

**Auteurs :** Alain Bardet – Anne-Sophie Walker

Rubrique/Mot-clé : fraisier, *Botrytis cinerea*, résistance de souches, fongicides

Surtitre : Pourriture grise du fraisier

Titre : Résistance aux fongicides chez *Botrytis cinerea*

Résumé : 700 signes espaces compris ( $\pm 100$ )

L'équipe « Fongicides » de l'unité de Recherche BIOGER-CPP, basée à l'INRA de Grignon travaille plus particulièrement sur les aspects de caractérisation et d'évolution des résistances aux fongicides chez le champignon *Botrytis cinerea* en culture de vigne. Dans le cas du fraisier sous abri, la pourriture grise du fruit est assez bien maîtrisée par l'aération du tunnel. Par contre en culture sur substrat forcée et en culture de plein champ, cette maladie peut provoquer de graves dommages, tant aux plantes qu'aux fruits. Ceci a motivé en 2010 l'amorce d'une étude sur la résistance aux fongicides chez *Botrytis cinerea* en culture de fraisier en partenariat entre le Ctifl (Centre de Lanxade) et l'INRA (Grignon).

Phrase d'accroche : La pourriture grise en culture de fraisier présente des souches résistantes aux fongicides.

#### Mode d'actions des fongicides anti-botrytis

Les produits phytopharmaceutiques agissent selon différents modes d'action, associés à des cibles spécifiques du métabolisme du bio-agresseur. L'inhibition de la biosynthèse des stérols (ces IBS inhibent l'enzyme 3-céto-réductase chez le champignon) est un des modes d'action mono-site le plus connu dans la gamme des fongicides. Quelques rares molécules à base de minéraux ou de carbamates ont des actions multi-sites, ce qui les rend plus difficiles à être contournées par les champignons et freine la sélection de résistance.

Chez le fraisier, la pourriture grise due à *Botrytis cinerea* (ascomycète, ordre des helotiales, famille des sclerotiniacées, genre *Botrytis*) se développe en conditions de température modérée et forte humidité. Le champignon peut se développer au cœur de la plante, à la base des feuilles sur les fleurs et sur les fraises avant récolte ou en cours de conservation. La protection du fraisier contre la pourriture grise regroupe 8 fongicides que le tableau 1 décline selon les 7 modes d'action liés aux 9 familles auxquelles ils appartiennent.

Tableau 1 : Modes d'action des fongicides anti-*botrytis* autorisés sur fraisier.

Famille chimique	Mode d'action	Fongicides	Spécialité /Fraise
<b>Inhibiteurs de la respiration</b>			AMM en France
Dithiocarbamates	MultiSite	Thirame	Ordoval- Rodiazan F.
Strobilurines	Inhibiteur du complexe III	Pyraclostrobine	Signum
Carboxamides	Inhibiteur du complexe II	Boscalid	
<b>Inhibiteurs des microtubules (cytosquelette)(1)</b>			
Benzimidazoles	Fixation sur la $\beta$ -tubuline	Carbendazime, thiophanate-methyl	Non autorisé Topsin (30/11/12)
Phénylcarbamates		Diéthofencarbe	Non autorisé
<b>Inhibiteurs du métabolisme des sucres et de l'osmorégulation</b>			
Dicarboximides	Osmoregulation (protein kinase)	Iprodione	Rovral WG et Aqua flo
Phenylpyrroles		Fludioxonil	
<b>Inhibiteurs de la biosynthèse des acides aminés</b>			Switch
Anilinopyrimidines	Biosynthèse de la méthionine et excretion des enzymes	Cyprodinil, mepanipyrim, pyrimethanil	Cockpit -Japica Scala-Toucan
<b>Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols</b>			
Hydroxyanilides	C4-demethylation des stérols	Fenhexamid	Teldor-Lazulie

Parmi les 7 modes d'actions, 6 agissent sur un seul site du métabolisme du champignon (action uni site, tel par exemple le fenhexamid (hydroxyanilides, inhibant la biosynthèse des stérols). Dix des douze spécialités commerciales homologuées en fraiseraie ont une action uni-site. Le 7<sup>e</sup> mode d'action, dit multi-sites, est porté par la famille des dithiocarbamates qui comprend les fongicides Ordoval et Rodiazan. Le fait de disposer de fongicides ayant des modes d'action différents permet d'alterner ces produits et de freiner l'apparition de souches résistantes. Cette diversité est un atout pour la gestion de la résistance.

### Notion de résistance acquise et caractérisation

Sous l'effet de la pression de sélection exercée par les fongicides, les champignons, présentant un phénotype initialement sensible, peuvent devenir moins sensibles à une molécule donnée (*la résistance est acquise*)

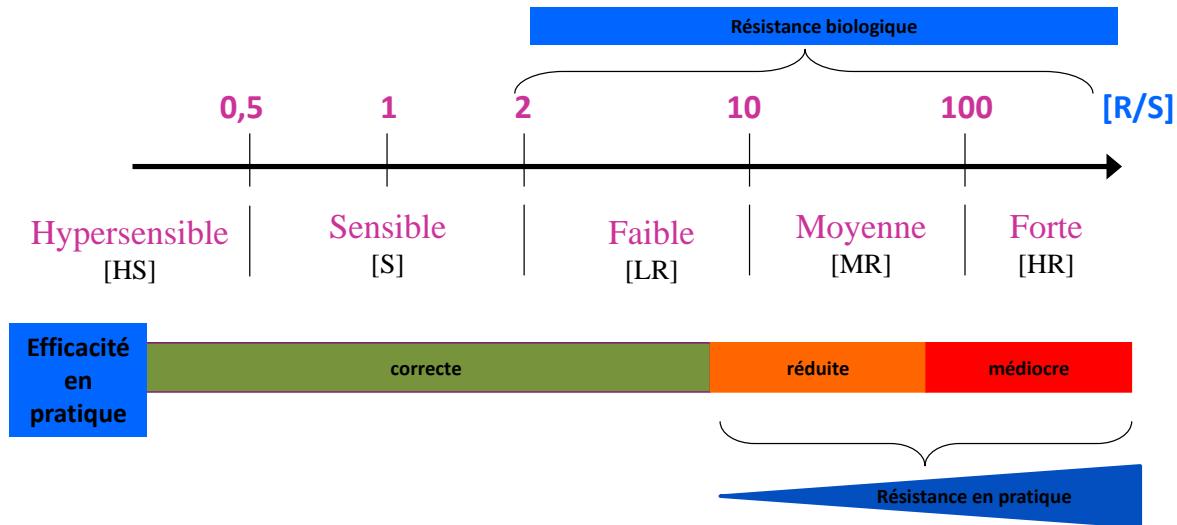
Au niveau individuel, la **résistance biologique** correspond à la réduction de la sensibilité à un fongicide, déterminée génétiquement par une modification du génome du champignon. On parle de **résistance en pratique** lorsqu'on se situe au niveau populationnel. La baisse d'efficacité du fongicide est alors lié à la présence d'individus résistants mais n'est pas systématique.

La résistance biologique est caractérisée par son facteur de résistance (FR) correspondant au rapport entre la CI50 (concentration inhibant de 50% le développement d'un champignon) d'une souche à tester et le CI50 d'une souche témoin sensible. Plus le rapport est élevé plus le niveau de résistance de la souche testée est grand.

La figure 1 schématise les classes de facteurs de résistance R/S. En parallèle les notions de résistance biologique et de résistance en pratique y sont aussi positionnées.

Ainsi, des souches résistantes avec de faibles FR ont peu de chance d'induire une résistance en pratique. Par contre, ce risque est d'autant plus important que les FR sont forts.

Figure 1 : Facteur de résistance aux fongicides et conséquences en pratique



### Conditions de la résistance en pratique

Le tableau 2, en présentant de façon croisée l'effet des FR et de la fréquence des isolats résistants dans les populations, permet de prédire les risques de résistance en pratique. Lorsque à la fois le facteur (ou niveau) de résistance de la souche et la fréquence des individus résistant sont faibles, alors l'efficacité du ou des fongicides sera élevée. Inversement si facteur et fréquence de résistance sont élevés alors l'efficacité pourra être fortement compromise. L'efficacité sera correcte (baisse d'efficacité limitée) à bonne si les facteurs de résistance sont faibles mais avec de nombreux individus résistants, ou si les facteurs de résistance sont forts et la fréquence des individus résistants est faible.

Tableau 2 : Niveaux de résistance et fréquences des individus résistants<sup>1</sup> et conséquences pratiques<sup>2</sup>

Facteur de résistance	Fréquence des individus résistants	
	Faible [ < 0.1 ou 10 % ]	Fort [ > 0.5 ou 50 % ]
Faible [ 5 – 15 ]	++	+ / ++
Fort [ > 100 ]	+ / ++	-

Légende : <sup>1</sup>Niveaux (syn. Facteurs, Coefficients) de résistance et Fréquences (syn. Pourcentages) de souches résistantes → définition dans *Bulletin OEPP 18, 569-574 (1988)*

Efficacité pratique → ++ : bonne, + : correcte, - : réduite ou nulle

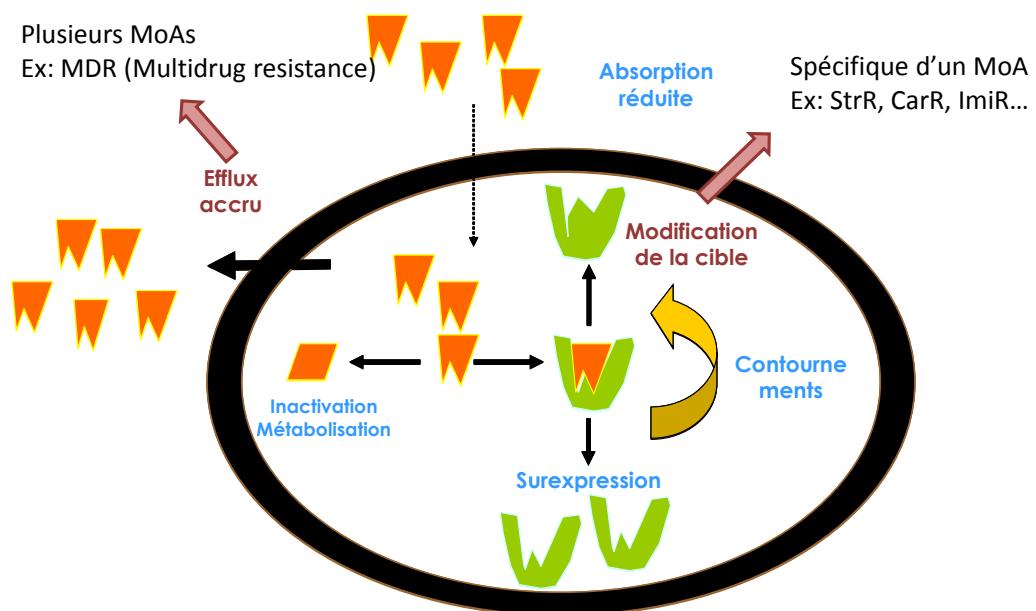
## Mécanismes de résistance

Les champignons sont donc capables de mettre en œuvre des mécanismes qui engendrent une perte partielle ou complète de l'action d'un fongicide. Chez *Botrytis cinerea* deux mécanismes de résistance ont été mis en évidence, parmi ceux régulièrement rencontrés dans les cas de résistance aux pesticides :

- Modification de la cible (résistance spécifique), déterminée par l'acquisition d'une mutation sur le gène codant pour cette protéine. Mécanisme le plus fréquent chez *B. cinerea*, il génère généralement des profils de résistance croisée au sein d'un même mode d'action.
- Efflux accru de fongicides par des transporteurs membranaires, générant des profils de résistance croisée entre mode d'action indépendants (résistance de type Multi Drug Résistance ou MDR).

La figure 2 schématise ces mécanismes de résistance.

Figure 2 : Mécanismes de résistance chez les champignons : Cas de *Botrytis cinerea*



## Echantillonnage de *Botrytis cinerea* sur fraisier

L'étude de la résistance de *Botrytis cinerea* en culture de fraisier s'est déroulée sur les saisons 2010, 2011 et 2012. La collecte d'échantillons de fraises a pu être possible avec la participation des conseillers et expérimentateurs des régions Sud Ouest, Sud Est, Haut-Rhin et Bretagne. Les organes atteints, fruits pour la plupart des échantillons mais aussi bases des feuilles ou collets, ont fait l'objet d'un prélèvement de spores sur écouvillons stériles au laboratoire fraise de Lanxade. Ces prélèvements rassemblés et conservés au frigo à 4°C ont été ensuite expédiés au laboratoire Bioger de l'INRA à Grignon où ils ont subi les tests de résistance. Sur les 105 échantillons reçus, 99 ont pu être analysés.

Encart : Nombre d'échantillons recueillis par région sur les trois ans :

49 échantillons en Sud Ouest (Dordogne et Lot et Garonne)

50 échantillons en Sud est

3 en échantillons Alsace

3 en échantillons Bretagne

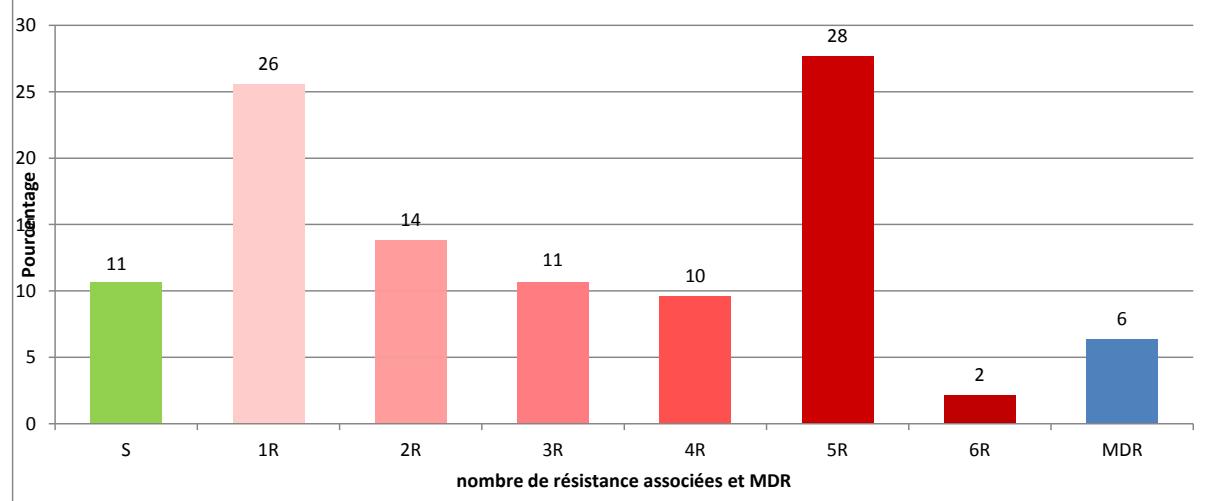
### Analyse des résistances au laboratoire

Le profil de résistance des isolats du champ est établi selon au laboratoire selon le protocole suivant. Les spores sont mises en suspension dans l'eau stérile en trempant les écouvillons conservés à 4°C puis appliquées sur deux milieux de culture contenant des doses discriminantes de fongicides. Les lectures de germination et d'elongation du filament sont notées 24h et 48h après inoculation. Ce phénotypage permet d'établir la fréquence des différentes résistances dans les populations et d'ajuster les stratégies anti-résistance.

### Statut de la résistance de *B. cinerea* sur fraisier en France

Le nombre d'échantillons par région et par an étant en quantité insuffisante, les résultats sont présentés globalement. La figure 3 présente la fréquence des souches présentant des spectres de résistance (nombre de résistances spécifiques cumulées dans un même isolat) toutes origines et années confondues.

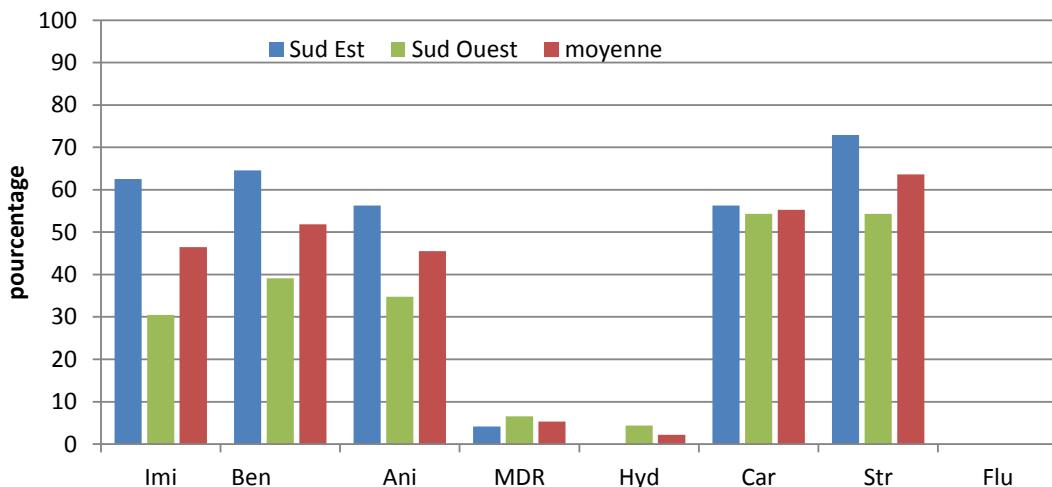
**Figure 3 : Fréquence des spectres de résistances multiples**



Seulement 11% des souches se sont révélées sensibles à tous les modes d'action anti-botrytis. Pour 26% d'entre elles une résistance à un mode d'action a été décelée. La résistance à deux, trois, quatre, cinq et six modes d'action est détectée respectivement dans 14, 11, 10, 28 et 2 % des souches. Six % des souches ont présenté un profils de résistance croisée à différents modes d'actions indépendant (résistance de type MDR).

La figure 4 schématise pour chaque famille chimique le pourcentage de souches résistantes au(x) fongicide(s) du groupe, pour les régions Sud-Est, Sud-ouest (respectivement 50 et 49 échantillons) et pour toutes régions confondues.

**Figure 4 : Pourcentage de souches résistantes par famille chimique - régions Sud-Est et Sud-ouest**



D'un point de vue global, plus de 50% des souches prélevées sont résistantes aux fongicides des familles benzimidazoles (Ben), carboxamides (Car) et strobilurines (Str). 46 et 47% des souches le sont aux fongicides respectivement des familles dicarboximides (Imi) et anilinopyrimidines (Ani). La famille des hydroxanilides (Hyd) est faiblement concernée par la résistance (seulement 2% des souches). Enfin aucune des souches ne présente une résistance aux fongicides de la famille des phénylpyrroles (Flu). Notons encore que 5% de souches révèlent un profil « Multi Drug Resistance » (MDR). Une tendance semble aller dans le sens d'un plus grand nombre de souches résistantes observées dans la région Sud-est par rapport au Sud-ouest, pour les molécules anciennes.

### Conclusions

Au regard de cette étude il s'avère que *Botrytis cinerea* en culture du fraisier révèle une grande diversité de phénotypes résistants. Des souches résistantes ont été observées pour les différents fongicides ayant une homologation en fraiseraie à l'exception du multisite thirame et des unisites fludioxonil et fluazinam.

Sur tous les secteurs, il a été noté au moins une résistance.

De nombreuses résistances spécifiques sont caractérisées pour des produits à base de molécules anciennes (carbendazime par exemple) mais également de manière plus inquiétante pour des substances actives récentes telles que la pyraclostrobine et la boscalid présentes dans la spécialité commerciale Signum.

L'inquiétude vient également des premières résistances de type MDR (résistance à plusieurs molécules de mode d'action indépendante), même si les niveaux de résistance aux différentes molécules sont faibles à modérés. La question de la durabilité de l'efficacité des fongicides est en suspens.

En termes de stratégie de défense de la fraiseraie contre la pourriture grise, il est préconisé d'agir en prévention. La conduite des fraisiers sous tunnel en aérant autant que possible en période de floraison est un point fort de la prophylaxie. Limiter l'humidité au niveau des collets particulièrement en culture sur substrat forcée en sortie d'hiver et de printemps par aération associée ou non à un léger chauffage localisé aux plants est conseillé. En ce qui concerne les fongicides il est nécessaire de les utiliser avec parcimonie, de limiter ceux dont les modes d'actions sont récents et d'alterner les familles chimiques pour retarder l'apparition de résistance.

### **Remerciements**

Les auteurs remercient les collaborateurs des différentes régions qui ont consacré de leur temps à collecter et expédier les échantillons.