72, 305-347.

Kunz, B.A., Dando, P.K., Grice, D.M., Mohr, P.G., Schenk, P.M. and Cahill, D.M. (2008). UV Induced DNA damage promotes resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 148, 1021-1031.

La Luciole. (2015). Bulletin des pratiques bio en Rhône-Alpes. N° 7, Septembre - Octobre, 19 p.

Lague, C., Khelifi, M., Gill, J. and Lacasse, B. (1999). Pneumatic and thermal control of Colorado potato beetle. *Canadian Agricultural Engineering*, 41(1), 53-57.

Lahlali, R., Peng, G., Gossen, B.D., McGregor, L., Yu, F.Q., Hynes, R.K., Hwang, S.F., [javascript:popRefFull\('a2'\)](#) McDonald, M.R. and Boyetchko, S.M. (2013). Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*). suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. *Phytopathology*, 103(3), 245-254.

Lai A., Cianciolo, V., Chiavarini, S. and Sonnino, A. (2000). Effects of glandular trichomes on the development of *Phytophthora infestans* infection in potato (*S. tuberosum*). *Euphytica*, 114, 165-174.

Latorre, B.A., Elfar, K. and Ferrada, E.E. (2016). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42(3), 305-330.

Lecompte, F., Abro, M.A. and Nicot, P.C. (2013). Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*?. *Plant and Soil*, 369, 387-401.

Lecompte, F., Abrob, M.A. and Nicot, P.C. (2010). Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology*, 59, 891-899

Legard, D., MacKenzie, S., Mertely, J., Chandler, C. and Peres, N. (2005). Development of a reduced use fungicide program for control of *Botrytis* fruit rot on annual winter strawberry. *Plant Disease*, 89(12), 1353-1358.

Lemoine, M.L., Civello, P.M., Martínez, G.A. and Chaves, A.R. (2007). Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1132-1139.

Lepoivre, P. (2003). *Phytopathologie. Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Presses agronomiques de Gembloux. Editeur, de Boeck Supérieur 426 p.

Leroux, P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad, Y. *et al.*, Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, The Netherlands, pp. 195-222.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. and Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58(9), 876-88.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 331-382.

Liu, C., Cai, L., Han, X. and Ying, T. (2011). Temporary effect of postharvest UV-C irradiation on gene expression profile in tomato fruit. *Gene*, 486(1), 56-64.

Liu, J., Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Adeyeye, O., Kabwe, M.K., Pusey, P.L., Chalutz, E., Sultana, T. and Droby, S. (1993). The effect of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 56, 868-972.

Lizcano, M. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*). contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, Trabajo de grado. Universidad Pontificia Javeriana. Bogota, Colombia, 71 p.

Lu, J.Y., Stevens, C., Yakabu, P., Loretan, P.A. and Eakin, D. (1987). Gamma, electron beam and ultraviolet radiation on control of storage rots and quality of Walla Walla onions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12, 53-62.

Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.

Magnin, M., Trotel, P., Quantinet, D., Biagiatti, S. and Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 43-57

Magnin-Robert, M., Quantinet, D., Couderchet, M., Aziz, A. and Trotel-Aziz, P. (2013). Differential induction of grapevine resistance and defense reactions against *Botrytis cinerea* by bacterial mixtures in vineyards. *BioControl*, 58(1), 117-131.

Maharaj, R., Arul, J., Nadeau, P., 1999. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello). by delaying senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 13-23.

Mahdavian, K., Ghorbanli M, and Kalantari K.M. (2008b). Role of Salicylic Acid in Regulating Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative Stress in Pepper Leaves, published in *Fiziologiya Rastenii*. 55(4), 620-623.

Mahdavian, K., Ghorbanli M, Kalantari K.M, (2008a), The Effects of Ultraviolet Radiation on Some Antioxidant Compounds and Enzymes in *Capsicum annum*. *Turkish Journal Botany*. 32, 129-134

Mantai, K., Wong, J. and Bishop, N.I. (1970). Comparison studies of the effects of ultraviolet irradiation on photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA), 197, 257-266

Marcucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, 26, 83-99.

Mari, M., Bertolini, P. and Pratella, G.C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 761-766.

Marigo, G. (1973). Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composées phénoliques chez les végétaux. *Analysis*, 2, 10-110.

Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A.H., Soontjens, C., Van Impe, J.F., Nicolai, B.M. and Michiels, C.W. (2002). Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 27-35.

Mau, J.L., Chen, P.R. and Yang, J.H. (1998). Ultraviolet irradiation increased vitamin D2 content in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5269-5272.

Mazid, M.L., Khan, T.A. and Mohammad, F., (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2), 232-249.

Mazza, C.A., Zavala, J., Scopel, A.L. and Ballare, C.L. (1999). Perception of solar UVB radiation by phytophagous insects: behavioural responses and ecosystem implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 980-985.

Mendez, M., Jones, D. G. and Manetas, Y. (1999). Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *The New Phytologist*, 144(2), 275-282.

Mengel, K. and Kirkby, E.A. (2001). Principles of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers. 849 p.

Mercier, J., Arul, J. and Julien, C. (1993b). Effect of UV-C on phytoalexin accumulation and resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrots. *Journal of Phytopathology*, 139, 17-25.

Mercier, J., Arul, J., Ponnampalam, R. and Boulet, M. (1993a). Induction of 6-methoxymellein and resistance to storage pathogens in carrot slices by UV-C. *Journal of Phytopathology*, 137, 44-54.

Mercier, J., Baka, M., Reddy, B., Corcuff, R. and Arul, J. (2001). Short-wave ultraviolet irradiation for control of decay caused by *Botrytis cinerea* in bell pepper: induced resistance and germicidal effects. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 128-133.

Mercier, J., Ponnampalam, R., Bérard, L.S. and Arul, J. (1993c). Polyacetylene content and UV-induced 6-methoxymellein accumulation in carrot cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 313-317.

Miller, G., Suzuki, N., Rizhsky, L., Hegie, A., Koussevitzky, S. and Mittler, R. (2007). Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology*, 144, 1777-1785.

Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Acquadro, A., de Vos, R. and Beekwilder, J. (2008). Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8641-8649.

Moon, Y.R., Lee, M.H., Tovuu, A., Lee, C.H., Chung, B.Y., Park, Y.I. and Kim, J.H. (2011). Acute exposure to UV-B sensitizes cucumber, tomato, and Arabidopsis plants to photooxidative stress by inhibiting thermal energy dissipation and antioxidant defense. *Journal of radiation research*, 52(2), 238-248.

Mur, L.A.J., Naylor, G., Warner, S.A.J., Sugars, J.M., White, R.F. and Draper, J. (1996). Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal*, 9, 559-571.

Murphy, T.M. (1983). Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiologia Plantarum*, 58(3), 381-388.

Muvunyi, R. (2012). Induction de la résistance des carottes aux maladies post-récoltes par un traitement pré entreposage au moyen des rayons ultraviolets (UV-C): orientation des carottes au cours du traitement et nature de la résistance induite. Mémoire de Maître es Sciences (MSc), l'Université Laval, Québec. 86 p

Nagórska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495-508.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide as scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 2(5), 867-880.

Navarrete, M., Tchamitchian, M., Madani, C.A., Collange, B. and Taussig, C. (2010). Elaborating innovative solutions with experts using a multicriteria evaluation tool. The case of soil borne disease control in market gardening cropping systems. In ISDA 2010-Innovation and Sustainable Development in Agriculture and Food, Montpellier, France, Cirad-Inra-SupAgro. 10 p.

Nguyen, M.L. and Schwartz, S.J. (1999). Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technology*, 53, 38-45.

Nicot P.C. and Baille, A. (1996). Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes. In: Morris, C.E. Nicot, P.C. and Nguyen, The C. (eds), Aerial plant surface microbiology. Plenum Press, New-York, pp. 169-189.

Nicot, P.C., Decognet, V., Bardin, M., Romiti, C., Trottin, Y., Fournier, C. and Leyre, J.M. (2003). Potential for including *Microdochium dimerum*, a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*, into an integrated protection scheme of greenhouse tomatoes, in: Colloque international tomate sous abri, protection intégrée- agriculture, biologique. CTIFL, Avignon, France. pp. 19-23.

Nigro, F., Schena, L., Ligorio, A., Pentimone, I., Ippolito, A. and Salerno, M.G. (2006). Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 142-149.

Nogués, S., Allen, D.J., Morison, J.I.L. and Baker, N.R. (1998). Ultraviolet-B Radiation Effects on Water Relations, Leaf Development, and Photosynthesis in Droughted Pea Plants. *Plant Physiology*, 117(1), 173-181.

Oberley, L.W. and Spitz, D.R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in enzymology*, 105, 457-464.

Ongena, M. and Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. and Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084-1090.

Osorio, N.W. (2007). A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, Medellín, 60(1), 3621-3643.

Ouhibi, C., Attia, H., Nicot, P., Lecompte, F., Vidal, V., Lachaal, M.M., Urban, L. and Aarouf, J. (2015b). Effects of nitrogen supply and of UV-C irradiation on the susceptibility of *Lactuca sativa* L. to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia minor*. *Plant and Soil*, 393, 35–46.

Ouhibi, C., Attia, H., Nicot, P., Urban, L., Lachaal, M. and Aarouf, J., (2015a). Effect of UV-C radiations on the resistance against *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia minor* of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Phytopathology*, 163, 578-582.

Ouhibi, C., Attia, H., Rebah, F., Msilini, N., Chebbi, M., Aarouf, J., Urban, L. and Lachaal, M. (2014). Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds. *Plant physiology and biochemistry*, 83, 126-133.

Paulitz, T.C. and Belanger, R.R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 103-133.

Pedigo L.P. and Higley, L.G. (1992). The economic injury level concept and environmental quality: A New Perspective. *American Entomologist*, 38(1), 12-21.

Petit, J. (2013). Identification et validation fonctionnelle de gènes candidats contrôlant la composition de la cuticule chez le fruit de tomate. Thèse de doctorat présentée à l'Université de Bordeaux I, 169 p.

Piasentin, J. (2009). Stimulation des mécanismes de défense naturelle des plantes. Protection des cultures, production de composés secondaires d'intérêt. *Terres d'innovation*. 85 p.

Piggot, P.J. and Hilbert, D.W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 579-586.

Pitrat, M. and Foury, C. (2003). Histoires de légumes: des origines à l'orée du XXI^e siècle. Editions Quae. 410 p.

Poiroux-Gonord, F., Bidel, L.P.R., Fanciullino, A.L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F. and Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12065-12082.

Pombo, M.A., Hernán, G.R., Gustavo, A., Martíneza, P. and Civello, M. (2011). UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 59, 94-102.

Pontin, M.A., Piccoli, P.N., Francisco, R., Bottini, R., Martínez-Zapater, J.M. and Lijavetzky, D. (2010). Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.).

cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biology*, 10, 224-237.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M., and De Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 537-547.

Rai, A.C., Singh, M. and Shah, K. (2012). Effect of water withdrawal on ROS formation, proline accumulation and activities of SOD, CAT, APX, GR and POD enzymes in ZAT12 transformed transgenic tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 61, 108-114.

Rai, R., Meena, R.P., Smita, S.S., Shukla, A., Rai, S.K. and Pandey-Rai, S. (2011). UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. - An antimalarial plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 105(3), 216-225

Raynal, C., Julhia, L. and Nicot, P. (2014). Fertilisation et sensibilité des cultures de laitue et de tomate aux bioagresseurs. *Innovations Agronomiques*, 34, 1-17.

Reglinski, T., Elmer, P.A.G., Taylor, J.T., Parry, F.J., Marsden, R., and Wood, P.N. (2005). Suppression of Botrytis bunch rot in Chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Australasian Plant Pathology*, 34(4), 481-488.

Riesenman, P.J. and Nicholson, W.L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 620-626.

Ripoll, J., Bertin, N., Bidet, L.P.R. and Urban, L. (2016). A User's View of the Parameters Derived from the Induction Curves of Maximal Chlorophyll a Fluorescence: Perspectives for Analyzing Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1679-1685.

Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins G.I. and [http://science.sciencemag.org/content/332/6025/103/tab-pdf - aff-2](http://science.sciencemag.org/content/332/6025/103/tab-pdf-aff-2) Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science*, 332(6025), 103-106.

Robinson, L., Jeger, M.J., Xu, X.M. and Jeffries, P. (2009). Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology*, 19(10), 1051-1065.

Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Kim, J.J., Shapiro, B. and Ittah, Y. (1992). Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117, 788-792.

Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., and Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69-76.

Rousseaux, M.C., Ballare, C.L., Scopel, A.L., Searles, P.S. and Caldwell, M.M. (1998). Solar ultraviolet-B radiation affects plant–insect interactions in a natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Oecologia*, 116, 528-535.

Russell, P.E. (1995). Fungicide resistance: occurrence and management. *Journal Agricultural Science*, 124, 317-323.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D. (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 8, 1809-1819.

Scandalios, J.G., (1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 471-472.

Shama, G. and Alderson, P. (2005). UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialization. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 128-136.

Shanvit, N. and Avron, M. (1963). The effect of ultraviolet light on photophosphorylation and the Hill reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 66, 187-95.

Shimazaki, K.I., Igarashi, T. and Kondo, N. (1988). Protection by the epidermis of photosynthesis against UV–C radiation estimated by chlorophyll a fluorescence. *Physiologia Plantarum*, 74(1), 34-38.

Siriphanich, J., Kader, A.A., (1985). Effects of CO₂ on total phenolics, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase in lettuce tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110, 249-253.

Siripornvisal, S. (2010). Biocontrol Efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against Tomato Gray Mold. *KMITL Science and Technology Journal*, 10(2), 37-44

Snoeiijers, S.S., Pérez-García, A., Joosten, M.H. and De Wit, P.J. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 106(6), 493-506.

Srimai, K. and Akarapisarn, A. (2014). *Bacillus subtilis* LBF02 as Biocontrol Agent Against Leaf Spot Diseases Caused by *Cercospora lactucae-sativae* in Lettuce. *Journal of Agricultural Science*, 6(3), 151-158.

Stammler G., Brix H.D., Glattli A., Semar M. and Schoefl U. (2007). Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In: *Proceedings XVI International Plant Protection Congress*, pp 40-45.

Stapleton, A.E. (1992). Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *The Plant Cell*, 4(11), 1353-1358.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.

Stevens, C., Khan, V.A., Tang, A.Y. and Lu, J.Y. (1990). The effect of ultraviolet radiation on mold rots and nutrients of stored sweet potatoes. *Journal of Food Protection*, 53, 223-226.

Stevens, C., Liu, J., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L. and Droby, S. (1998). Application of hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of *Rhizopus* Soft Rot in tomatoes: the effect of tomatine on storage rot development. *Journal of Phytopathology*, 146, 211-221.

Stirbet, A. (2012). Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynthesis Research*, 113(1-3), 15-61.

Stratmann J. (2003). Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends in Plant Science*, 8(11), 526-533.

Sutton, J.C. and Peng, G. (1994). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*, 84, 615-621.

Taiz, L. and Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*. 2nd Edition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts, 792 p.

Tang, R.J., Liu, H., Bao, Y., Lv, Q.D., Yang, L. and Zhang, H.X. (2010). The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. *Plant Molecular Biology*, 74(4-5), 367-380.

Tao, Y., Mao, X., Hu, J., Mok, H.O.L., Wang, L., Au, D.W.T., Zhu J. and Zhang, X. (2013). Mechanisms of photosynthetic inactivation on growth suppression of *Microcystis aeruginosa* under UV-C stress. *Chemosphere*, 93(4), 637-644.

Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C. and Viñas, I. (2001). Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2). and sodium bicarbonate. *European Journal of Plant Pathology*, 107(7), 685-694.

Terry, L.A. and Joyce, D.C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32(1), 1-13.

Terry, L.A., Joyce, D.C., Adikaram, N. and Khambayd, B. (2004). Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 201-212.

Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C. and Bruni, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy research*, 10(4), 335-336.

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1151-1160.

Tripathi P. and Dubey, N.K. (2004). Exploitation of natural products as alternative strategy to control post-harvest fungal rotting of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 235-245.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S. and Aziz, A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, 64(1), 21-32.

Tsormpatsidis, E., Henbest, E., Davis, D.J., Battey, N.H., Hadley, P. and Wagstaffe, A. (2007). UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce 'Revolution' grown under polyethylene films. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 232-239.

Turelli, M., Coulomb, C., Roggero, J.P. and Coulomb, P.J. (1982). Etude de la composition lipidique de la fraction membranaire d'un champignon pathogène, le *Phytophthora capsici*, responsable du mildiou du piment (*Capsicum annum*). *Journal Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 294(3), 897-900.

Urban, L., Charles, F., de Miranda, M.R.A. and Aarouf, J. (2016). Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 1-11.

Van Kan, A.L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen, *Trends in Plant Science*, 11 (5), 247-253.

Van Lenteren, J.C. (2000). A greenhouse without pesticides: fact or fantasy?. *Crop Protection*, 19, 375-384.

Van Loon L.C. and Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85-97.

Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T.H. and Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264.

Van Wees, S.C., Van der Ent, S. and Pieterse, C.M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443-448.

Vasileios, F. (2008). Assessment of potential for biological control of *Botrytis cinerea* by an indigenous *Trichoderma harzianum* isolate with a novel detached leaf-droplet inoculation bioassay and correlated increase in phytoalexin production. *Pest Technology*, 2(2), 109-113.

Vásquez, H., Ouhibia, C., Lizzi, Y., Azzouz, N., Forges, M., Bardinc, M., Nicotc, P., Urban, L. and Aarouf, J. (2017). Pre-harvest hormetic doses of UV-C radiation can decrease susceptibility of lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) to *Botrytis cinerea* L. *Scientia Horticulturae*, 222, 32-39.

Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M. and Karaoglanidis, G.S. (2011). Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*. 95, 1302-1307.

Vicente, A.R., Pineda, C., Lemoine, L., Civello, P.M., Martinez, G.A. and Chaves, A.R. (2005). UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biology and Technology*, 35(1), 69-78.

Walker, P. and Crane, E. (1987). Constituents propolis. *Apidologie*, 18, 327-334.

Wang, Z.N., Coley-Smith, J.R. and Wareing, P.W. (1986). Dicarboximide resistance in *Botrytis cinerea* in protected lettuce. *Plant Pathology*, 35, 427-433.

Whipps J.M. and Gerlagh M. (1992). Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research*, 96, 897-907.

Wilcox, W.F. and Seem, R.C. (1994). Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. *Phytopathology*, 84, 264-270.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and van Kan J.A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-80.

Williamson, J.D., Desai, A., Krasnyanski, S.F., Ding, F., Guo, W.W., Nguyen, T.T., Olson, H.A., Dole, J.M. and Allen, G.C. (2013). Overexpression of mannitol dehydrogenase in zonal geranium confers increased resistance to the mannitol secreting fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 115(3), 367-375.

Wilson, C.L., El Ghaouth, A., Upchurch, B., Stevens, C., Khan, V., Droby, S. and Chalutz, E. (1997). Using an on-line UV-C apparatus to treat harvested fruit for controlling postharvest decay. *HortTechnology*, 7, 278-282.

Windram O., Madhou P., McHattie S., Hill C., Hickman R., Cooke E., Jenkins, D.J., Penfold, C.A., Baxter, L., Breeze, E., *et al.* (2012). Arabidopsis defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *The Plant Cell*, 24, 3530-3557.

Wituszyńska, W., Szechyńska, M., Sobczak, M., Rusaczek, A., Kozłowska, A., Witoń, D. and Karpiński, S. (2015). Lesion simulating disease 1

and enhanced disease susceptibility 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 38(2), 315-330.

Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., Zhang, J., Yang, P., Deng, H., Wang, J., Deng, X. and Deng, X.W. (2012). Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, 484(7393), 214–219.

Xu, X.M., Jeffries, P., Pautasso, M. and Jeger, M.J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101(9), 1024-1031.

Yordanov, I., Goltsev, V., Stefanov, D., Chernev, P., Zaharieva, I., Kirova, M., Gecheva, V. and Strasser, R.J. (2008). Preservation of photosynthetic electron transport from senescence-induced inactivation in primary leaves after decapitation and defoliation of bean plants. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1954-1963.

Zhang, C., Chen, K. and Wang, G. (2013). Combination of the biocontrol yeast *Cryptococcus laurentii* with UV-C treatment for control of postharvest diseases of tomato fruit. *BioControl*, 1-13.

Zimand, G., Elad, Y., Chet, I. (1996). Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*, 86, 1255-1260.

Zimmerli, L., Métraux, J.P. and Mauch, M.B. (2001). β -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 126, 517-523.

Zong, Y., Liu, J., Li, B., Qin, G. and Tian, S. (2010). Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit. *BiolControl*, 54, 316-321.