

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**STATUT DE LA RESISTANCE AUX SDHIS DES POPULATIONS FRANÇAISES DE *SCLEROTINIA
SCLEROTIORUM* ET CARACTERISATION DES SOUCHES RESISTANTES**

A.-S. WALKER⁽¹⁾, C. AUCLAIR⁽¹⁾, F. REMUSON⁽²⁾, A. MICOUD⁽²⁾, J. MOINARD⁽³⁾, J. CARPEZAT⁽⁴⁾,
M. LEFLON⁽⁴⁾ ET A. PENAUD⁽⁴⁾

⁽¹⁾ UMR BIOGER, INRA AgroParisTech, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon
walker@versailles.inra.fr

⁽²⁾ Unité Résistance aux produits phytosanitaires, Anses, Avenue Tony Garnier, 69000 Lyon

⁽³⁾ DRAAF/SRAL Midi Pyrénées, Bd Armand Duportal, 31074 Toulouse

⁽⁴⁾ Laboratoire de Pathologie, Terres Inovia, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon

RÉSUMÉ

La sclérotiniose du colza représente la maladie la plus dommageable pour la culture du colza en France, et fait, à ce titre, l'objet d'un à 2 traitements annuels. L'utilisation de fongicides inhibant la succinate deshydrogénase (SDHI), principalement représentés par le boscalid, ont conduit à la sélection de souches faiblement à fortement résistantes *in vitro*, selon la molécule utilisée, en progression rapide dans les populations françaises. Cette résistance est corrélée systématiquement dans notre échantillonnage à une des sept substitutions détectées dans les sous-unités protéiques B, C et D de la succinate deshydrogénase, cible des SDHs. Ces altérations ont été détectées par séquençage mais également par un outil de diagnostic utilisable en routine et basé sur la technologie HRM.

Mots-clés : *Sclerotinia sclerotiorum*, HRM, résistance, boscalid, SDHI.

ABSTRACT

STATUS OF RESISTANCE TOWARDS SDHI IN FRENCH POPULATIONS OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AND CHARACTERIZATION OF RESISTANT STRAINS

Sclerotinia stem rot is responsible for the most severe attacks on oilseed rape in France, and therefore, is controlled by 1-2 sprays of fungicides. The use of SDHIs (succinate dehydrogenase inhibitors), mostly represented by boscalid, led to the selection of low to high resistant strains, as measured *in vitro*. This resistance evolved and spread rapidly in French populations. It was systematically correlated in our sampling with one of the seven changes detected in the subunits B, C or D of the SDH, the target enzyme of SDHIs. These alterations were detected after sequencing but also by a new diagnostic tool available for routine tests, based upon the HRM technology.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, HRM, resistance, boscalid, SDHI.

INTRODUCTION

En France, une douzaine de maladies peuvent affecter la croissance du colza, mais la sclérotiniose, causée par *Sclerotinia sclerotiorum*, reste la maladie prépondérante et conduit principalement à la pourriture de la tige et l'échaudage de la hampe fructifère. En l'absence de variétés résistantes, la lutte chimique reste le principal outil de lutte, à raison d'un à deux traitements par an pour prévenir les attaques les plus sévères. Cinq modes d'actions sont efficaces contre la sclérotiniose: les anti-microtubules benzimidazoles, les dicarboximides affectant l'osmorégulation, les inhibiteurs de la déméthylation des sterols (IDMs), les inhibiteurs du complexe III de la respiration (QoIs) et les inhibiteurs du complexe II de la respiration (SDHs)(Figure 1)(Penaud and Walker 2015). Seuls les trois derniers modes d'action restent homologués en France et font l'objet d'une surveillance pour l'émergence de résistances éventuelles. Actuellement, seuls les SDHs sont concernés par la résistance. Il s'agit du boscalid (sous-groupe des pyridines-carboxamides), introduit en 2005, et du fluopyram (sous-groupe des despyridinil-éthylbenzamides), homologué en 2014. Ces fongicides inhibent spécifiquement le complexe II de la respiration mitochondriale, ou succinate deshydrogénase (SDH), en interférant avec le site de fixation du coenzyme Q, faisant intervenir les sous-unités SdhB, SdhC et SdhD (pour plus de détails sur la mode d'action des SDHs, voir Leroux and Walker 2010). Depuis la détection d'une première souche résistante au boscalid, en Lorraine en 2008, cette résistance spécifique progresse régulièrement et conquiert de nouvelles régions.

Dans ce contexte, ce travail vise (1) à établir un état des lieux actualisé de cette résistance sur le territoire français, (2) à caractériser ces souches résistantes, et (3) à mettre au point un outil diagnostique permettant de déterminer rapidement le génotype des souches résistantes.

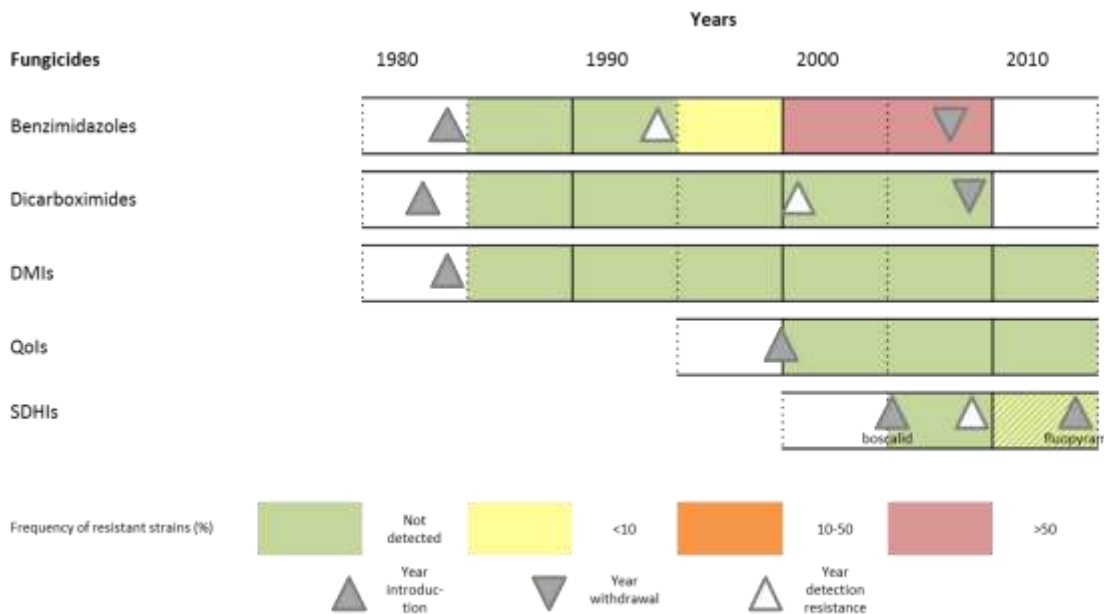


Figure 1 : Modes d'action et évolution de la résistance aux fongicides chez *Sclerotinia sclerotiorum* en France.

Mode of action and evolution of fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in France.

MATERIEL ET MÉTHODE

ECHANTILLONNAGE

Les échantillons ont été collectés depuis 2007 par le réseau d'expérimentateurs de la DGAL-SDQPV et de Terres Inovia ainsi que par les participants au réseau de Surveillance Biologique du Territoire. 350 à 2000 sclérotés ont été prélevés par an, sur des tiges de colza symptomatiques, à raison d'un sclérote par plante et d'une douzaine de sclérotés par parcelle. Ces prélèvements ont été organisés de manière à couvrir l'ensemble des régions françaises productrices de colza. Tous les sclérotés récoltés ont fait l'objet du test phénotypique décrit ci-dessous.

Entre 2011 et 2014, 120 souches issues de ces sclérotés, représentant 37 sites, ont fait l'objet d'analyses complémentaires permettant de déterminer d'éventuelles mutations portées par les gènes *sdhB*, *sdhC* et *sdhD*. A ce jour, 45 de ces isolats ont également été testés pour leur sensibilité aux SDHs. Ce phénotypage est actuellement poursuivi pour un nombre plus représentatif d'isolats.

PHENOTYPE DE RESISTANCE AUX SDHI

Test en doses discriminantes

Les souches pures sont cultivées sur milieu PDA pendant une semaine, à l'obscurité à 20°C. Un implant mycelium, prélevé sur le front de progression de la colonie, est alors déposé sur des boîtes de test contenant un milieu Sisler-succinate (composition : composition : pour 1 litre : 2g de KH_2PO_4 , 2g de K_2HPO_4 , 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5g de MgSO_4 , 5 g de Succinate disodium, 2g d'extrait de levure, 12.5 g d'Agar) amendé avec 0.5% d'éthanol ou du boscalid (produit technique pur solubilisé dans l'éthanol) à la concentration finale de 2 mg/l. Le diamètre des colonies est ensuite mesuré après 3 à 4 jours d'incubation dans les conditions décrites plus haut. La croissance dans la modalité traitée est ensuite rapportée à celle de la modalité témoin : les souches sont considérées comme résistantes au boscalid lorsque cette croissance est supérieure à 50%. Pour ces souches, le test est alors répété, en ajoutant une modalité à 5mg/l de boscalid.

Mesure de la EC50

Le test est pratiqué comme décrit dans la section précédente pour calculer la sensibilité (via l'estimation de l'EC50 (dose inhibant de 50% la croissance du de la colonie traitée, en comparaison du témoin) des isolats au boscalid (pyridines-carboxamides), fluopyram (despyridinil-éthylbenzamides), carboxine (oxathiin-carboxamides) et isopyrazam (pyrazole-carboxamides). Les souches pures sont exposées à des gammes croissantes de fongicides, dont les concentrations sont choisies pour respecter une progression géométrique d'un facteur 3 (globalement, gammes de 0.0001 à 20 mg/l). Les données de mesure à J3-4 sont utilisées pour estimer les EC50, en effectuant une régression linéaire entre la croissance rapportée à celle du témoin dans les modalités traitées et le log des concentrations testées. Les facteurs de résistance (FR) correspondent au ratio entre l'EC50 de la souche d'intérêt, potentiellement résistante et la moyenne des EC50 des souches sensibles. Ces tests ont été pratiqués, pour l'instant, sur 45 souches pures, sensibles ou résistantes aux SDHs.

SEQUENÇAGE DES GENES SDH CHEZ *S. SCLEROTIUM*

Les séquences des gènes *sdhB*, *sdhC* et *sdhD* de *S. sclerotium* ont été recherchées dans le génome complet de la souche type de l'espèce, publiée en ligne par le Broad Institute (<https://www.broadinstitute.org/>). L'homologie avec d'autres espèces a été vérifiée puis trois paires d'amorces spécifiques de *S. sclerotium* ont été dessinées pour chaque séquence, de manière à amplifier la totalité de chaque gène (amplicons d'environ 1000 bp). Les séquences d'une douzaine de

souches, résistantes ou sensibles, ont été produites après séquençage double brin des amplicons correspondants produits par PCR.

MISE AU POINT D'UNE METHODE DIAGNOSTIQUE PAR HRM

L'analyse des courbes de fusion à haute résolution, ou High Resolution Melt (HRM) est une technique de biologie moléculaire permettant la détection du polymorphisme génétique dans des échantillons d'ADN double brin. La région de l'ADN potentiellement porteuse de la mutation est d'abord amplifiée par PCR. L'amplicon est ensuite chauffé progressivement jusqu'à la séparation des deux brins d'ADN (fusion). L'analyse permet d'observer la fusion de chaque amplicon, grâce à un intercalant fluorescent. Les courbes de fusion varient selon la séquence des amplicons, ce qui permet de distinguer les variants alléliques.

Quatre couples d'amorces HRM (une pour SdhB et SdhC et deux pour SdhD) ont été mis au point à partir des séquences des souches séquencées précédemment ; ils permettent de détecter les principales mutations potentiellement impliquées dans le déterminisme de la résistance. Ces couples ont été utilisés pour caractériser toutes les souches résistantes de notre échantillonnage (n=67) et une partie des souches sensibles (n=53). Ces 120 souches représentaient 37 sites, échantillonnés entre 2011 et 2014.

RESULTATS

DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DE LA RESISTANCE AUX SDHI

L'émergence de la résistance aux SDHI est surveillée dans les populations collectées par le réseau Anses-Terres Inovia-DGA-SDQPV depuis 2007, via des tests phénotypiques en doses discriminantes utilisant le boscalid. Si cette résistance est restée anecdotique depuis sa première détection en 2008, elle semble progresser plus rapidement depuis 2008, pour atteindre une fréquence moyenne proche de 10% pour l'ensemble des sclérotés testés en 2014 (Figure 2). Cette résistance est actuellement présente dans environ 30% des populations échantillonnées, choisies pour représenter l'ensemble des régions productrices de colza.

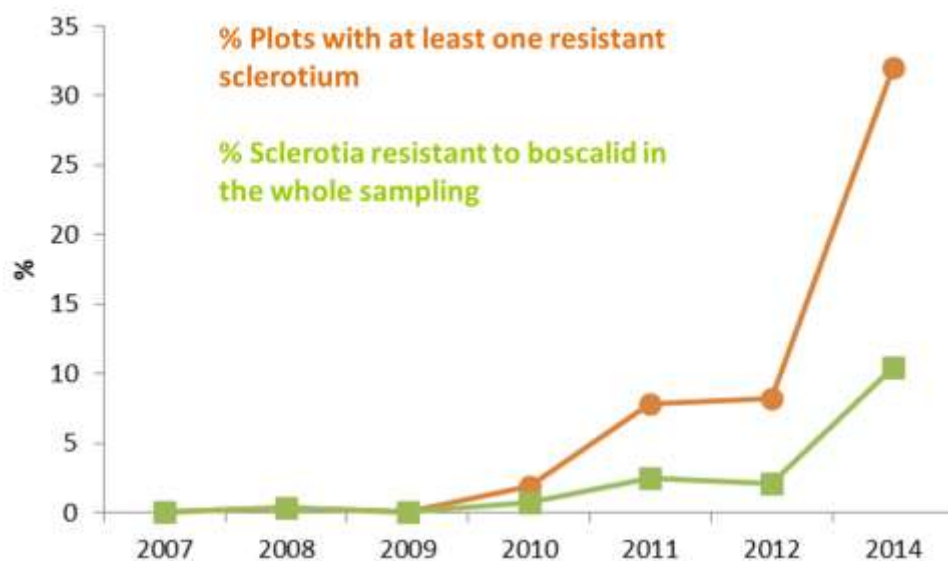


Figure 2 : Evolution temporelle de la résistance aux SDHI chez *Sclerotinia sclerotiorum* en France.
Temporal evolution of SDHI resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in France.

Depuis la première souche résistante détectée en Lorraine en 2008, cette résistance semble avoir largement colonisé d'autres régions, en particulier l'Île de France et le Nord-Est de la région Centre (Figure 3).

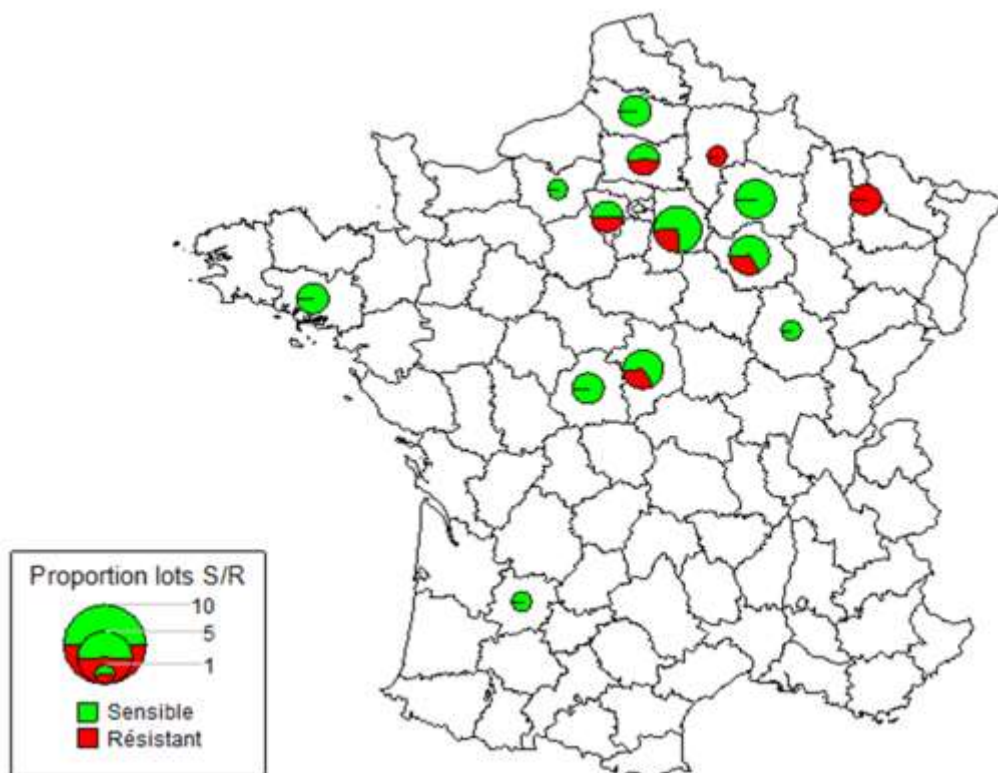


Figure 3 : Répartition spatiale de la résistance aux SDHI chez *Sclerotinia sclerotiorum* en France en 2014 (Les populations colorées en rouge comportaient au moins un sclérote résistant).
Spatial distribution of SDHI resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in France in 2014 (populations in red had at least one resistant sclerotium).

CARACTERISATION DES GENOTYPES DETERMINANT LA RESISTANCE AUX SDHI

Le séquençage des gènes *sdhB*, *sdhC* et *sdhD* chez des souches sensibles et résistantes au boscalid a permis d'identifier, dans un premier temps, les substitutions SdhB-H273Y, SdhC-H146R et SdhD-H132R.

La mise au point de l'outil HRM a nécessité le dessin de 3 couples d'amorces (un pour chaque gène), ciblant ces principales mutations (Figure 4). Pour SdhC et SdhD, un polymorphisme neutre important a été repéré sur les séquences de référence et a conduit à la caractérisation de deux courbes de fusion, correspondant à deux génotypes sensibles (non porteurs de mutations liées à la résistance). La comparaison des résultats issus du phénotypage en routine et du génotypage HRM a permis d'identifier trois substitutions supplémentaires, SdhC-G150R, SdhD-T108K et SdhD-E176K, détectées uniquement chez des souches résistantes. Un deuxième marqueur SdhD a été développé pour détecter la substitution SdhD-T108K. La substitution SdhD-E176K, décelée à faible fréquence dans notre échantillonnage, n'a pas pu être intégrée à l'outil diagnostique pour des raisons techniques, mais peut être détectée par séquençage systématique des souches non conformes résiduelles.

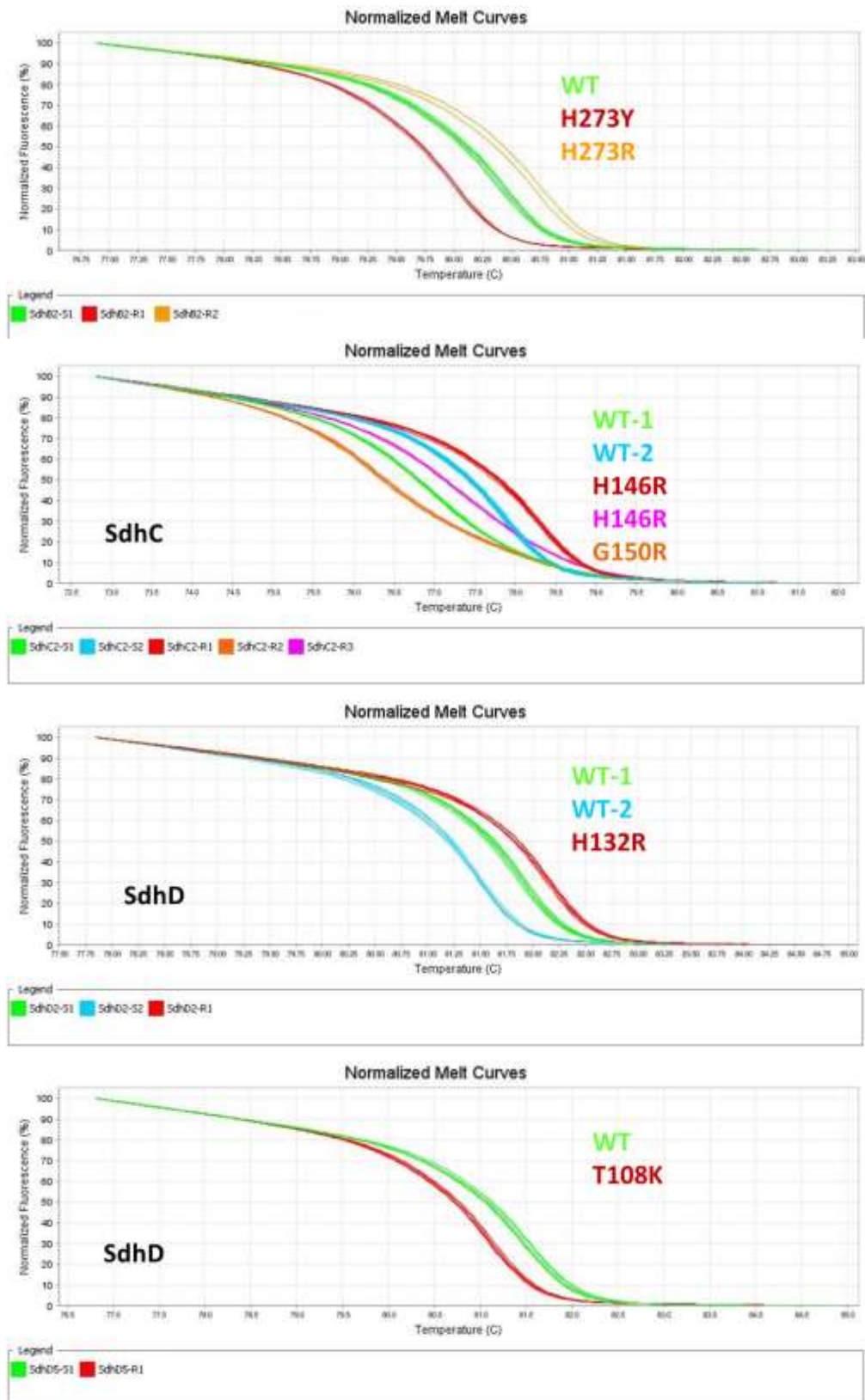


Figure 4 : Courbes de fusion établies par HRM et permettant de détecter six substitutions de SdhB, SdhC et SDHD, liées à la résistance aux SDHI chez *Sclerotinia sclerotiorum*. HRM curves enabling the detection of six changes in SdhB, SDHC and SDHD, linked to SDHI resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in France.

Parmi les 67 échantillons résistants de notre collection, 30% portaient la substitution SdhD-H132R, 27% la substitution SdhC-H146R et 15% les substitutions SdhB-H273R ou SdhC-G150R. Les autres substitutions sont moins bien représentées dans cet échantillonnage (Figure 5)). A noter que plusieurs substitutions peuvent être détectées sur le même site, au sein d'une même population. Tous les génotypes ne portaient qu'une seule de ces substitutions à la fois.

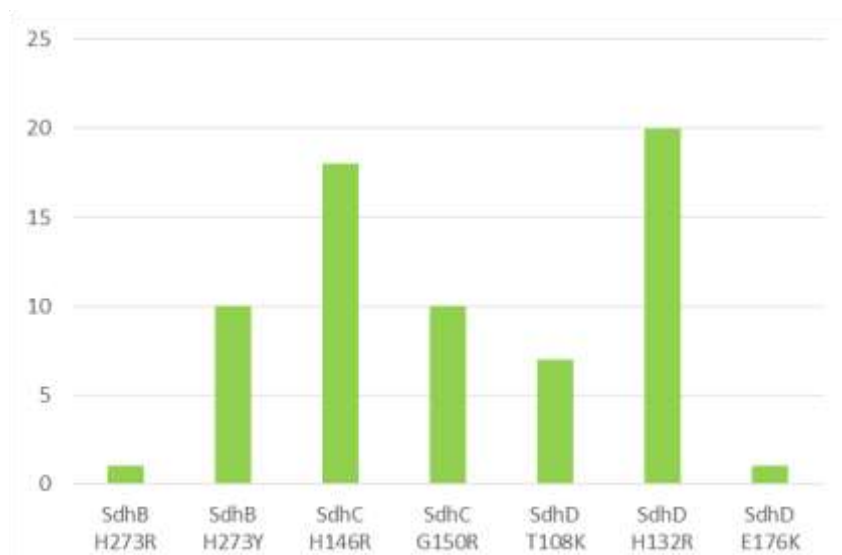


Figure 5 : Effectif des différents génotypes corrélés à la résistance aux SDHI chez *Sclerotinia sclerotiorum* (n=67).
Number of the various genotypes correlated with SDHI resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* (n=67).

CARACTERISATION DES PHENOTYPES RESISTANTS AUX SDHI

La caractérisation phénotypique de 45 isolats de *S. sclerotiorum*, présentant des génotypes sensibles ou résistants (SdhB-H273Y, SdhC-H146R, SdhC-G150R, SdhC-G150R, SdhD-H132R) est présentée dans le tableau I. Pour les souches résistantes au boscalid, les facteurs de résistance (FR) sont supérieurs à 36 ; ces FR sont plus modérés pour la carboxine, le fluopyram et l'isopyrazam. La résistance croisée entre ces différents représentants des sous-groupes chimiques de SDHIs est observée pour tous les génotypes résistants, à l'exception des souches portant le génotype SdhB-H273Y.

Genotype	Boscalid	Carboxine	Fluopyram	Isopyrazam
<i>EC50 (mg/l)</i>				
WT	0.6	1.3	0.2	0.4
<i>RF</i>				
SdhB-H273Y	>36	3.7	0.6	0.8
SdhC-H146R	>36	12.2	14.1	27.5
SdhC-G150R	>36	11.1	26.0	15.4
SdhD-H132R	>36	11.0	17.9	34.7

Tableau I : Sensibilité aux SDHI chez *Sclerotinia sclerotiorum*, mesurée *in vitro*

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces premiers résultats démontrent de manière formelle une progression évidente de la résistance aux SDHI chez *S. sclerotiorum* ces dernières années. Comme pour d'autres champignons phytopathogènes ayant sélectionné une résistance à ce mode d'action, le mécanisme de résistance correspond à une altération de la cible – ici, dans trois des quatre sous-unités constituant la succinate deshydrogénase. Ces mutations nucléotidiques impliquent une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine cible, qui conduit à réduire son affinité pour le fongicide, induisant la résistance. A l'instar de *Botrytis cinerea*, mais également d'autres espèces fongiques, une grande diversité de génotypes résistants est détectée dans les populations (Avenot and Michailides 2010). Ces génotypes diffèrent généralement par leurs FR aux différents sous-groupes chimiques de SDHI, le boscalid (pyridines-carboxamides) étant régulièrement concerné par les plus forts FR. Par ailleurs, les différents génotypes n'induisent pas systématiquement une résistance croisée positive entre tous les sous-groupes de SDHI. En particulier, les substitutions SdhB-H272Y/R (équivalent de SdhB-H273Y/R chez *S. sclerotiorum*) induisent une absence de résistance croisée, voire une résistance croisée négative avec des benzamides, comme le fluopyram (Leroux et al. 2010; Ishii et al. 2011), ce qui n'est pas le cas pour les autres substitutions, dont certaines peuvent induire de forts FR à toutes les molécules. Ceci devra être confirmé ultérieurement en phénotypant un plus grand nombre d'isolats représentatifs de chaque génotype. Par ailleurs, les mutations SdhB-H273Y/R, SdhC-H146R et SdhD-H132R chez *S. sclerotiorum* ont déjà été identifiées chez d'autres champignons phytopathogènes, dont *B. cinerea* et *Alternaria alternata*, et leur implication dans le déterminisme de la résistance aux SDHI a été démontrée formellement pour une partie d'entre elles (Lalève et al. 2014; Avenot, Sellam, and Michailides 2009; Avenot et al. 2008). La validation fonctionnelle des génotypes SdhC-G150R, SdhD-T108K et SdhD-E176K reste à effectuer. Il faut cependant noter que ces substitutions ont été observées uniquement pour des isolats résistants aux SDHI.

Plus généralement, la progression en France de cette résistance aux SDHI pose la question de la gestion de ce mode d'action. Le risque de résistance aux SDHI étant maintenant avéré, la stratégie d'alternance des modes d'action disponibles (triazoles, QoI, SDHI) est plus que jamais de rigueur. Si le boscalid a été pendant longtemps utilisé comme un produit solo sur colza, il convient désormais de l'associer avec d'autres modes (triazoles par exemple, les QoI présentant également un risque fort d'acquisition de la résistance spécifique) dans les régions où la résistance est encore absente ou peu présente, pour limiter sa sélection. Dans les régions fortement concernées par cette résistance, les autres modes d'action sont à privilégier, en attendant de connaître l'impact de cette résistance sur l'efficacité pratique des spécialités à base de SDHI (voir également la note commune « Sclerotinia du colza » <http://www.afpp.net/apps/accueil/autodefault.asp?d=5121>). Enfin, si la progression de la résistance peut être modulée par une gestion stricte des SDHI dans les années qui viennent, il reste également à caractériser la fitness des isolats résistants. En effet, pour différentes espèces, dont l'espèce proche *B. cinerea*, un coût de la résistance (ou diminution de la fitness, *i.e.* la capacité des isolats résistants à se reproduire et à entrer en compétition avec les autres) a été mesuré pour certains génotypes, avec des implications variables sur les différentes phases du cycle de vie du champignon (Lalève, Fillinger, and Walker 2014; Veloukas et al. 2013).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement les expérimentateurs ayant prélevé les populations de sclérotés.

BIBLIOGRAPHIE

Avenot, H. F., and T. J. Michailides. 2010. 'Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi', *Crop Protection*, 29: 643-51.

Avenot, H. F., A. Sellam, G. Karaoglanidis, and T. J. Michailides. 2008. 'Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio', *Phytopathology*, 98: 736-42.

Avenot, H., A. Sellam, and T. Michailides. 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: 1134-43.

Ishii, H., T. Miyamoto, S. Ushio, and M. Kakishima. 2011. 'Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*', *Pest Management Science*, 67: 474-82.

Lalève, A., S. Fillinger, and A. S. Walker. 2014. 'Fitness measurement reveals contrasting costs in homologous recombinant mutants of *Botrytis cinerea* resistant to succinate dehydrogenase inhibitors', *Fungal Genetics and Biology*, 67: 24-36.

Lalève, Anaïs, Stéphanie Gamet, Anne-Sophie Walker, Danièle Debieu, Valérie Toquin, and Sabine Fillinger. 2014. 'Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding', *Environmental Microbiology*, 16: 2253-66.

Leroux, P., and A. S. Walker. 2010. 'Les fongicides affectant les processus respiratoires. Episode 1: Modes d'action et phénomènes de résistance chez les anciennes substances (multisites et unisites affectant la biodisponibilité de l'ATP) et les nouvelles de type SDHI', *Phytoma - La Défense des Végétaux*, 631: 8-11.

Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A-S. Walker. 2010. 'Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold', *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6615-30.

Penaud, A., and A.S. Walker. 2015. 'Resistance management in oilseed rape pathogens in France.' in Hideo Ishii and Derek Hollomon (eds.), *Fungicide resistance in plant pathogens: Principles and a guide to practical management* (Springer (in press)).

Veloukas, T., P. Kalogeropoulou, A. N. Markoglou, and G. S. Karaoglanidis. 2013. 'Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations', *Phytopathology*, 104: 347-56.