

Résistances des MONILIOSES (*M. fructicola*, *Monilia laxa*, *M. fructigena*) aux Benzimidazoles (BMC), Anilino pyrimidines (AP), Phénylpyrroles, Inhibiteurs de la Succinate Déshydrogénase (SDHI)

PLAN DE SURVEILLANCE 2010 sur arbres fruitiers à noyau

Résumé :

En 2010, le laboratoire de l'Anses-Lyon a repris les études réalisées au cours des années antérieures sur le thème des monilioses des arbres fruitiers à noyau avec, pour objectifs, de surveiller le statut de la résistance de *Monilia spp.* vis-à-vis de quatre substances actives (thiophanate méthyl, cyprodinil, fludioxonil, boscalid), autorisées dans la lutte contre ces champignons pathogènes.

Ce travail a été mené sur un total de 25 prélèvements de fruits moniliés provenant de vergers implantés dans trois régions : Languedoc-Roussillon, Provence-Alpes-Côte d'Azur et Rhône-Alpes. Les tests de résistance ont été réalisés avec une méthode biologique portant sur la germination des spores et l'élongation du tube germinatif. En parallèle, une méthode de biologie moléculaire a permis d'évaluer approximativement la fréquence des différentes espèces de *Monilia* (*Monilia fructicola*, *M. laxa*, *M. frutigena*) en présence dans chaque échantillon.

Les résultats obtenus confirment les données des années antérieures : *M. fructicola* est largement majoritaire dans l'ensemble des régions échantillonnées, ce qui explique, vis-à-vis des benzimidazoles (thiophanate méthyl), les forts pourcentages de spores résistantes observés dans les populations étudiées.

Concernant les suivis cyprodinil et fludioxonil, aucune évolution marquante n'a été mise en évidence, toutes les populations de *M. fructicola* testées ayant été classées sensibles. Cette surveillance sera néanmoins à maintenir dans les années à venir, notamment sur cyprodinil.

Pour le boscalid, utilisé dans la lutte contre les monilioses des fruits à noyau depuis 2010, l'étude réalisée cette année sur *Monilia fructicola* apporte les premières données sur la sensibilité de cette espèce avant pression de sélection. Ces résultats seront à étayer durant les prochaines années.

Mots clés : *Monilia spp.*, résistance, benzimidazoles, anilino-pyrimidines, phénylpyrroles,
Inhibiteurs de la Succinate Deshydrogenase

1 – Contexte

En 2010, le laboratoire de l'Anses-Lyon a repris (à la demande de l'expert-référent national arboriculture de la DGAI) les travaux réalisés au cours des années antérieures sur le thème des monilioses des arbres fruitiers à noyau (MICOUD et REMUSON, 1997) ; (Cf. annexe « Historique des études de résistance chez *Monilia spp* »).

Cette nouvelle étude avait différents objectifs :

- surveiller l'évolution de la résistance de *Monilia spp.* aux substances actives de la famille des benzimidazoles (BMC),
- rechercher l'apparition de résistance vis-à-vis du Switch, produit commercial associant deux substances actives : cyprodinil (famille des anilino-pyrimidines (AP)) et fludioxonil (famille des phénylpyrroles),
- rechercher la sensibilité de base vis-à-vis du boscalid (substance active de la famille des SDHI (Inhibiteurs de la Succinate Deshydrogenase)).

Ce travail sur les résistances chez *Monilia spp* a été mené par l'intermédiaire de tests biologiques. Mais, en parallèle, afin de s'assurer de la (ou les) espèce(s) présente(s) dans les parcelles concernées par les tests de résistance, une détermination a également été effectuée, par biologie moléculaire, au sein de l'unité RPP de l'Anses Lyon, pour chaque parcelle, sur un nombre déterminé de fruits.

Le plan de surveillance 2010 définissait la répartition des prélèvements comme suit :

- 17 parcelles en Languedoc-Roussillon,
- 6 parcelles en PACA,
- 6 parcelles en Rhône-Alpes.

2 - Matériel et méthode

2-1 Prélèvements

Les échantillons sont prélevés par les techniciens de terrain, dans des parcelles de fruits à noyau (essentiellement de pêcher) présentant des attaques de monilioses. Afin d'avoir un échantillon représentatif de chaque parcelle, 30 à 40 fruits sont prélevés dans chacun des vergers à analyser.

2-2 Tests de résistance

Les analyses de résistance aux fongicides sont effectuées par méthode biologique directement à partir des fructifications présentes sur les 30 fruits de chaque prélèvement. Ainsi, une suspension de spores est réalisée à partir de l'ensemble des fruits de chaque échantillon. Cette suspension (concentration moyenne d'environ 100 000 spores/mL) est ensuite étalée sur un milieu eau-agar amendé en fongicide. Pour chaque substance active testée (carbendazime, cyprodinil, fludioxonil et boscalid), une gamme de 6 doses est utilisée : 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 mg/L.

Il faut noter que la substance active appartenant à la famille des BMC actuellement autorisée sur monilioses est le thiophanate méthyl. Mais, pour étudier la résistance à cette substance active, les tests sont réalisés avec le carbendazime qui est, en fait, le produit final de la dégradation du thiophanate méthyl en milieu aqueux et, donc, le véritable principe actif du fongicide.

Les boîtes de milieu eau–agar amendées en fongicide et inoculées avec la suspension de spores sont maintenues en incubation à l'obscurité, à 20 - 22°C pendant 24 heures. Les notations réalisées sous microscope évaluent, outre le pourcentage de spores germées à chaque dose, la longueur des tubes germinatifs. Ces notations permettent de définir le profil de résistance de chacune des populations vis-à-vis de toutes les substances actives étudiées en se basant sur la CI50 (Concentration d'Inhibition de 50% de la germination ou de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin), la CI90 (Concentration d'Inhibition de 90% de la germination ou de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin) et la CMI (Concentration Minimale d'Inhibition). Pour les substances actives dont la sensibilité de base est connue, le rapport entre la CI50 évaluée et la CI50 des souches de référence sensibles donne une estimation du Facteur de Résistance (FR) de chaque population étudiée, ce FR permettant d'apprécier le niveau de résistance.

Tableau 1 : Sensibilité de base des souches de référence sensibles : *M. laxa* et *M. fructicola* (données établies antérieurement par l'unité RPP)

Méthode germination de spores	CI50 en mg/L		
	BMC ^(a)	cyprodinil ^(b)	fludioxonil ^(b)
<i>M. laxa</i>	0,054 (0,05 - 0,075) ^(c)	0,036 (0,022 - 0,065)	0,046 (0,018 - 0,065)
<i>M. fructicola</i>	Résistant à la dd = 1 mg/L *	0,063 (0,045 - 0,073)	0,048 (0,014 - 0,09)

Légende (a) critère observé : % germination
(b) critère observé : % de longueur tube germinatif
(c) : valeurs extrêmes enregistrées pour la CI50

* il n'existe pas de données de CI50 correspondant à des souches de référence sensibles de *M. fructicola* collectées sur le territoire français. En effet, après introduction de ce parasite en France, toutes les souches de cette espèce prélevées sur le territoire et analysées vis-à-vis des BMC se sont toujours révélées résistantes à cette famille de substances actives. Par contre, dans la littérature internationale, les CMI des souches sensibles *M. fructicola* sont données comme étant de l'ordre de 1 mg/L (PENROSE et KOFFMAN, 1977). Cette dose a donc été prise comme dose discriminante (dd) pour *M. fructicola* vis-à-vis de la famille des BMC.

2-3 Détermination de l'espèce

Pour chacun des prélèvements, 30 isollements (un par fruit) ont été réalisés à partir d'une seule tache pour chaque fruit (taches à partir desquelles ont été prélevées les fructifications soumises aux tests de résistance). La détermination biomoléculaire de l'espèce a été faite sur 5 à 10 cultures parmi les 30 ainsi obtenues pour chaque parcelle. L'ADN a été extrait selon une méthode classique d'extraction au chelex d'ADN de champignon. La méthode biomoléculaire utilisée permet de différencier les trois espèces *M. laxa*, *M. fructicola* et *M. fructigena*. Une région spécifique à chaque espèce, située dans les domaines ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADNr, codant pour l'ARN ribosomal, est amplifiée par PCR en utilisant les amorces publiées par IOOS et FREY, 2000). Ces régions ITS sont utilisées en taxonomie et en

phylogénie moléculaire en raison du haut degré de variabilité qui existe dans ces gènes (même entre des espèces étroitement apparentées) et de la facilité d'amplification de faibles quantités d'ADN grâce au nombre élevé de copies de gènes d'ARNr.

Pour la détermination de l'espèce de moniliose, un couple d'amorce « espèce spécifique » permet l'amplification d'une portion de l'ADNr uniquement chez l'espèce recherchée. Les produits PCR obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel amendé en BET, puis visualisés sous rayon UV. Les fragments de PCR amplifiés avec chacun des couples d'amorces « espèce spécifique » sont de 350 pb.

A noter que, pour cette étude, les cultures sélectionnées ont été analysées par PCR avec les amorces spécifiques de *M. laxa*, puis de *M. fructicola*. Pour *M. fructigena*, les PCR n'ont pas été conduites sur l'ensemble des cultures (mais seulement sur 1/3 d'entre elles) du fait d'une identification visuelle permettant, dans 2/3 des cas, de statuer sur la présence éventuelle de cette espèce dans les cultures obtenues.

3 – Résultats : suivis BMC, cyprodinil et fludioxonil

*Remarque préliminaire : seront tout d'abord présentés et discutés les résultats obtenus pour BMC, cyprodinil et fludioxonil car, pour ces substances actives, il existe des données sur la sensibilité de base (ou la dose discriminante pour les BMC) des deux espèces de Monilia principalement recherchées (*M. fructicola* et *M. laxa*).*

Les résultats concernant boscalid (substance active plus récente pour laquelle ce plan de surveillance devait permettre d'obtenir des données sur la sensibilité de base) seront présentés dans un paragraphe ultérieur.

Le plan de surveillance 2010 a été parfaitement respecté et des échantillons de fruits ont été prélevés sur le nombre de parcelles initialement prévu pour chacune des régions concernées : 17 vergers (uniquement de pêcher ou nectarine) en Languedoc-Roussillon, 6 vergers (5 de pêcher et 1 de cerisier) en PACA et 6 vergers (3 de nectarine, 2 de cerisier et 1 d'abricotier) en Rhône-Alpes. Parmi toutes ces parcelles, 4 n'ont pas pu faire l'objet d'analyses de résistance du fait de l'absence de fructifications (1 parcelle de pêcher en Languedoc-Roussillon, 1 parcelle de pêcher et 1 de cerisier en PACA ainsi que la parcelle d'abricotier de Rhône-Alpes).

3-1 Région Languedoc-Roussillon

Les échantillons ont été prélevés dans les deux départements du Gard et des Pyrénées Orientales. Les résultats des tests de résistance et des déterminations d'espèce, réalisés sur les 16 parcelles analysables, sont répertoriés dans le tableau 2.

Les analyses biomoléculaires d'identification confirment la présence majoritaire de l'espèce *M. fructicola* dans tous les vergers ciblés de cette région :

- pour le département du Gard, seul *M. fructicola* a été identifié dans toutes les cultures mycéliennes analysées,
- pour le département des Pyrénées Orientales, *M. fructicola* a été identifié comme la seule espèce présente dans deux des sept parcelles analysées. Par contre, dans les cinq autres parcelles, *M. laxa* et *M. fructicola* ont été détectés soit en mélange dans une culture mycélienne issue d'une même lésion, soit dans des cultures mycéliennes distinctes. Sur ces 5 parcelles présentant à la fois les deux espèces *M. fructicola* et *M. laxa*, la fréquence

relative des deux espèces est difficile à évaluer compte tenu du nombre non exhaustif de déterminations par rapport au nombre de fruits prélevés et testés. Néanmoins, pour chaque échantillon testé, une évaluation approximative de la présence de *M. laxa*, par rapport à celle de *M. fructicola*, peut être faite en se basant sur le nombre d'isollements dans lesquels *M. laxa* a été détecté.

Ainsi, pour les échantillons présentant à la fois les deux espèces :

- n° 235.10 sur 7 cultures : 4 *M. fructicola* ; 4 *M. laxa* (dont 1 avec *M. fructicola*)
- n° 236.10 sur 10 cultures : 10 *M. fructicola* ; 1 *M. laxa* (avec *M. fructicola*)
- n° 238.10 sur 10 cultures : 5 *M. fructicola* et 5 *M. laxa* (distinctes de *M. fructicola*)
- n° 239.10 sur 10 cultures : 5 *M. fructicola* ; 10 *M. laxa* (dont 5 avec *M. fructicola*)
- n° 240.10 sur 10 cultures : 5 *M. fructicola* ; 6 *M. laxa* (dont 1 avec *M. fructicola*)

Tableau 2 : Languedoc-Roussillon - tests résistance *Monilia spp* vis-à-vis des 3 familles (BMC, AP, phénylpyrroles) et détermination des espèces

Code Anses	Département	Espèce végétale	carbendazime % germination dd = 1 mg/L	cyprodinil		fludioxonil		<i>Monilia fructicola</i> *	<i>Monilia laxa</i> *	<i>Monilia fructigena</i> *
				CI50 (mg/L)	FR	CI50 (mg/L)	FR			
82-10	30	Pêcher	100%	< 0,05	< 0,8	0,040	0,8	9/9	0/9	/
83-10	30	"	100%	0,058	0,9	0,031	0,7	10/10	0/10	/
84-10	30	"	100%	0,14	2,2	0,024	0,5	10/10	0/10	/
85-10	30	"	100%	0,080	1,3	0,032	0,7	10/10	0/10	/
117-10	30	"	100%	0,085	1,4	0,028	0,6	10/10	0/10	/
119-10	30	"	100%	0,088	1,4	0,035	0,7	7/7	0/7	0/7
120-10	30	"	100%	0,055	0,9	0,018	0,4	8/8	0/8	0/8
153-10	30	"	Monilia sur rameaux : tests non réalisés							
154-10	30	"	100%	0,10	1,6	0,028	0,6	5/5	0/5	0/5
155-10	30	"	100%	0,052	0,8	0,023	0,5	7/7	0/7	/
235-10	66	Nectarine	57%	(0,22)		(0,044)		4/7	4/7	/
236-10	66	Pêcher	100%	(0,18)		(0,040)		10/10	1/10	/
237-10	66	"	100%	0,18	2,9	0,042	0,9	10/10	0/10	/
238-10	66	Nectarine	100%	(0,072)		(0,042)		5/10	5/10	/
239-10	66	Pêcher	13%	(0,085)		(0,038)		5/10	10/10	/
240-10	66	"	56%	(0,070)		(0,028)		5/10	6/10	/
241-10	66	"	100%	0,072	1,1	0,036	0,8	10/10	0/10	/

Légende :

- CI50 : concentration inhibitrice de 50 % de la germination des spores ou de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin
- FR : Facteur de Résistance = CI50 échantillon étudié / CI50 référence sensible
- / : espèce non recherchée par PCR
- * nombre d'isollements pour lesquels cette espèce a été détectée / nombre d'isollements soumis à détermination par PCR
- () : valeur de CI50 indicative pour une population en mélange *Monilia fructicola* et *Monilia laxa*

3-2 Région PACA

Les échantillons ont été prélevés dans deux départements (Bouches du Rhône et Vaucluse). Mais, seuls les prélèvements des Bouches du Rhône ont pu faire l'objet de tests de résistance.

Dans les Bouches du Rhône, *Monilia fructicola* a été détecté sur les 4 parcelles de pêcher de ce département, alors que la présence de *Monilia laxa* n'est décelée que sur une seule parcelle (n°118-10 : 1 culture *M. laxa*, en mélange avec *M. fructicola*, sur les 10 analysées), ce qui peut laisser supposer que *M. laxa* n'est pas l'espèce dominante dans cette parcelle.

En ce qui concerne le département du Vaucluse, sur les 2 parcelles prélevées (cerisier et pêcher) une seule a pu être analysée pour la détermination de l'espèce et elle s'avère présenter uniquement *M. fructicola*. Pour le second verger, le seul de cerisier, aucune des trois espèces de *Monilia* recherchées n'a été détectée.

Tableau 3 : PACA - tests résistance *Monilia spp* vis-à-vis des 3 familles (BMC, AP, phénylpyrroles) et détermination des espèces

Code Anses	Département	Espèce végétale	carbendazime % germination dd = 1 mg/L	cyprodinil		fludioxonil		<i>Monilia fructicola</i> *	<i>Monilia laxa</i> *	<i>Monilia fructigena</i> *
				CI50 (mg/L)	FR	CI50 (mg/L)	FR			
118-10	13	Pêcher	100%	(0,05)		(0,028)		10/10	1/10	/
121-10	13	"	100%	0,15	2,4	0,020	0,4	10/10	0/10	0/10
122-10	13	"	100%	0,17	2,7	0,033	0,7	5/5	0/5	0/5
123-10	13	"	100%	0,18	2,9	0,035	0,7	10/10	0/10	0/10
158-10	84	Cerisier	Fragments de fruits sans fructifications : tests non réalisés					0/8	0/8	0/8
159-10	84	Pêcher	Rameaux : tests non réalisés					2/2	0/2	0/2

Légende :

- CI50 : concentration inhibitrice de 50 % de la germination des spores ou de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin
- FR : Facteur de Résistance = CI50 échantillon étudié / CI50 référence sensible
- / : espèce non recherchée par PCR
- * nombre d'isolements pour lesquels cette espèce a été détectée / nombre d'isolements soumis à détermination par PCR
- () : valeur de CI50 indicative pour une population en mélange *Monilia fructicola* et *Monilia laxa*

3-3 Région Rhône-Alpes

Les échantillons ont été prélevés dans deux départements (Drôme et Rhône). Mais, seuls les prélèvements du Rhône ont pu faire l'objet de tests de résistance et de recherche d'espèces.

Sur les cinq échantillons prélevés (trois de nectavigne et deux de cerisier), trois apparaissent comme possédant les deux espèces de moniliose, avec, *a priori*, une plus forte présence de *M. fructicola* (*M. laxa* déterminé en mélange avec *M. fructicola* dans 1 culture sur 10 pour deux vergers de nectavigne et 3 cultures sur 9 pour un verger de cerisier).

Tableau 4 : Rhône-Alpes - tests résistance *Monilia spp* vis-à-vis des 3 familles (BMC, AP, phénylpyrroles) et détermination des espèces

Code Anses	Département	Espèce végétale	carbendazime % germination dd = 1 mg/L	cyprodinil		fludioxonil		<i>Monilia fructicola</i> *	<i>Monilia laxa</i> *	<i>Monilia fructigena</i> *
				CI50 (mg/L)	FR	CI50 (mg/L)	FR			
147-10	69	Nectavigne	100%	(0,10)		(0,040)		10/10	1/10	/
149-10	69	"	100%	0,16	2,5	0,035	0,7	10/10	0/10	0/10
150-10	69	Cerisier	100%	0,07	1,1	0,020	0,4	8/8	0/8	0/8
151-10	69	"	100%	(0,08)		(0,028)		9/9	3/9	0/9
152-10	69	Nectavigne	100%	(0,10)		(0,038)		10/10	1/10	0/10
193-10	26	Abricot	Rameaux et momies : tests non réalisés					/	/	/

Légende :

- CI50 : concentration inhibitrice de 50 % de la germination des spores ou de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin
- FR : Facteur de Résistance = CI50 échantillon étudié / CI50 référence sensible
- / : espèce non recherchée par PCR
- * nombre d'isollements pour lesquels cette espèce a été détectée / nombre d'isollements soumis à détermination par PCR
- () : valeur de CI50 indicative pour une population en mélange *Monilia fructicola* et *Monilia laxa*

4 – Discussion : suivis BMC, cyprodinil et fludioxonil

4-1 - Sensibilité vis-à-vis de la famille des BMC (carbendazime / thiophanate méthyl)

Les données obtenues sur l'ensemble des échantillons, quelle que soit la région de prélèvement, montrent que les échantillons sur lesquels seule l'espèce *Monilia fructicola* a été décelée germent tous à 100% à la dose discriminante de 1 mg/L de carbendazime. Ils sont donc identifiés comme résistants au carbendazime et, plus largement, à la famille des BMC.

Par contre, les échantillons présentant en mélange les deux espèces *Monilia fructicola* et *Monilia laxa* ont des taux de germination variables (de 13% à 100%) à la dose discriminante. Cette variabilité peut, probablement en grande partie, être reliée à la proportion plus ou moins importante des deux espèces dans l'échantillon. Ainsi, pour le département des Pyrénées Orientales (pour lequel le mélange des deux espèces est fréquent), l'échantillon n° 239-10 avec un pourcentage de 13% de germination à la dose discriminante semble être composé majoritairement de *Monilia laxa* (10 cultures sur 10 révèlent l'espèce *M. laxa* dont 5 en mélange avec *M. fructicola*) tandis que l'échantillon n° 236-10 avec un pourcentage de 100% de germination à 1 mg/L présente 10 cultures sur 10 avec *M. fructicola* dont 1 seule en mélange avec *M. laxa*. Les échantillons n° 235-10 et n° 240-10 ont, respectivement, des pourcentages de 57 % et 56 % de germination et, au travers des cultures déterminées, semblent présenter une proportion à peu près équivalente des deux espèces.

A contrario, l'échantillon n° 238-10 qui présente un pourcentage de 100% de germination à la dose discriminante, semble composé des deux espèces en proportions à peu près égales (5 cultures *M. laxa* et 5 cultures *M. fructicola*, sans mélange). Dans le cas de cet échantillon, le résultat des tests de sensibilité s'explique donc moins bien. Deux hypothèses peuvent être avancées :

- soit le prélèvement de spores sur les fruits pour les tests de résistance n'a pas été réalisé de façon suffisamment aléatoire et a favorisé la présence de *M. fructicola*,
- soit les spores de *M. laxa* présentes dans cet échantillon appartenaient à une (ou des) souche(s) moins sensible(s) aux BMC.

Le fait que ce constat soit exceptionnel parmi tous les autres résultats obtenus semble être plutôt favorable à la première hypothèse, mais la seconde supposition ne doit pas être totalement écartée car la présence de *M. fructicola* résistant aux BMC ne doit pas faire oublier la possibilité d'une émergence de souches de l'espèce *M. laxa* également résistantes à cette famille de substances actives.

4-2 Sensibilité vis-à-vis de la famille des anilino pyrimidines (cyprodinil)

Dans le cas de cette substance active, l'objectif de l'étude était essentiellement la recherche de souches résistantes en cours d'émergence. De ce fait, étant donné la variabilité de comportement qui existe entre les différentes espèces de moniliose (Cf valeurs de sensibilité de base, tableau 1), n'ont été pris en compte, pour l'interprétation des données, que les échantillons constitués *a priori* d'une seule et même espèce, en l'occurrence (compte tenu des résultats des différentes déterminations) uniquement de l'espèce *M. fructicola*.

Les données obtenues pour cette substance active ne sont donc analysées qu'au travers des 16 parcelles pour lesquelles seule l'espèce *M. fructicola* a été mise en évidence sur l'ensemble des cultures soumises à détermination (tableau 5).

Tableau 5 : Parcelles retenues pour l'interprétation des données obtenues sur **cyprodinil**

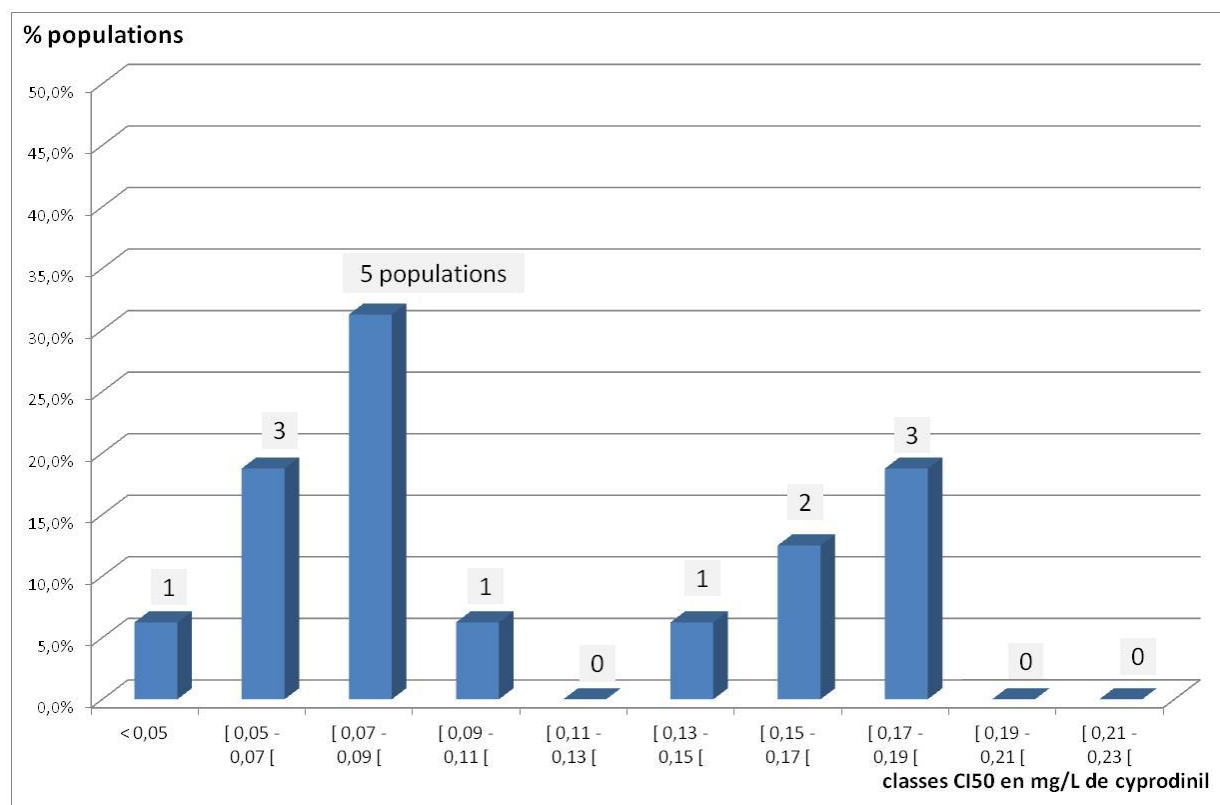
Code Anses	Région - Dép.	Espèce végétale	cyprodinil		<i>Monilia fructicola</i> *	<i>Monilia laxa</i> *
			CI50 (mg/L)	FR		
82-10	LR-30	Pêcher	< 0,05	< 0,8	9/9	0/9
83-10		"	0,058	0,9	10/10	0/10
84-10		"	0,14	2,2	10/10	0/10
85-10		"	0,080	1,3	10/10	0/10
117-10		"	0,085	1,4	10/10	0/10
119-10		"	0,088	1,4	7/7	0/7
120-10		"	0,055	0,9	8/8	0/8
154-10		"	0,10	1,6	5/5	0/5
155-10		"	0,052	0,8	7/7	0/7
237-10	LR-66	Pêcher	0,18	2,9	10/10	0/10
241-10		"	0,072	1,1	10/10	0/10
121-10	PACA-13	Pêcher	0,15	2,4	10/10	0/10
122-10		"	0,17	2,7	5/5	0/5
123-10		"	0,18	2,9	10/10	0/10
149-10	RA-69	Nectavigne	0,16	2,5	10/10	0/10
150-10		Cerisier	0,07	1,1	8/8	0/8

Légende :

- CI50 : concentration inhibitrice de 50 % de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin
- FR : Facteur de Résistance = CI50 échantillon étudié / CI50 référence sensible
- * nombre d'isollements pour lesquels cette espèce a été détectée / nombre d'isollements soumis à détermination par PCR

Sur ces 16 parcelles, la courbe de distribution des populations en fonction des classes de CI50 est représentée par la figure 1.

Figure 1 : cyprodinil - % populations en fonction des classes de CI50 (mg/L)



La répartition des parcelles paraît se différencier selon deux groupes de populations : 10 populations avec des CI50 comprises entre <0,05 et 0,11 mg/L (qui sont cohérentes avec les valeurs de sensibilité de base établies en 2007 pour *M. fructicola* [0,045 à 0,073 mg/L]) et 6 populations ayant des CI50 comprises entre 0,13 à 0,19 mg/L, soit un facteur de l'ordre de 2,2 à 2,9 pour ces 6 parcelles (dont 2 parcelles en LR, 3 en PACA et 1 en RA), ce qui ne peut pas témoigner d'une véritable dérive de sensibilité dans ces échantillons mais qui doit inciter à continuer la surveillance sur cette substance active.

4-3 Sensibilité vis-à-vis de la famille des phénylpyrroles (fludioxonil)

Comme pour la famille précédente, l'objectif de l'étude sur fludioxonil était essentiellement la recherche de souches résistantes en cours d'émergence. Les données obtenues pour cette substance active ne sont donc analysées qu'au travers des 16 parcelles pour lesquelles seule l'espèce *M. fructicola* a été déterminée (tableau 6).

Tableau 6 : Parcelles retenues pour l'interprétation des données obtenues sur **fludioxonil**

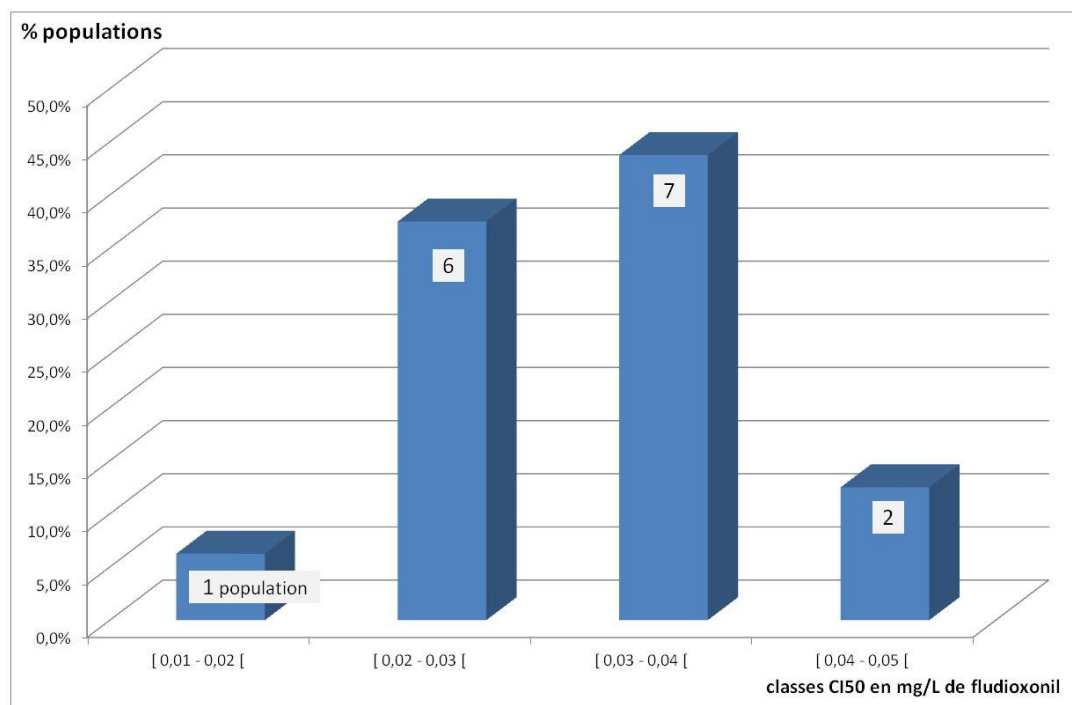
Code Anses	Région - Dép.	Espèce végétale	fludioxonil		Monilia fructicola*	Monilia laxa*
			CI50 (mg/L)	FR		
82-10	LR-30	Pêcher	0,040	0,8	9/9	0/9
83-10		"	0,031	0,7	10/10	0/10
84-10		"	0,024	0,5	10/10	0/10
85-10		"	0,032	0,7	10/10	0/10
117-10		"	0,028	0,6	10/10	0/10
119-10		"	0,035	0,7	7/7	0/7
120-10		"	0,018	0,4	8/8	0/8
154-10		"	0,028	0,6	5/5	0/5
155-10		"	0,023	0,5	7/7	0/7
237-10	LR-66	Pêcher	0,042	0,9	10/10	0/10
241-10		"	0,036	0,8	10/10	0/10
121-10	PACA-13	Pêcher	0,020	0,4	10/10	0/10
122-10		"	0,033	0,7	5/5	0/5
123-10		"	0,035	0,7	10/10	0/10
149-10	RA-69	Nectavigne	0,035	0,7	10/10	0/10
150-10		Cerisier	0,020	0,4	8/8	0/8

Légende :

- CI50 : concentration inhibitrice de 50 % de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin
- FR : Facteur de Résistance = CI50 échantillon étudié / CI50 référence sensible
- * nombre d'isolements pour lesquels cette espèce a été détectée / nombre d'isolements soumis à détermination par PCR

La courbe de distribution des populations en fonction des classes de CI50 est représentée par la figure 2.

Figure 2 : fludioxonil : % populations en fonction des classes de CI50 (mg/L)



Les valeurs de CI50 obtenues pour le **fludioxonil** sont comprises entre 0,018 et 0,042 mg/L avec une majorité de CI50 comprises dans les classes [0,02-0,03[et [0,03-0,04[(soit, pour l'échantillon 237-10 qui présente la CI50 la plus élevée (0,042), un facteur de 0,9 par rapport à la valeur moyenne de sensibilité de base de *M. fructicola* (tableau 1)).

Aucune dérive de sensibilité de *M. fructicola* n'a donc été mise en évidence, pour cette substance active, dans les échantillons étudiés en 2010.

5 - Sensibilité de base vis-à-vis du boscalid

Les analyses réalisées en 2010 sur boscalid avaient pour but de rechercher la sensibilité de base des populations de monilioses vis-à-vis de cette substance active. En effet, cette dernière (pour l'instant, seule représentante de la famille des SDHIs) est utilisée dans la lutte contre les monilioses depuis la campagne 2010. Les populations analysées en 2010 ont donc peu ou pas subi de pression de sélection de la part de cette famille chimique. Elles peuvent donc être considérées comme sensibles.

La recherche de la sensibilité de base ne pouvant être réalisée que sur les populations constituées d'une seule et même espèce de moniliose, les données obtenues pour cette substance active n'ont été interprétées, là encore, qu'au travers des 16 parcelles pour lesquelles seule l'espèce *M. fructicola* a été mise en évidence sur l'ensemble des cultures soumises à détermination (tableau 7).

Tableau 7 : Sensibilité de base de *Monilia fructicola* vis-à-vis du boscalid

Code Anses	Région - Dép.	Espèce végétale	Boscalid			<i>Monilia fructicola</i> *
			CI50 (mg/L)	CI90 (mg/L)	CMI (mg/L)	
82-10	LR 30	Pêcher	0,14	>100	>100	9/9
83-10		"	0,39	9,2	>100	10/10
84-10		"	0,22	>100	>100	10/10
85-10		"	0,25	4	>100	10/10
117-10		"	0,09	0,85	>100	10/10
119-10		"	0,07	>100	>100	7/7
120-10		"	0,10	5,5	>100	8/8
154-10		"	0,05	>100	>100	5/5
155-10		"	0,04	3,5	>100	7/7
237-10	LR 66	Pêcher	0,40	>100	>100	10/10
241-10		"	0,73	>100	>100	10/10
121-10	PACA 13	Pêcher	0,15	0,9	>100	10/10
122-10		"	0,14	3,7	>100	5/5
123-10		"	0,26	>100	>100	10/10
149-10	RA 69	Nectavigne	0,08	3,5	10	10/10
150-10		Cerisier	0,06	15	100	8/8

Légende :

- CI50 : concentration inhibitrice de 50 % de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin
- * nombre d'isolements pour lesquels cette espèce a été détectée / nombre d'isolements soumis à détermination par PCR

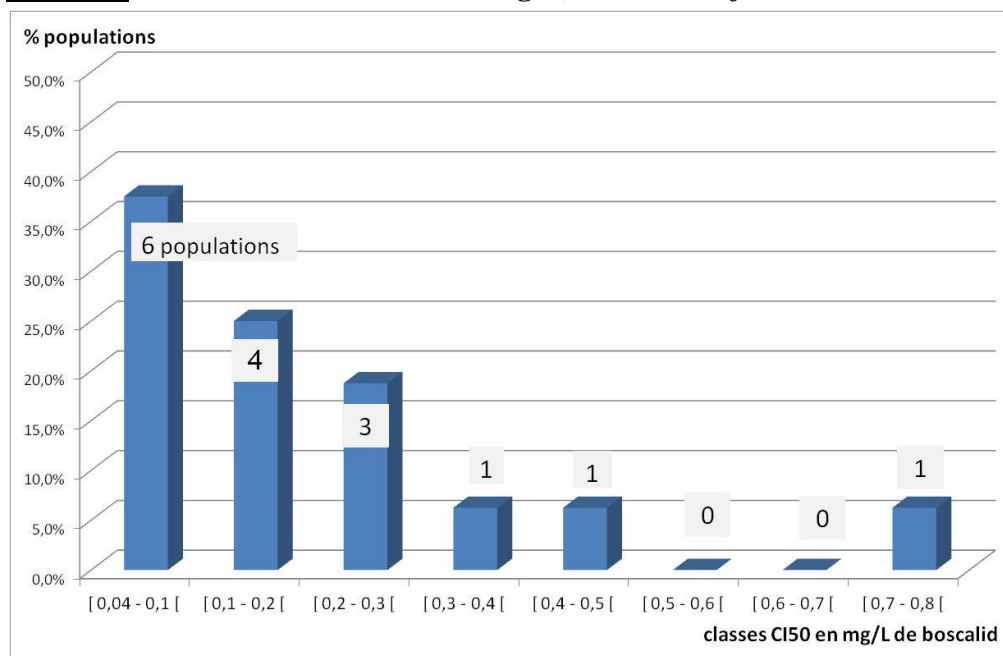
Les valeurs de CI50 montrent une assez grande variabilité (de 0,04 à 0,73 mg/L).

La courbe de distribution des populations en fonction des classes de CI50 est représentée par la figure 3. Elle montre qu'en fait, la majorité des échantillons (15 sur 16) présente des valeurs inférieures ou égales à 0,4 mg/L (soit un écart maximal de 10 entre les valeurs minimale et maximale observées). Un seul échantillon se démarque avec une CI50 qui atteint 0,7 mg/L, soit un facteur de 18 avec la valeur minimale.

Les CI90 sont aussi extrêmement variables : elles vont de 0,9 à >100 mg/L et les valeurs les plus fortes ne correspondent pas systématiquement aux échantillons dont les CI50 sont les plus élevées.

Les CMI enregistrées n'apportent pas non plus d'informations exploitables : toutes sont supérieures à 100, excepté pour la parcelle 149-10 dont la CMI est située à 10. Il faut noter que cette dernière parcelle (de nectavigne) présente les critères les plus homogènes de tous les échantillons analysés : CI50 dans la classe des valeurs minimales, donnée de CI90 parmi les plus faibles et CMI la plus basse.

Figure 3 : Sensibilité de base (CI50 mg/L) de *Monilia fructicola* au boscalid



6 - Conclusions

Les résultats des déterminations d'espèces montrent que *M. fructicola* est très largement présent dans les populations étudiées et confirment les données des années antérieures : *M. fructicola* est devenu, aujourd'hui, largement majoritaire dans les trois régions de production de fruits à noyau étudiées et cette espèce apparaît comme, très probablement, responsable des fréquences, généralement très élevées, de spores résistantes à cette famille des BMC. Néanmoins, il faut noter, en parallèle, que l'impossibilité de travailler sur des populations composées uniquement de *M. laxa* n'a pas permis de vérifier l'hypothèse d'une éventuelle dérive de sensibilité de cette seconde espèce vis-à-vis des BMC.

Concernant les suivis cyprodinil et fludioxonil, les données obtenues ne montrent pas d'évolution évidente par rapport aux résultats antérieurs et toutes les populations de *M. fructicola* testées ont été classées sensibles à ces deux substances actives. Cette surveillance sera néanmoins à maintenir dans les années à venir, notamment sur cyprodinil.

Enfin, pour le boscalid, utilisé dans la lutte contre les monilioses des fruits à noyau depuis 2010, l'étude réalisée cette année sur *Monilia fructicola*, apporte les premières données sur la sensibilité de cette espèce avant pression de sélection. Ces résultats seront à étayer dans les années prochaines. Ils permettront, par la suite, de détecter d'éventuelles dérives de sensibilité chez cette espèce, connue pour sa facilité à acquérir de nouvelles résistances.

La lutte contre les monilioses sur arbres fruitiers à noyau a toujours été considérée comme nécessitant une bonne connaissance des caractéristiques du verger. Au cours de ces dernières années, la large dispersion de l'espèce *M. fructicola* dans les principales régions de production

de fruits à noyau a pour conséquence de rendre cette lutte encore plus délicate. Seule une très grande vigilance dans le choix des substances actives, le respect de l'alternance entre toutes les familles chimiques (à l'exclusion de la famille des BMC qui favorise le développement de *M. fructicola*) et la mise en œuvre de toutes les méthodes prophylactiques disponibles seront les meilleurs garants de la réussite de la protection contre ces maladies.

5 - Partenaires scientifiques

- INRA Versailles (Anne-Sophie Walker) UMR 1290 BIOGER-CPP Bât 13 – avenue Lucien Brétignières – BP01 78850 Thiverval-Grignon
- Expert-référent national arboriculture SRAL Midi-Pyrénées (Bertrand Bourgoïn)
DGAL / SDQPV - Cité administrative - bâtiment E - Bd Armand Duportal – 31074 Toulouse Cedex

6 - Bibliographie

- Penrose L. J. et Koffman W., 1977 – Tolerance of *Sclerotinia fructicola* to Benzimidazoles fungicides and control of the fungus. Phytopath. Z. 88, 153-164
- Micoud A. et Remuson F., 1997 - Détection de la résistance aux fongicides chez les champignons *Monilinia laxa* et *Monilinia fructigena*. AFPP Tours, 5^{ème} conférence internationale sur les maladies des plantes, 3-4-5 décembre 1997
- Ioos, R., Frey, P., 2000 - Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. European Journal of Plant Pathology; Vol. 106 No. 4 pp. 373-378

ANNEXE

HISTORIQUE des ETUDES de RESISTANCE sur *MONILIA* spp

Les monilioses sont des maladies importantes des arbres fruitiers à noyau et à pépins. Elles sont la cause de nombreuses pertes au verger et après récolte (au cours de la conservation des fruits). Jusqu'en 2001, les deux principales espèces connues en France, susceptibles d'entraîner de graves dégâts, étaient *Monilia laxa* et *Monilia fructigena* (*M. laxa* attaquant principalement les fruits à noyau et *M. fructigena* les fruits à pépins).

Au début des années 1990, dans différentes régions de France productrices de fruits à noyau (Rhône-Alpes, PACA et Languedoc-Roussillon), une recrudescence des maladies de conservation, et notamment des **monilioses**, mit en alerte les techniciens de terrain. Le laboratoire du Service Régional de la Protection des Végétaux (SRPV) de Rhône-Alpes fut alors sollicité pour détecter l'émergence d'éventuelles résistances vis-à-vis des fongicides utilisés dans la lutte contre ces pathogènes. Connaissant la situation de divers pays tels que les U.S.A. (OGAWA *et al.*, 1974 et 1984), la Nouvelle Zélande (ELMER *et al.*, 1986) ou l'Italie (GUIZZARDI *et al.*, 1995), pour lesquels de nombreux cas de résistance avaient été enregistrés chez les monilioses (dès 1975 en Californie), le laboratoire mit au point une méthode pour détecter d'éventuelles résistances. Mais, soupçonnant également la possible introduction d'une nouvelle espèce (*Monilia fructicola*), connue aux USA et en Australie comme beaucoup plus agressive que les espèces indigènes européennes, le laboratoire mit aussi en œuvre une technique de détermination (basée sur des confrontations mycéliennes, seule technique de routine permettant alors de différencier ces espèces, morphologiquement très proches).

Ces travaux furent réalisés de 1995 à 1997. Des méthodes de recherche de résistance furent élaborées vis-à-vis de plusieurs familles de substances actives : benzimidazoles (BMC), dicarboximides et Inhibiteurs de la Biosynthèse de Stérols (IBS). Aucune résistance ne fut mise en évidence vis-à-vis de ces familles sur les 36 échantillons analysés (en provenance des différentes régions concernées et de diverses espèces de fruits à noyau, essentiellement pêcher et cerisier). Par ailleurs, tous ces échantillons firent l'objet d'une détermination de l'espèce de champignon en présence : une très grande majorité des prélèvements se sont avérés porteurs de *Monilia laxa* et quelques-uns de mélange *M. laxa* – *M. fructigena* ; sur cerisier, une autre maladie (*Botrytis cinerea*) fut aussi fréquemment identifiée (REYNAUD *et al.*, 1999).

Ainsi, à la suite de ces travaux, les deux hypothèses (émergence de résistance ou/et introduction d'une nouvelle espèce) ne s'étant pas vérifiées, les techniciens de terrain s'orientèrent vers la recherche d'une meilleure connaissance de la biologie de ces champignons pour une maîtrise optimale des stratégies de lutte. En parallèle, compte tenu de l'importance de ces maladies, le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPNV) de Nancy se pencha sur le problème de la différenciation des différentes espèces et mit au point une technique de détermination par PCR (à partir, notamment, des souches collectées et déterminées, par le laboratoire du SRPV Rhône-Alpes, au cours de ses études sur les résistances).

Mais, en 2001, l'espèce *Monilia fructicola* fut détectée pour la première fois en France, dans un verger de Languedoc Roussillon.

La détection de cette espèce de *Monilia* sur le sol français incita l'expert-référent national arboriculture de la DGAI à demander au laboratoire SRPV Rhône-Alpes une étude sur le profil de résistance de cette nouvelle espèce, vis-à-vis des substances actives généralement utilisées dans la lutte contre les monilioses. Les méthodes mises au point en 1997 permirent de réaliser rapidement ce travail. Les résultats obtenus démontrèrent que les espèces indigènes (*M. laxa* et *M. fructigena*) n'avaient pas acquis de nouvelles résistances mais que, par contre, tous les échantillons où *Monilia fructicola* était détecté, présentaient une très forte résistance aux BMC. Suite à ce travail, l'expert national mena une campagne de sensibilisation auprès des techniciens pour modifier les stratégies de lutte contre ce champignon et tenter ainsi de contenir sa dissémination.

Parallèlement, une cartographie fut réalisée, chaque année de 2001 à 2008, afin de suivre la dissémination de ce parasite. Ces enquêtes, supervisées par l'expert-référent national, furent coordonnées par le laboratoire SRPV de Lyon et les analyses réalisées par biologie moléculaire par le LNPV de Nancy.

En 2007, toujours sur la demande de l'expert-référent national arboriculture, le laboratoire SRPV de Lyon travailla, à nouveau, sur les trois espèces de moniliose afin d'étudier l'évolution du comportement des différentes populations vis à vis des principales substances actives utilisées : carbendazime (famille des BMC), iprodione (famille des dicarboximides), tébuconazole, hexaconazole, fenbuconazole (famille des IBS), cyprodinil (famille des anilino pyrimidines) et fludioxonil (famille des phénylpyrroles).

Ces analyses ne montrèrent aucune évolution dans les profils de résistance des différentes espèces, à savoir :

- pour les deux espèces indigènes *Monilia laxa* et *Monilia fructigena*, confirmation de la sensibilité à toutes les matières actives testées,
- pour l'espèce introduite, *Monilia fructicola*, maintien de la résistance à la famille des BMC et aucune évolution vers une éventuelle moindre sensibilité aux autres substances actives testées.

Bibliographie

- Elmer P.A.G. et Gaunt R.E., 1986 – A survey of fungicide insensitivity in *Monilinia fructicola*. Proceedings 39th New Zealand Weed and Pest Control Conference, 39, 166-169.
- Guizzardi M., Caccioni D.R.L., Pratella G.C., 1995 – Resistance monitoring of *Monilinia laxa* to benzimidazoles and dicarboximides in postharvest stage. Zeitsch. Pflanzenkr. Pflanzensch., 102 (1), 86-90.
- Ogawa J.M., Manij B.T., Tate K.G., Bose E.A., 1974 – Survey of benomyl tolerant isolates of *Monilinia fructicola* et *M. laxa* in stone fruit orchards of California. Plant Dis. Repr., 58 (7), 663-665.
- Ogawa J.M., Manij B.T., Bostock R.M., Canez V.M., Bose E.A., 1984 – Detection and characterization of benomyl-resistant *Monilinia laxa* on apricots. Plant Disease, 68, 29-31.
- Reynaud L., Micoud A. et Remuson F., 1999 - Monilia, Botrytis sur cerisier : gérer les résistances. L'arboriculture fruitière N°525 pp. 33-36