



HAL
open science

Résistance au fenhexamid dans le complexe d'espèces *Botrytis cinerea*/*Botrytis pseudocinerea*

Saad Azeddine

► **To cite this version:**

Saad Azeddine. Résistance au fenhexamid dans le complexe d'espèces *Botrytis cinerea*/*Botrytis pseudocinerea*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris 11, 2014. Français. NNT : . tel-02799828

HAL Id: tel-02799828

<https://hal.inrae.fr/tel-02799828>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



INRA
SCIENCE & IMPACT

anses
alimentation, environnement, travail



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Laboratoire INRA UMR 1290 BIOGER-CPP

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 11/06/2014

par

SAAD AZEDDINE

Résistance au fenhexamid dans le complexe
d'espèces *Botrytis cinerea* / *Botrytis pseudocinerea*
études génétiques et moléculaires

Directeur de thèse : Sabine Fillinger

Directrice de Recherches (INRA Versailles-Grignon)

Composition du jury :

Président du jury : Jacqui Shykoff

Directrice de Recherches (CNRS, Université Paris Sud)

Rapporteurs : Marc Bardin
Florence Chapeland-Leclerc

Chargé de Recherches (Chargé de Recherches)
Maître de Conférence (Université Paris-Descartes)

Examineurs : Jean-Marc Nicaud
Renaud Ioos

Directeur de Recherches (INRA Jouy-en-Josas)
Chef d'unité (Anses, Malzéville)

Membre invité : Annie Micoud

Chef d'unité (Anses, Lyon) ; co-encadrante

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe antifongiques modes d'action et résistance (AMAR) de l'unité BIOGER-CPP 1290 et l'unité résistante aux produits phytosanitaires (URPP) de l'anses de Lyon.

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse Sabine Fillinger, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant de m'encadrer le long de cette thèse. Pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette thèse. J'aimerais lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité à m'écouter, à m'apprendre la bonne méthode de rédaction scientifique et son respect sans faille des délais très serrés de relecture et de correction des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été ému par ses qualités humaines et de compréhension tout au long de cette thèse.

“On ne conduit le peuple qu'en lui montrant un avenir ; un chef est un marchand d'espérance”

Napoléon Bonaparte

Je remercie également, ma co-encadrante de thèse, Annie Micoud, de m'avoir soutenu et conseillé tout au long de cette thèse. Merci pour ton accueil chaleureux à Lyon, pour tes explications et tes corrections pédagogiques, pour avoir toujours répondu présente et mille merci pour ta confiance en moi.

Je remercie Danièle Debieu pour ses remarques et ses corrections minutieuses, pour ses qualités humaines et sa grande gentillesse. Grâce à toi j'ai appris plein de choses dans le domaine de la biochimie. Merci de ton soutien, de ta disponibilité.

A Séverine Fontaine, merci de me faire découvrir le monde des outils moléculaires, merci pour le temps que tu m'as accordé, pour tes remarques pédagogiques et pour ta disponibilité à m'écouter et à m'encourager.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Marc-Henri Lebrun pour m'avoir accueilli au sein de l'unité Biologie, gestion des risques en agriculture/ champignons pathogènes des plantes (BIOGER-CPP).

Je remercie Jacqui Shykoff, Marc Bardin, Florence Chapeland-Leclerc, Jean-Marc Nicaud, Renaud Ioos d'avoir accepté de faire partie mon jury. Mais aussi, Thomas Guillemette et Daniele Werck pour avoir participé aux comités de thèse.

Un grand merci à l'équipe AFGB et Valerie Laval pour nos diverses discussions et pour avoir critiqué ce travail. Je remercie tous les membres de BIOGER, en particulier l'équipe AMAR, vous étiez ma deuxième famille, à Anne Sophie Walker (j'ai apprécié ta franchise et ton raisonnement scientifique), à Colette Audeon, Jocelyne Bach et Christiane Auclair pour leurs aides techniques. Merci à Anaïs Lalève de répondre toujours présente et à Patrick que j'ai eu l'honneur d'encadrer pour la partie Hydr2.

Merci au membre du laboratoire de l'anses de Lyon, en particulier, l'unité RPP pour m'avoir accueilli pendant 2 mois, pour votre soutien, votre encouragement et pour la belle ambiance au sein de l'unité.

Introduction générale

Mille merci à Virginie Collin qui m'a beaucoup aidé dans les tâches administratives et de résoudre mes problèmes de carte de séjour.

Merci à mes collègues de bureau 100 (Elisabetta, Clémentine et Sandrine, Julie et Romain), merci à mes amis, David, Stéphane, Martin, Ahmed et sa femme, Hakim et sa femme, Karim, Tarik et Abdessamad pour votre soutiens et vos encouragements.

Je remercie mon coach de karaté karim Bouchekal qui a accepté de m'entraîner en France, Merci à tous mes coach de karaté au Maroc ainsi que mes co-équipiers Mocaad et Issam.

Un grand merci à Sara, pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse, et de m'avoir supporter surtout pendant la rédaction de la thèse.

Et enfin je remercie ma famille de me soutenir depuis ma naissance, en particulier ma mère et mon père (vous êtes les meilleurs parents du monde) qui ont tout sacrifié afin que je réalise mon rêve. Merci à mon petit frère d'être toujours présent à mes côtés, je te souhaite bon courage pour la fin de tes études. Un grand merci à mes cousins et mes cousines.

Tables des matières

Introduction générale.....	12
1. Contexte général de la thèse.....	13
2. La pourriture grise.....	14
2.1. Symptômes et impact économique.....	14
2.2. Conditions environnementales favorables à la mise en place du cycle infectieux.....	18
3. Phylogénie et taxonomie du genre <i>Botrytis</i>.....	19
3.1. Définition de l'espèce.....	19
3.2. Critères d'espèce.....	19
3.3. Les modes de spéciation chez les champignons.....	21
3.4. La spéciation est la conséquence d'un isolement reproducteur ?	22
4. Le genre <i>Botrytis</i>.....	23
4.1. Adaptation à l'hôte chez le genre <i>Botrytis</i>	26
4.2. Les nouvelles espèces du genre <i>Botrytis</i>	29
5. Cycle biologique de <i>Botrytis cinerea</i> :	43
6. Mécanismes moléculaires de l'infection.....	46
6.1. Dégradation et pénétration de la paroi cellulaire.....	46
6.2. Les toxines fongiques	48
6.3. La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	48
6.4. Signalisation moléculaire impliquée dans l'infection.....	49
7. La lutte contre la pourriture grise.....	53
7.1. Lutte non-chimique	53
7.1.1. Mesures prophylactiques :	53
7.1.2. La lutte biologique :	54
7.1.3. Stimulation des défenses de la plante : Agent non-biologie (composés organiques, minéraux).....	59
7.2. La lutte chimique :	61
7.3. Les fongicides :.....	61
7.3.1. Les fongicides multi-sites :	62
7.3.2. Les fongicides uni-sites :	62
7.3.2.1. Les fongicides affectant la respiration :	62
7.3.2.2. Les fongicides affectant la biosynthèse d'acides aminés et des acides nucléiques :.....	64
7.3.2.3. Les fongicides inhibant la biosynthèse de composants des parois cellulaires :	65

7.3.2.4. Les fongicides anti-microtubules et anti-cytosquelette :	66
7.3.2.5. Les fongicides inhibant les transductions des signaux :	67
7.3.2.6. Les fongicides inhibant le métabolisme lipidique :	68
8. Les stérols et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (SBI) :	70
8.1. Les stérols : définition, structure et rôle :	70
8.2. La biosynthèse de l'ergostérol :	72
8.3. Les fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols.	73
9. Les fongicides anti-botrytis autorisés en France.....	77
10. La résistance aux fongicides : définitions et notions.	80
10.1. Mécanisme de résistance.....	82
10.2. Etat de résistance du complexe <i>Botrytis</i> au fenhexamid:	85
10.2.1. La résistance acquise au fenhexamid chez les souches (HydR3) <i>B. cinerea</i> : 85	
10.2.2. La résistance acquise au fenhexamid chez les souches HydR2 de <i>B. cinerea</i> : 86	
10.2.3. La résistance naturelle au fenhexamid de <i>B. pseudocinerea</i> (HydR1):.....	87
11. Objectifs de la thèse.	88
Chapitre I: Implication de Cyp684 dans la résistance au fenhexamid chez <i>B. pseudocinerea</i>	90
Avant propos.....	91
Article : Natural fenhexamid resistance in <i>B. pseudocinerea</i> involves the cytochrome P450 Cyp684.....	92
I. Introduction.	94
II. Experimental procedures	98
III. Results.....	108
IV. Discussion:	121
Résultats supplémentaires	129
Chapitre II: Outil de quantification de l'espèce <i>B. pseudocinerea</i> dans les populations naturelles de <i>Botrytis</i>	134
I. Introduction	135
II. Matériel et méthodes.....	137
III. Résultats :	142
IV. Discussion :	154
Chapitre III : Cartographie du locus responsable du phénotype HydR2	157
I. Introduction.....	158
II. Matériels et méthodes.....	161

Introduction générale

III. Résultats.....	165
ANNEXE Publication « Schumacher et <i>al.</i>, 2013 » reprenant des résultats du chapitre III	206
Discussion générale.....	184
Références bibliographiques	193

Liste des figures

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1: Différents symptômes de pourriture grise.....	16
Figure 2: Poids de vendange nécessaire pour l'obtention d'1 hl de vin (Source CA33).....	17
Figure 3 : Spéciation allopatrique, Spéciation en sympatrie.....	22
Figure 4 : Arbre phylogénétique montrant les deux clades du genre <i>Botrytis</i>	25
Figure 5: Schéma représentant des allèles de <i>B. allii</i> recombinant entre les gènes parentaux de <i>B. aclada</i> et <i>B. byossoidea</i>	26
Figure 6 : Relation hôte . pathogène chez le genre <i>Botrytis</i>	28
Figure 7 Caractéristiques morphologiques des espèces <i>B. pseudocinerea</i> et <i>B. cinerea</i>	30
Figure 8 : Position phylogénétique de <i>Botrytis pseudocinerea</i> dans le genre <i>Botrytis</i>	32
Figure 9 : Comparaison de la région codante du gène <i>mrr1</i> chez <i>B. cinerea</i> et <i>Botrytis</i> groupe <i>S</i>	33
Figure 10 : Phylogénie du clade I établie avec les gènes (<i>mrr1</i> , <i>fg1020</i> , <i>hsp60</i> , <i>nep2</i> et <i>ms547</i>) et incluant l'entité <i>Botrytis</i> groupe <i>S</i>	34
Figure 11: La phylogénie du genre <i>Botrytis</i> , incluant la nouvelle espèce <i>B. sinoallii</i>	36
Figure 12 : Phylogénie moléculaire de 61 souches de <i>Botrytis</i> spp.....	38
Figure 13 : Structures d'infection à partir des conidies de <i>B.cinerea</i>	44
Figure 14 : Cycle de vie de <i>B. cinerea</i> . (Fillinger et al., 2007).....	46
Figure 15 : Schéma représentative des différentes voies de signalisation chez <i>B. cinerea</i>	50
Figure 16: Système actuel de numérotation des stérols et représentation schématique des trois différentes séries structurelles de stérols.	71
Figure 17 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez les champignons filamenteux et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS).....	75
Figure 18 : Structure chimique du fenhexamid et de la fenpyrazamine.	76
Figure 19 : La proportion de vignes traitées avec différents botryticides dans sept régions du territoire français.....	79
Figure 20 : Schéma récapitulative des différentes types de résistance.....	82
Figure 21 : La structure et les domaines fonctionnels de la protéine 3-cétoréductase <i>Erg27</i> de <i>B. cinerea</i>	85

Introduction générale

Figure 22 : Evolution de la résistance de *B. cinerea* aux hydroxyanilides dans les vignobles de la région Champagne et la pression de sélection en fonction de nombre de traitements par saison. 86

CHAPITRE I

Figure 1: Expression of the *bc1g-02902* gene in *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* during exposure to 10 mg l⁻¹ fenhexamid. 108

Figure 2: Phylogenetic analysis of *Cyp684* compared to the *A. nidulans* CYPome 110

Figure 3: Muscle alignment of amino acid sequences encoded by *cyp51* gene from human (BAG52338.1), *B. cinerea* (BC1G_11853), *Monilinia fructicola* (ACF06196.1), *Sclerotinia sclerotiorum* (SS1G_04805) and *cyp684* from *Aspergillus nidulans* (CBF89943.1), *Fusarium oxysporum* (EWY92073.1) and *Botrytis pseudocinerea* 114

Figure 4: Gene inactivation method of *cyp684* in *B. pseudocinerea* strain 900 (A) and Southern-blot analysis (B) of transformants. 115

Figure 5: Model explaining *Cyp684*'s role in fenhexamid resistance between the two species *B. cinerea* and *B. pseudocinerea*. 123

Figure S1 : Démarche expérimentale d'expression hétérologue de *Bpcyp684* chez *S. cerevisiae* ainsi que la vérification de sa surexpression. 129

Figure S2: Schéma explicatif des gènes chimères de *cyp684* construits pour déterminer le mécanisme de résistance chez *B. pseudocinerea*. 131

CHAPITRE II

Figure 1 : Schéma de la méthode moléculaire *BpASP* pour quantifier *B. pseudocinerea* dans un échantillon de pourriture grise. 143

Figure 2 : Localisation des deux amorces *G3PDH* sens et anti-sens et de la sonde *Botrytis* sur le gène *g3pdh* 147

Figure 3 : Localisation des deux amorces *MS547* sens et anti-sens et de la sonde *Bpseudo* sur le marqueur *ms547* 148

Figure 4 : Courbe étalon pour évaluer les couples d'amorces + sondes *g3pdh/Botrytis* et *ms547/Bpseudo* 149

Figure 5 : Corrélation entre les valeurs théoriques et calculées de *B. pseudocinerea* dans les mélanges d'ADN déterminés par *BpASP* 153

CHAPITRE III

Figure 1 : Schéma représentative du cluster *bik* chez *F. fujikuroi*, et chez des souches grise et roses de *B. cinerea* respectivement. 159

Figure 2 : Schéma indicatif des domaines conservés de la protéine *VeA* d'*A. nidulans* 160

Figure 3 : Schéma de l'analyse du croisement entre les souches 1750 et SAS405. 165

Figure 4 : Comparaison phénotypique des descendants. 167

Figure 5 : A) Cluster *bik* dégénéré chez *B. cinerea* de phénotype gris. Le couple d'amorces *F1/R14* indiqué en gris est dessiné sur la partie dégénéré du cluster *bik*. B) Cluster *bik* complet chez *B. cinerea* de phénotype rose. Le couple d'amorces *F6/R6* indiqué en rose est dessiné sur le gène *bcik1*. 170

Figure 6 : Exemple de deux marqueurs microsatellites polymorphes entre les souches 1750 et SAS405 171

Introduction générale

<i>Figure 7 : Bilan d'analyse des descendants issu du croisement les souches 1750 et SAS405</i>	176
<i>Figure 8 : Comparaison phénotypique de la souche 1750 et du mutant 1750</i>	180
<i>Figure 9 : schéma explicatif des trois hypothèses expliquant le phénotype HydR2.</i>	182

DISCUSSION GÉNÉRALE

<i>Figure 1 : Analyse phylogénétique des protéines Erg27 de B. cinerea, B. pseudocinerea, Nectria haematococca, Sclerotinia sclerotiorum, Sclerotinia borealis, Magnaporthe oryzae et Blumeria graminis</i>	189
---	-----

Liste des tableaux

INTRODUCTION GÉNÉRALE

<i>Tableau 1 : Tableau récapitulatif des espèces de Botrytis identifiées jusqu'en 2013, incluant le nom des maladies, la forme sexuée, les plantes hôtes (Tableau de Staats et al., 2005 modifié).</i>	40
<i>Tableau 2 : Principaux gènes impliqués dans la virulence chez B. cinerea d'après (Choquer et al., 2007)</i>	51
<i>Tableau 3 : Exemples des agents de contrôle de biologiques antagonistes à B. cinerea. (D'après Elmer & Reglinski, 2006)</i>	56
<i>Tableau 4 : Méthode standard de traitement anti-botrytis</i>	61
<i>Tableau 5 : Tableau des différentes familles chimiques des fongicides multi-sites.</i>	62
<i>Tableau 6 : Fongicides inhibant la respiration cellulaire (Source FRAC)</i>	64
<i>Tableau 8 : les fongicides inhibiteurs des polysaccharides et la biosynthèse de la mélanine.</i>	66
<i>Tableau 9 : les fongicides inhibiteurs de cytosquelette</i>	67
<i>Tableau 10 : les fongicides affectant la transduction des signaux.</i>	68
<i>Tableau 11 : les fongicides inhibant le métabolisme lipidique</i>	69
<i>Tableau 12 : Tableau résumant les mécanismes de résistance aux anti-botrytis.</i>	84

CHAPITRE I

<i>Table 1: list of strains used in this study.</i>	99
<i>Table 2: Primer sequences designed for this study. Overlapping sequences in bold</i>	103
<i>Table 3: In vitro effects of fenhexamid on B. cinerea (B05.10) B. pseudocinerea wild type (900) and B. cinerea erg27 replacement mutants B05.10::erg27B. pseudocinerea (erg27(14), erg27(18)).</i>	108
<i>Table 4: Signature motifs of the EP450I family of cytochrome P450 detected in the Cyp684 protein</i>	113
<i>Table 5: Sensitivity to fenhexamid and synergy between fenhexamid + prochloraz in B.cinerea, B. pseudocinerea and B. pseudocinerea Δcyp684 mutants.</i>	118
<i>Table 6 : Relation between cyp684 gene structure and fenhexamid sensitivity</i>	120

CHAPITRE II

<i>Tableau 1 : liste des espèces utilisées dans cette étude.</i>	137
<i>Tableau 2 : Séquences des amorces et des sondes utilisées pour détecter et quantifier respectivement le genre Botrytis et l'espèce B. pseudocinerea</i>	139
<i>Tableau 3 : Paramètres de PCR des couples primers+sondes Botrytis et B. pseudocinerea respectivement.</i>	149
<i>Tableau 4 : Analyse successive de la spécificité des deux marqueurs Botrytis et Bpseu</i>	152
<i>Tableau 5 : Comparaison entre le pourcentage théorique et calculé de B. pseudocinerea dans des mélanges d'ADN (n=2).</i>	153

Introduction générale

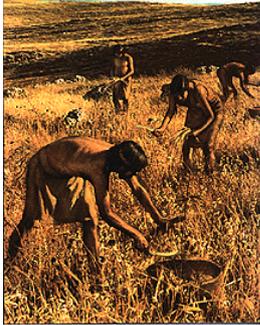
CHAPITRE III

<i>Tableau 1 : Caractéristiques des souches HydR2 (Leroux et al., 2002)</i>	158
<i>Tableau 2 : liste des amorces utilisées</i>	164
<i>Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des descendants du croisement entre SAS405 et 1750.</i>	169
<i>Tableau 4 : Caractéristiques des microsatellites entre les souches 1750 et SAS405</i>	173
<i>Tableau 5 : Génotype des descendants (1750 X SAS405) avec les microsatellites Bc53,71, 51, 161.</i>	174
<i>Tableau 6 : Pourcentage des descendants recombinants et parentaux.</i>	175
<i>Tableau 7 : Répartition des caractères production de sclérotés, en fonction du type sexuel et de la pigmentation</i>	177
<i>Tableau 8 : Répartition des deux caractères pigmentation de mycélium et sensibilité au fenhexamid</i>	177

Introduction générale

1. Contexte général de la thèse.

L'agriculture occupe une place très importante dans la société humaine, elle intervient à différents échelles : (Nourriture, échanges nationaux, ...) ce qui lui confère un rôle primordial dans l'économie mondiale.



La production agricole assure principalement l'alimentation des humains. Elle représente un facteur clé dans la chaîne agroalimentaire, en assurant l'approvisionnement en matière première et elle doit répondre aux besoins de la population mondiale. Selon les estimations de la FAO, la population mondiale devrait atteindre 8,3 milliards en 2030 (www.fao.org). Cette augmentation de la démographie entraînera une augmentation des besoins alimentaires que l'agriculture devrait donc satisfaire. En d'autres termes, la production agricole devrait être intensifiée. Parmi les menaces qui pèsent sur l'agriculture, les bioagresseurs prennent une place importante. Afin d'assurer et de maintenir des niveaux de production suffisants pour répondre aux besoins de la population, il faut limiter l'impact des bioagresseurs provoquant des maladies des plantes.

La France est le premier pays agricole européen. Elle est le premier producteur européen de céréales, d'oléagineux, de betteraves sucrières et de vin (<http://www.rpfrance.eu/L-Agriculture-francaise-en.html>). Les céréales et le vin représentent plus de la moitié de la production des végétaux en France. La production de vin en France s'élève à 50,2 millions d'hectolitres.

La vigne est soumise à des attaques de multiples pathogènes d'origine très variée ; bactéries, virus, nématodes, phytoplasmes et champignons. Parmi les maladies fongiques, l'on peut citer le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise provoquées respectivement par (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* et *Botrytis cinerea*).

Introduction générale

Le maintien d'une forte production agricole nécessite d'associer différentes méthodes de lutte contre ces champignons phytopathogènes. L'équipe AMAR dans laquelle j'ai réalisé ce travail de thèse mène des recherches visant à mieux gérer les phénomènes de résistance aux antifongiques dans l'objet de maintenir les niveaux de production dans un contexte de réduction des fongicides. L'étude de l'adaptation des champignons aux fongicides à l'échelle des populations, de l'individu et de la cellule constitue l'une des axes de recherche de l'équipe.

L'objet de cette thèse est l'adaptation du champignon *Botrytis cinerea* et *Botrytis pseudocinerea* provoquant la pourriture grise au fongicide fenhexamid. Dans les chapitres suivants nous décrirons la maladie de la pourriture grise, l'agent pathogène *Botrytis* et sa phylogénie, les méthodes de lutte contre cette maladie, ainsi que l'état des lieux de la résistance à l'anti-botrytis fenhexamid au début de cette thèse.

2. La pourriture grise.

2.1. Symptômes et impact économique.

La pourriture grise est l'une des maladies des plantes la plus dévastatrice dans le monde. Elle est provoquée par un complexe d'espèces fongiques appartenant au genre *Botrytis*.

Chez de nombreux fruits et légumes, l'infection commence généralement sur les fleurs sénescents. Sur les pétales des fleurs, le champignon pénètre au niveau de minuscules cicatrices puis colonise tous les pétales. Les symptômes se propagent ensuite sur les fruits adjacents en phase de croissance. Sur tomates cultivées en serre, les dommages sont visible sur les tiges (Figure 1) (Williamson *et al.*, 2007).

Au niveau des framboisiers (Figure 1), la pourriture grise dévaste les fruits. Le pathogène attaque les feuilles en provoquant des lésions brunes avec des bordures jaunes qui se propagent vers le nœud des tiges végétatives pour augmenter la taille des lésions (Figure1).

Introduction générale

Une telle infection n'entre pas dans les bourgeons auxiliaires en raison des couches d'épidermiques, mais elle retarde le développement des bourgeons au niveau des nœuds infectés. Par conséquent les bourgeons ne parviennent pas à produire de pousses latérales fertiles. Après la dormance hivernale, les lésions des tiges de framboisier deviennent blanches avec l'apparition d'une coloration grise pendant le printemps. La pourriture grise provoque des dégâts en particulier pendant des périodes prolongées de temps pluvieux ou humide, au moment de la floraison ou des récoltes des framboisiers (Williamson *et al.*, 2007).

Aux vignobles, la pourriture grise peut contaminer différents organes de la plante. Les rameaux infectés (Figure 1) par la pourriture grise présentent des tâches brunes, puis des sclérotés apparaissent sous forme de petites ponctuations denses et noires. Sur les feuilles (Figure 1), l'attaque commence du bord de limbe et envahit peu à peu toutes les feuilles. Celles-ci prennent un aspect brûlé avec l'apparition d'un feutrage gris la feuille. Mais les infections les plus dommageables sont celles qui se produisent au niveau des jeunes baies *via* les pièces florales. Au moment de la récolte, les baies deviennent sensibles à la contamination et sans les conditions favorables, l'agent pathogène traverse la cuticule de la baie. Dans le cas d'une blessure, les hyphes mycéliens colonisent des tissus végétaux plus facilement pour assurer la propagation de la maladie.



Figure 1: Différents symptômes de pourriture grise. A et b) : sur framboisier (Williamson et *al.*, 2007). c) feuilles de vignes (source Bayer CropScience). d) grappes de raisin (source BASF). e) Le développement de pourriture grise sur tige de vigne (source BASF). f) : Sclérotés sur tige de tomate (source A. Billard), g) fleur infectée (droite), une fleur saine (gauche) (Williamson et *al.*, 2007).

Les dégâts causés par cette maladie sont graves car ils sont susceptibles de causer des pertes de récolte, mais aussi d'altérer des qualités organo-liptiques du vin. Les dégâts qualitatifs se caractérisent par des propriétés olfactives et gustatives désagréables. La pourriture grise affecte de manière radicale les composés phénoliques et organoleptiques du vin (Davidou, 2011), en particulier elle provoque une diminution du degré alcoolique et une accumulation

Introduction générale

de composés comme le glycérol, des glucanes et de l'acide glucuronique génère des arômes moisiterreux. Les dégâts quantitatifs se manifestent par la réduction dans la production de vin. Des rapports techniques indiquent que la région de Alsace a perdu environ 21% des récoltes entre 1976 et 1980. Quant aux volumes de vin, 35% des fruits pourrissent et à la récolte, le volume de vin rouge est diminué de 700hl à 500hl (Ky *et al.*, 2012). Plus le taux de pourriture grise est élevé, plus le poids de vendange est élevé pour l'obtention d'1 hl de vin (Figure 2).

La pourriture grise a un impact économique très important sur les cultures. En effet, les pertes provoquées correspondant à 20% des récoltes mondiales pour les cultures concernées et leurs coûts sont estimées entre 10 et 100 milliards d'euros par an. On estime que 20% à 25% des récoltes de fraise en Espagne sont perdus à causes de *Botrytis*. Pour la vigne en France, on évalue les pertes entre 15% et 40% selon les conditions climatiques (Cilindre *et al.*, 2007). On estime les pertes mondiales due à *B. cinerea* sur vigne à 2 milliards de \$ par an. En culture sous abris, les risques d'attaques par *B. cinerea* sont très élevés chez la tomate, le poivre, la laitue ou la fraise. Dans une étude réalisée sur 15 serres (Sud de France), les auteurs ont constaté que l'incidence de l'agent pathogène entre mai et juin 1991 variait de 32% à 100% et que la mortalité des plantes atteignait 46% dans certaines serres (Nicot & Baille, 1996).

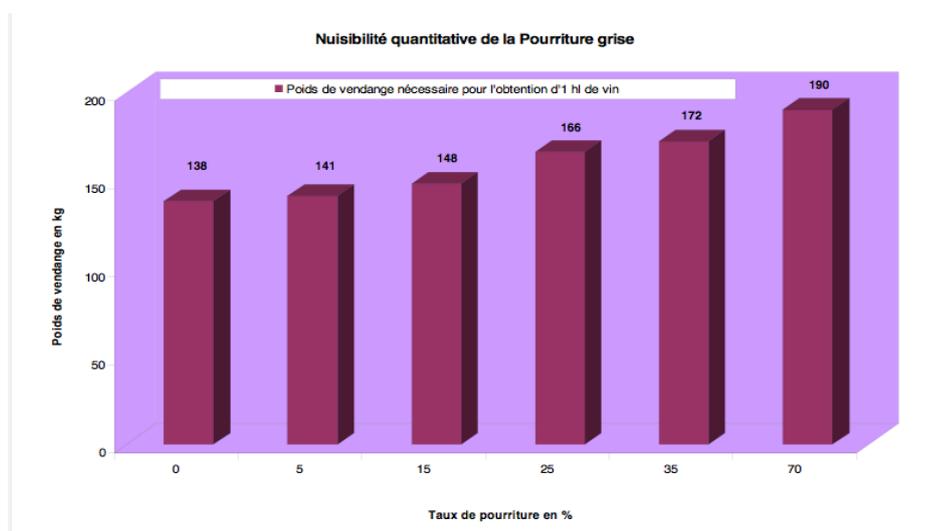


Figure 2: Poids de vendange nécessaire pour l'obtention d'1 hl de vin (Source CA33).

2.2. Conditions environnementales favorables à la mise en place du cycle infectieux.

Le développement du champignon suit plusieurs étapes (cycle de vie) sporulation, dissémination des conidies, germination sur tissu colonisé, pénétration et la croissance du mycélium du tissu infecté interne, l'infection finale dépend de la susceptibilité des tissus de l'hôte. La propagation de l'épidémie dépend également des conditions climatiques. Une température optimale comprise entre 20°C et 30°C (Masaya *et al.*, 1970) et une humidité relative entre 80 et 100% sont nécessaire pour la germination des conidies (Yunis *et al.*, 1990).

Différentes études ont montré que trois paramètres, l'humidité, la température et le vent, peuvent être limitant pour le développement aérien du mycélium et la production des conidies, sans que leur impact respectif soit connu avec précision. Pour contourner ce problème, d'autres auteurs ont considéré le potentiel d'évaporation de l'eau dans la production de conidies combinant ainsi température, humidité et vent (Thomas *et al.*, 1988).

La lumière aussi joue un rôle important dans la production des spores (Elad, 1997, Nicot *et al.*, 1996). Des études ont mis en évidence que les ultraviolets proches (300 à 400 nm) stimulent la production de spores alors que les infra rouges (>720 nm) l'inhibent (Epton & Richmond, 1980).

Comme mentionné précédemment, la pourriture grise est une maladie cryptogamique provoquée par un complexe d'espèce fongique *Botrytis spp.* Dans le chapitre suivant, nous allons décrire ce complexe pour répondre à la question si le complexe provoquant cette maladie est composé de plusieurs espèces.

Avant de définir la phylogénie et la taxonomie du genre *Botrytis*, nous allons d'abord définir la notion d'espèce et les critères utilisés pour définir une espèce.

3. Phylogénie et taxonomie du genre *Botrytis*

3.1. Définition de l'espèce.

La définition de l'espèce a évolué tout au long de l'histoire. Nos ancêtres chasseurs fondaient la notion d'espèce sur la ressemblance, alors que les premiers éleveurs se basaient sur la descendance et l'interfécondité. Depuis l'antiquité, ces notions d'espèce prévalaient pendant des siècles (Philippe Lherminier, 2000) .

Avec l'acceptation de la théorie de l'évolution de Darwin, les évolutionnistes suppriment la notion de ressemblance, puisqu'ils montrent que les variabilités sont la conséquence de la sélection naturelle. Ils introduisent ainsi la notion de réseau généalogique du vivant, qui explique la relation de parenté entre tous les organismes au cours de la vie sur terre. Tout cela a conduit à la définition moderne : l'espèce est l'unité fondamentale de la biologie, elle constitue un segment du réseau généalogique, définitivement séparée du reste de réseau par un isolement reproducteur (cette barrière empêche l'échange des gènes avec d'autres espèces). L'espèce est limitée dans le temps par un évènement de spéciation (origine) et un évènement d'extinction ou la sélection d'une nouvelle espèce (Queiroz, 2007, Samadi & Barberousse, 2006).

3.2. Critères d'espèce.

Les critères d'espèces sont les utiles permettent de mettre en évidence un ensemble de groupes d'individus capables de se reproduire ayant le même historique évolutif appartenant à la même espèce. Il existe vingt deux concepts différents et complémentaires pour définir une espèce (Mayden, 1997, Queiroz, 2007).

Introduction générale

Le choix des critères dépend des modèles d'étude. Certains critères présentent plus d'intérêt que d'autres pour définir une espèce. Dans le contexte de cette thèse, nous nous focaliserons sur quelques critères importants pour définir une espèce fongique (Giraud *et al.*, 2008).

- Critère biologique :

Le premier critère pour définir l'espèce du point de vue biologique est la reproduction ; Le reproducteur s'accouple à son semblable et produit un semblable, reproducteur à son tour, et cette répétition infinie du semblable caractérise les individus appartenant à la même espèce. L'incapacité de deux organismes à se reproduire constitue la preuve définitive de leur divergence par la mise en place d'un isolement reproducteur (post-zygotique ou pré-zygotique) (Mayr, 1963). Néanmoins, le concept biologique de l'espèce possède certaines limites. L'isolement reproductif ne peut pas être déterminé dans le cas des fossiles et des organismes asexués.

- Critère morphologique :

Le critère morphologique est le critère le plus utilisé en pratique. Il se base sur l'identification des caractéristiques structurales ou morphologiques distinctes. Les caractères utilisés doivent être héréditaires et les variations entre les individus ne doivent pas résulter de l'écosystème. Ces caractères morphologiques vont être fixés sous l'effet de la sélection et de la dérive. L'avantage du critère morphologique est qu'il est applicable aussi bien chez les organismes sexués qu'asexués. En contrepartie, la limite du critère morphologique est la ressemblance des espèces récemment séparées plus de nombreux critères morphologiques limités chez les champignons (Peter *et al.*, 2003).

- Critère phylogénétique :

Le critère phylogénétique se base sur l'étude des séquences nucléotidiques et la recherche de ressemblances non visibles sur le plan physique. Cette méthode inventée par Hennig (Hennig, 1966) permet de trouver l'histoire de l'évolution des espèces et ainsi de tracer les

Introduction générale

branchements dans l'arbre généalogique. Du point de vue de ce critère, l'espèce est un groupe d'individus qui dérive d'un ancêtre commun. Le critère phylogénétique ne peut être fiable que pour les caractères déjà fixés par la dérive génétique et/ou la sélection naturelle. En revanche, le critère phylogénétique montre ses limites face aux caractères non neutres (des gènes) qui ont subies de pression de sélection.

- Le critère écologique :

La niche écologique est un autre élément important pour délimiter les espèces. Deux espèces sont proches du point de vue écologique, si elles partagent la même niche écologique (Van Valen, 1976). L'étude de deux espèces partageant la même zone de vie permet d'identifier ou de prédire les exigences nutritionnelles de chaque espèce, son mode de vie (parasitisme, saprophytie, symbiose) et son adaptation aux conditions climatiques (milieu tempéré, aride, froid, sec).

3.3. Les modes de spéciation chez les champignons.

La spéciation est la naissance ou l'apparition de deux espèces à partir d'une seule espèce. Il existe plusieurs modes favorisant la spéciation. 1/ Dans la spéciation allopatrique (Mayr, 1963) le flux de gènes entre deux populations est limité par des barrières géographiques ou d'autres barrières extrinsèques. On distingue deux types de spéciation allopatrique (Figure 3A): la spéciation par vicariance ou séparation d'une seule population ancestrale en deux grandes populations, et la spéciation péripatrique où une petite population se trouve distinguée de la grande (Kohn, 2005). 2/ Dans une spéciation en sympatrie (Figure 3B) les facteurs extrinsèques ne s'opposent pas aux flux de gènes, c'est-à-dire les croisements entre individus dépendant uniquement du génotype des espèces (Kondrashov & Mina, 1986).

L'hybridation a également été proposée chez les champignons comme pouvant permettre l'apparition d'une espèce adaptée à une nouvelle niche écologique. Par exemple, des hybrides

Introduction générale

de peupliers résistants aux rouilles causées par les champignons du genre *Melampsora*. Mais un hybride entre deux espèces de *Melampsora* est apparu rapidement et qui a réussi à infecter les peupliers hybrides (Giraud et al., 2008).

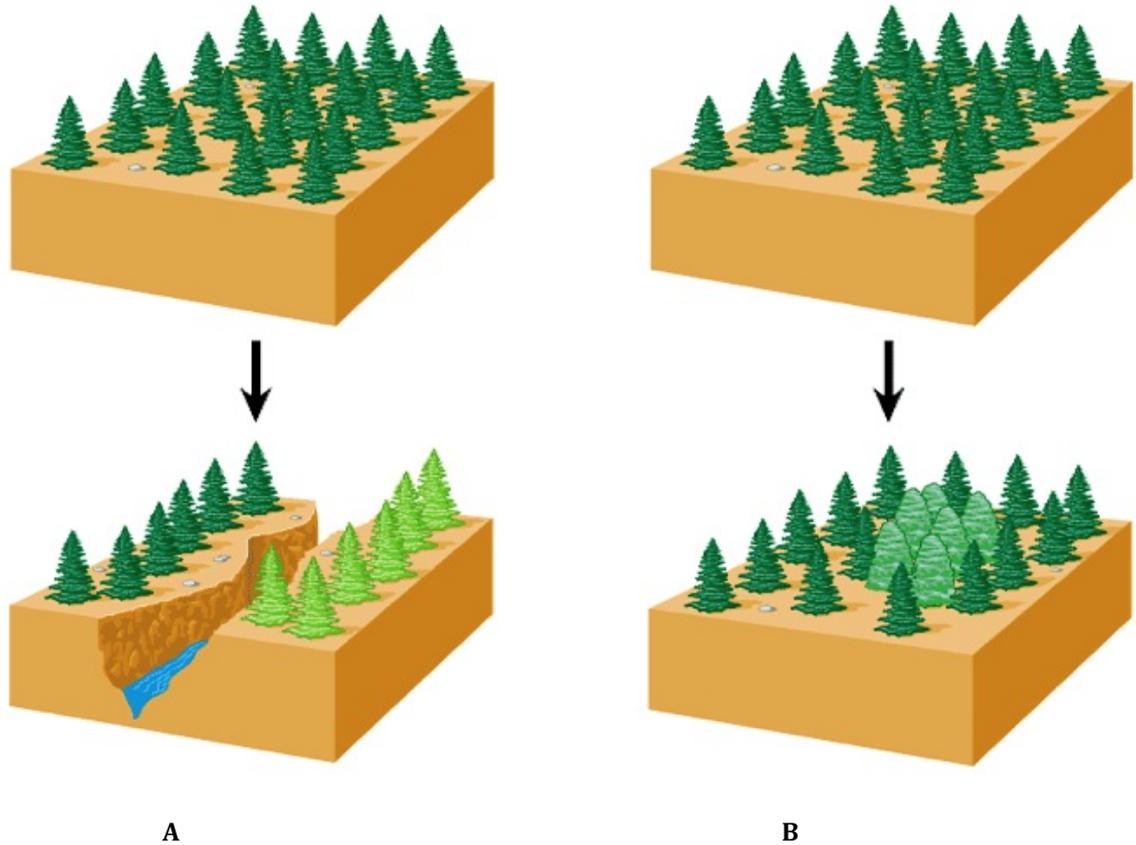


Figure 3: A) Spéciation allopatrique, B) Spéciation en sympatrie¹

3.4. La spéciation est la conséquence d'un isolement reproducteur ?

L'apparition de nouvelles espèces implique la mise en place d'un mécanisme conduisant les sous-populations à ne plus échanger leurs gènes. Ce mécanisme s'appelle isolement reproducteur. On distingue deux types d'isolement reproducteur selon le moment du cycle de vie : isolement reproducteur pré ou post-zygotique.

Un isolement post-zygotique intervient après la formation des zygotes (Coyne & Allen Orr, 1998, Noor & Feder, 2006). Ce mécanisme a des conséquences soit sur la viabilité des hybrides (la fécondation a eu lieu mais elle n'est pas suivie par le développement

¹ (Person Education, InC., publishing as Benjamin Cummings).

Introduction générale

embryonnaire), soit sur la stérilité de la descendance. Chez les champignons, l'isolement reproducteur post-zygotique est observé dans des croisements entre deux espèces différentes où les organes sexués formés sont stériles (exemple : des apothécies qui sont vides d'ascospores).

L'isolement reproductif pré-zygotique intervient avant la fécondation. Il est conditionné par plusieurs facteurs tels que l'environnement et la niche écologique.

4. Le genre *Botrytis*.

Le genre *Botrytis* appartient à la famille des *Sclerotiniaceae* (Jarvis, 1977), l'ordre des *Helotiales*, classe des *Leotiomycetes*, sous division des *Peziomycotinia*. Il s'agit des nécrotrophes, provoquant la mort cellulaire de la cellule hôte cible, souvent associé à un cycle saprophyte où le champignon se développe sur des débris végétaux.

Le genre *Botrytis* est parmi les premiers genres décrits chez les champignons par Micheli en 1729. Hennebert (1960, 1973) a réétudié le genre *Botrytis* en se basant sur le critère morphologique (critères d'état des conidies : prolifération des conidiophores, forme des conidies, couleur de la masse des spores). Il a identifié 22 espèces de *Botrytis* (Hennebert, 1973). Puis, elles ont été établies par Staats (Staats *et al.*, 2005). Il a réalisé une étude phylogénétique basée sur des séquences des gènes codant pour les protéines RPB2 (DNA-directed RNA polymerase II subunit), G3PDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) et HSP60 (Heat shock proteins). Selon son arbre phylogénétique, deux clades majeurs peuvent être distingués dans le genre *Botrytis*. Ils sont séparés par une valeur importante de bootstrap. Le clade 1 est constitué de cinq espèces (Figure 4) *B. calthae*, *B. fabae*, *B. cinerea* et *B. pelargonii* (Staats *et al.*, 2005). Le clade 2 (Figure 4) est subdivisé en cinq sous-clades contenant 18 espèces. Les résultats phylogénétiques confirment la classification morphologique classique (Staats *et al.*, 2005).

Introduction générale

Les études réalisées par Staats ont montré par ailleurs, que *B. allii* est une espèce hybride entre deux espèces parentales *B. aclada* et *B. byssoidea* (un exemple de spéciation par hybridation). Le profil de restriction des gènes (*hsp60*, *g3pdh*, *rbp2*) et leur séquençage démontrent la présence de trois ou quatre allèles selon les souches de *B. allii*. Les allèles hybrides contiennent des parties originaires des deux espèces parentales (Figure 5).

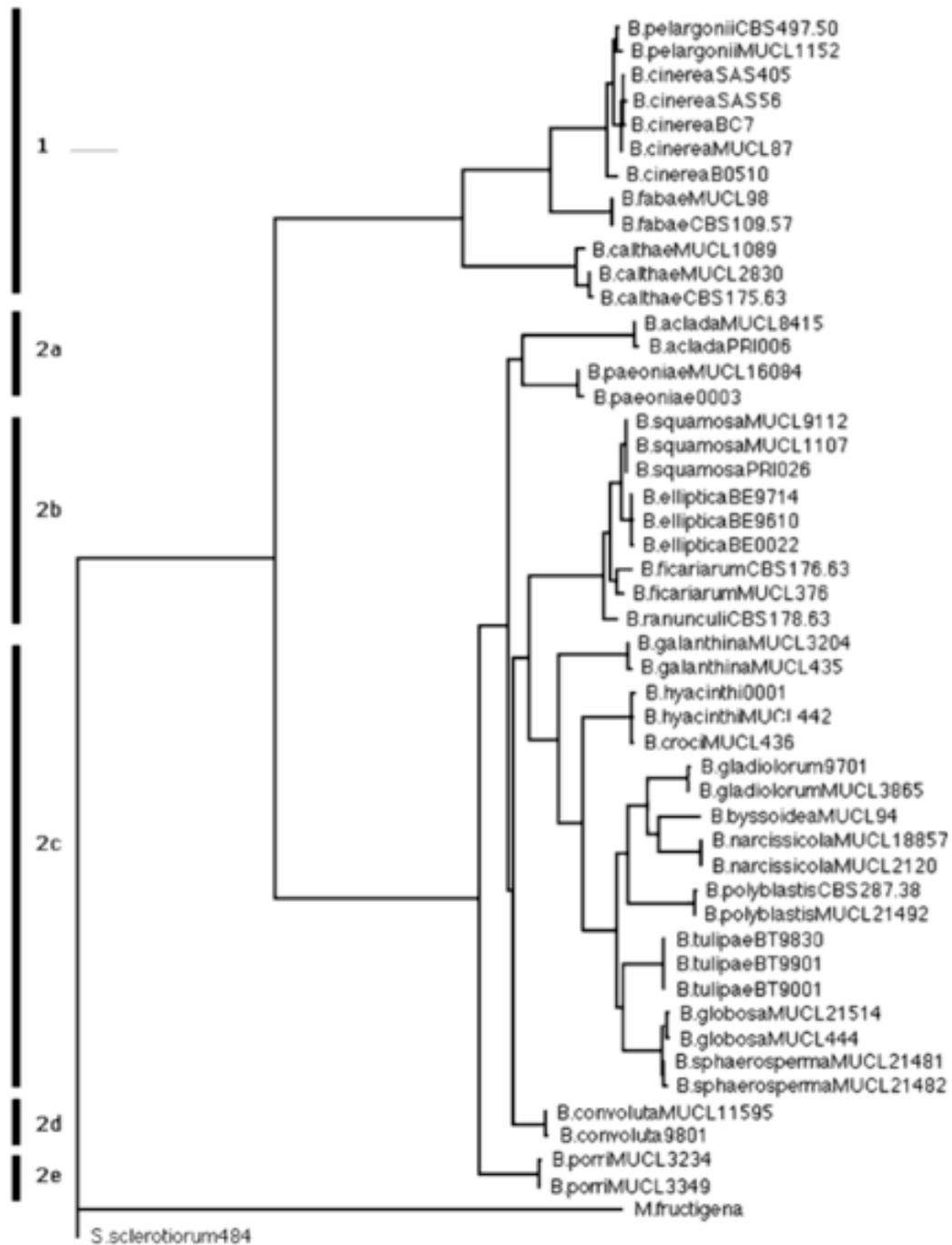


Figure 4 : Arbre phylogénétique montrant les deux clades du genre *Botrytis*. (Arbre obtenu par des méthodes Bayésiennes basés sur les consensus semi-strictes des gènes *rpb2*, *g3pdh*, *hsp60*) (Staats et al., 2005).

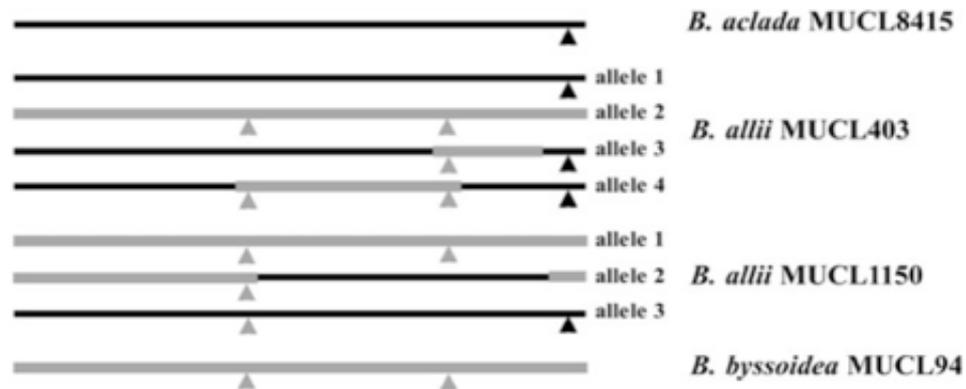


Figure 5: Schéma représentant des allèles de *B. allii* recombinant entre les gènes parentaux de *B. aclada* et *B. byssoidea*. Les lignes noires et grises indiquent les fragments des séquences polymorphes de *B. aclada* et *B. byssoidea*. Les flèches noires et grises indiquent les sites restriction par l'enzyme *EcoRV* (Staats et al., 2005).

4.1. Adaptation à l'hôte chez le genre *Botrytis*.

Le genre *Botrytis* comprend deux espèces polyphages. *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* (voir paragraphe 4.2) capables d'infecter plusieurs plantes hôtes, alors que les autres espèces de *Botrytis* sont considérées comme des spécialistes. Elles infectent une plante hôte ou quelques plantes hôtes de la même famille (Mansfield, 1980) (Tableau 1).

La comparaison de l'arbre phylogénétique de la famille des angiospermes et celui du genre *Botrytis* a montré que les espèces de *Botrytis* affectant la même famille de plantes hôtes ne se trouvent pas dans le même clade. A titre d'exemple, la famille des *Ranunculaceae* peut être infectée d'une part par *B. calthae* (clade I) (Figure 4), et d'autre part par les deux espèces *B. ficariarium* et *B. ranunculi* (clade II). Ceci révèle que la co-spéciation est limitée entre le genre *Botrytis* et les espèces hôtes (Figure 6). Staats et al (2005) suggèrent que plusieurs plantes hôtes ayant un lien au cours de la spéciation, peuvent expliquer la topologie actuelle.

La vérification de cette hypothèse nécessite des données sur la distribution géographique des différentes espèces de *Botrytis*, des données sur les fossiles des espèces du genre *Botrytis*,

Introduction générale

ainsi que des données sur la dynamique des populations à grande échelle. Ces études permettront de tracer l'historique évolutive du genre *Botrytis* (Staats et al., 2005).

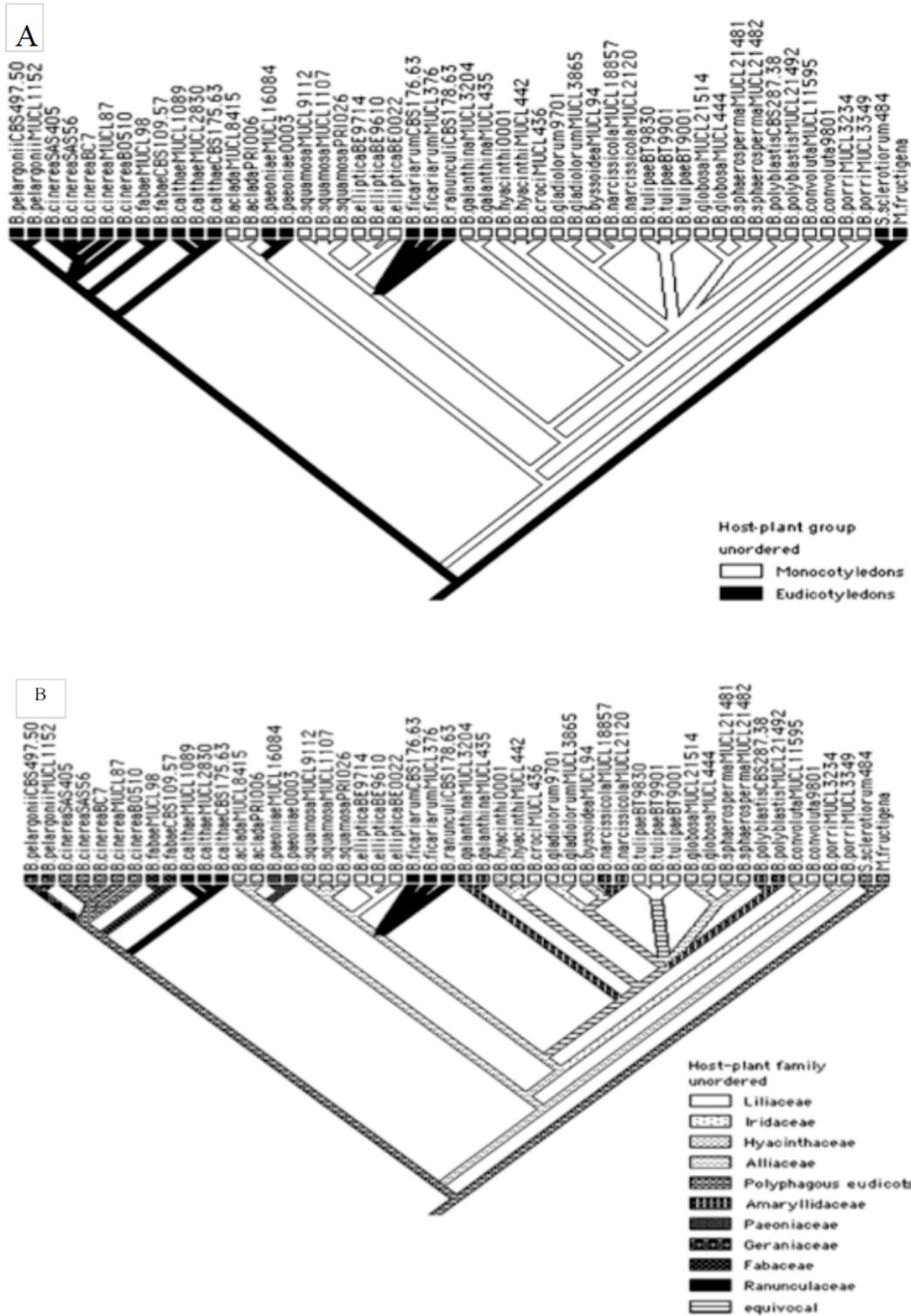


Figure 6 : Relation hôte-pathogène chez le genre *Botrytis*. A) : Topologie des espèces de *Botrytis* en fonction du groupe de plantes qu'elles infectent. Les espèces de *Botrytis* du clade I attaquant des plantes monocotylédones et les espèces du clade II attaquant des plantes dicotylédones ou monocotylédones. B) : Topologie des espèces de *Botrytis* en fonction des familles botaniques qu'elles infectent (Staats et al., 2005).

4.2. Les nouvelles espèces du genre *Botrytis*.

En 2005, les études réalisées par Staats ont permis d'identifier 22 espèces et une espèce hybride. Puis d'autres études ont révélé la présence de nouvelles espèces de *Botrytis*.

La différence entre deux espèces formant un complexe d'espèce permet de comprendre l'histoire évolutive de deux espèces. L'espèce *B. cinerea* est la meilleure des cas pour illustrer cela. *B. cinerea* a été pendant longtemps considéré comme une espèce monomorphe. Giraud et collaborateurs (Giraud *et al.*, 1999) ont identifié deux groupes en se basant sur la présence d'éléments transposables, le premier est constitué de *B. cinerea. vacuma* (absence des éléments transposables), le deuxième groupe comprend *B. cinerea. transposa* qui contient au moins l'un des éléments transposables (*boty* et/ou *flipper*). Des études menées par Fournier *et al.* ont permis de classer *B. cinerea* en deux groupes. Le groupe I contiendrait uniquement *B. cinerea var. vacuma* et le groupe II renferme l'espèce *B. cinerea var. vacuma* et *Botrytis var. transposa*. Cela révèle que le critère des éléments transposables utilisés pour classer l'espèce *B. cinerea* n'est pas fiable (Fournier *et al.*, 2005, Fournier *et al.*, 2002).

- *B. pseudocinerea* : est-elle une nouvelle espèce ?

Walker et collègues (2012) ont réalisé la caractérisation fine des deux groupes I et II selon les critères d'espèces : morphologique, phylogénétique, écologique et biologique. L'étude morphologique des conidies (diamètre, surface) des deux groupes I et II ainsi que leur taux de sporulation n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes (Figure). Par conséquent aucun critère morphologique ne permet de différencier les souches du groupe I des souches du groupe II.

Introduction générale

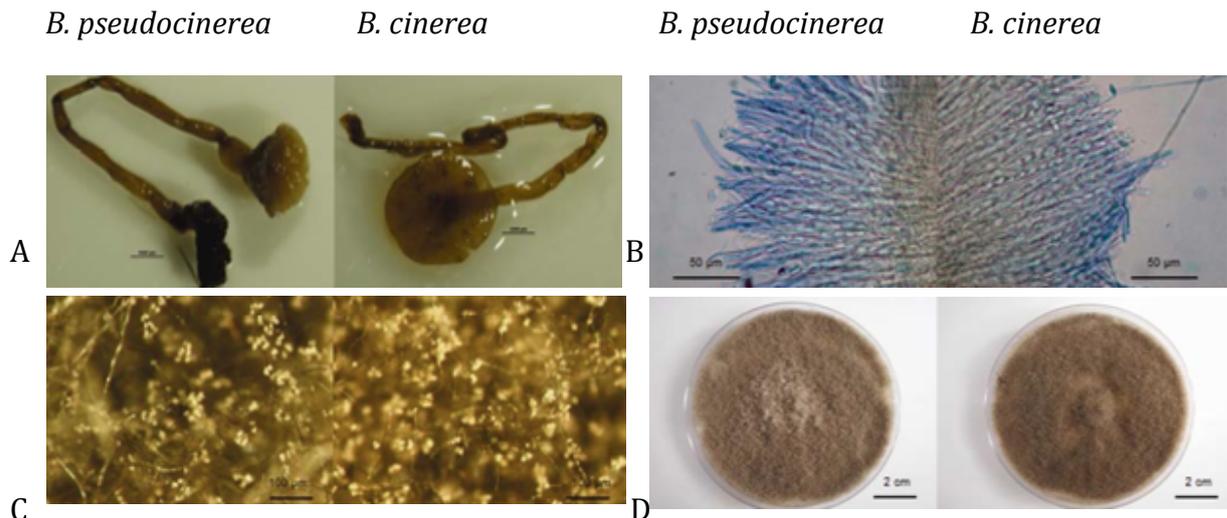


Figure 7 Caractéristiques morphologiques des espèces *B. pseudocinerea* et *B. cinerea*. **A** : Apothécie, **B** : des asques contenant des ascospores, **C** : Sporulation mycélienne et **D** : Culture *in vitro* sur un milieu synthétiques (Walker et al., 2011).

Le critère biologique a mis en évidence la présence d'une barrière empêchant la reproduction entre les deux espèces. Les croisements entre des souches du groupe I et des souches du groupe II ne produisent pas d'apothécies viables, tandis que les croisements intra-groupe donnent naissance à des apothécies viables. Ceci suggère que les souches du groupe I forment une espèce indépendante des souches du groupe II.

Le critère écologique a montré que les souches des deux groupes partagent la même niche écologique mais avec de probables préférences saisonnières sur vigne, les souches du groupe I sont toujours minoritaires dans les populations mais elles sont plus abondantes au printemps (mois de juin) qu'à la vendange. Au printemps, cette espèce est abondante sur les pièces florales senescentes. En ce qui concerne la pathogénicité réalisée sur feuilles d'haricot et feuilles de tomate, les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux espèces.

L'étude phylogénétique a été basée sur l'analyse des trois gènes *g3pdh*, *hsp60* et *ms547*. L'analyse combinée de l'arbre phylogénétique des trois gènes a révélé que les souches du groupe I se regroupent dans un cluster monophylétique (Figure 8) avec une valeur de Bootstrap de 100% indépendantes des souches du groupe II.

Introduction générale

Ces études ont montré qu'il s'agissait de deux espèces distinctes. Le nom de *Botrytis pseudocinerea* a été attribué aux souches du groupe I, tandis que les souches du groupe II garde le nom *Botrytis cinerea* (Figure 8). On estime que la spéciation entre les deux espèces s'est déroulée il y a 7 à 8 millions d'année et que la barrière reproductrice est due à un isolement prézygotique (Walker *et al.*, 2011).

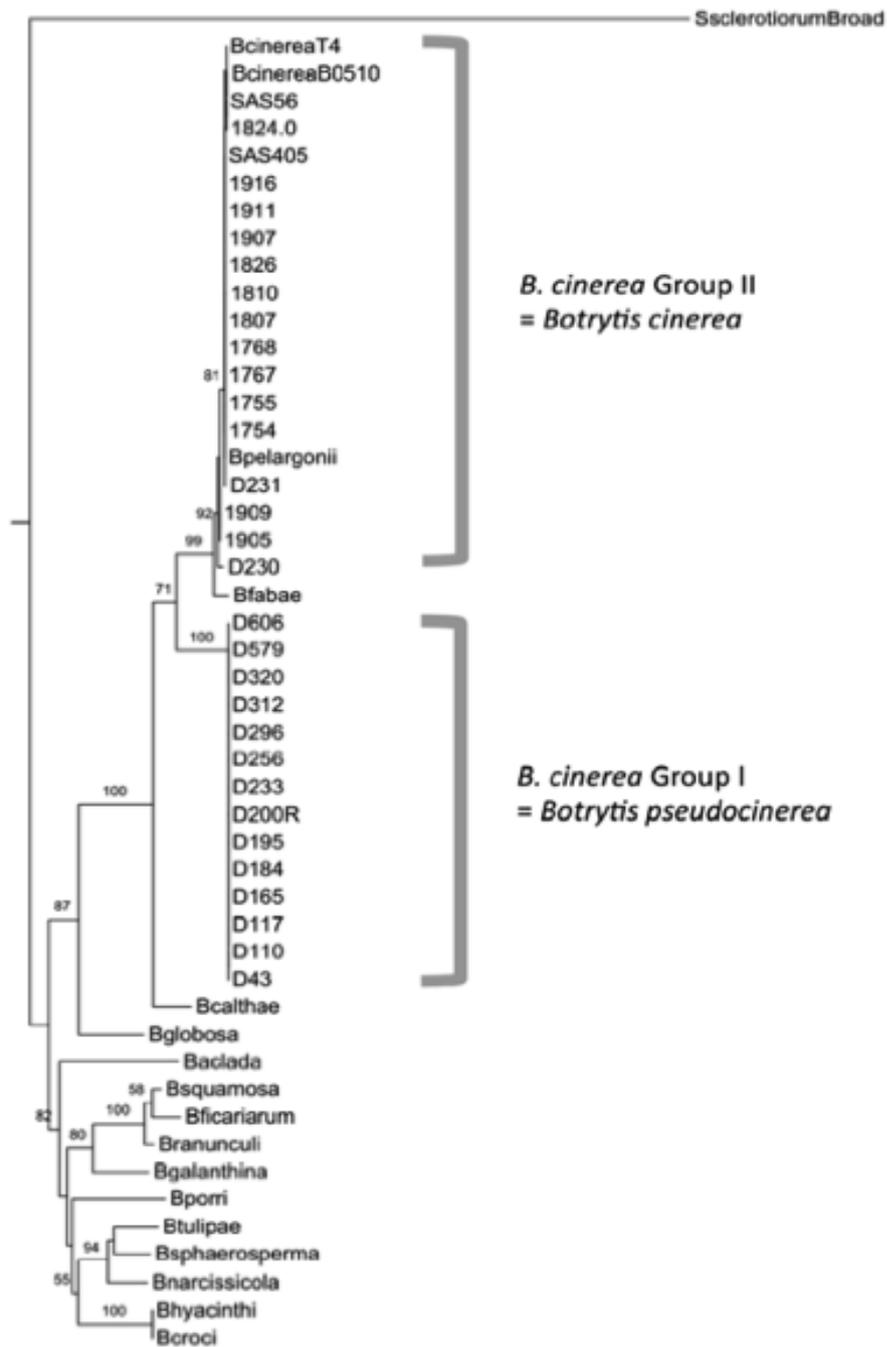


Figure 8 : Position phylogénétique de *Botrytis pseudocinerea* dans le genre *Botrytis*.

L'arbre concaténé a été construit par la méthode de maximum de vraisemblance (à partir des séquences des gènes *g3pdh*, *hsp60* et *ms547*). Les valeurs de bootstrap >50% (après 100 répliquions) sont indiquées au dessus des branches (Walker et al., 2011).

Introduction générale

- Le groupe S est-elle une nouvelle espèce ?

L'étude de la diversité génétique des populations de pourriture grise infectant le fraisier a montré que les isolats sont différents génétiquement de ceux isolés sur vigne (Leroch *et al.*, 2013).

Ces isolats présentent un profil de résistance multiple aux fongicides original. Ce phénotype de résistance multidrogue (MDR1h) détermine de niveaux de résistance supérieure à ceux connus pour le phénotype similaire MDR1 des isolats collectés sur vigne. Par ailleurs, le séquençage du gène *mrr1*, responsable du phénotype MDR1, (voir chapitre de résistance) chez des isolats MDR1h a révélé de nombreuses modifications génétiques (indels et SNPs) par rapport à *B. cinerea* sur vigne (Figure 9).

L'analyse phylogénétique de cinq gènes (*fg1020*, *ms547*, *hsp60*, *nep2*, *mrr1*) chez les espèces du clade I (*B. cinerea*, *B. fabae*, *B. pseudocinerea*, *B. calthae*) ne permet pas de statuer sur des nouvelles espèces car les topologies des différents gènes ne sont pas congruentes. Il semble cependant que cette entité soit proche de *B. fabae*. Ces isolats sont répertoriés dans un nouveau groupe nommé Botrytis groups S (pour « Strawberry») (Leroch *et al.*, 2013) (Figure 10).



Figure 9 : Comparaison de la région codante du gène *mrr1* chez *B. cinerea* et Botrytis groupe S. Les insertions sont indiquées par un numéro précédé d'un (+), les délétions sont indiquées par un numéro précédé d'un (-). Les délétions sont représentées par ΔL497 et ΔF570. (Selon Leroch *et al.*, 2013).

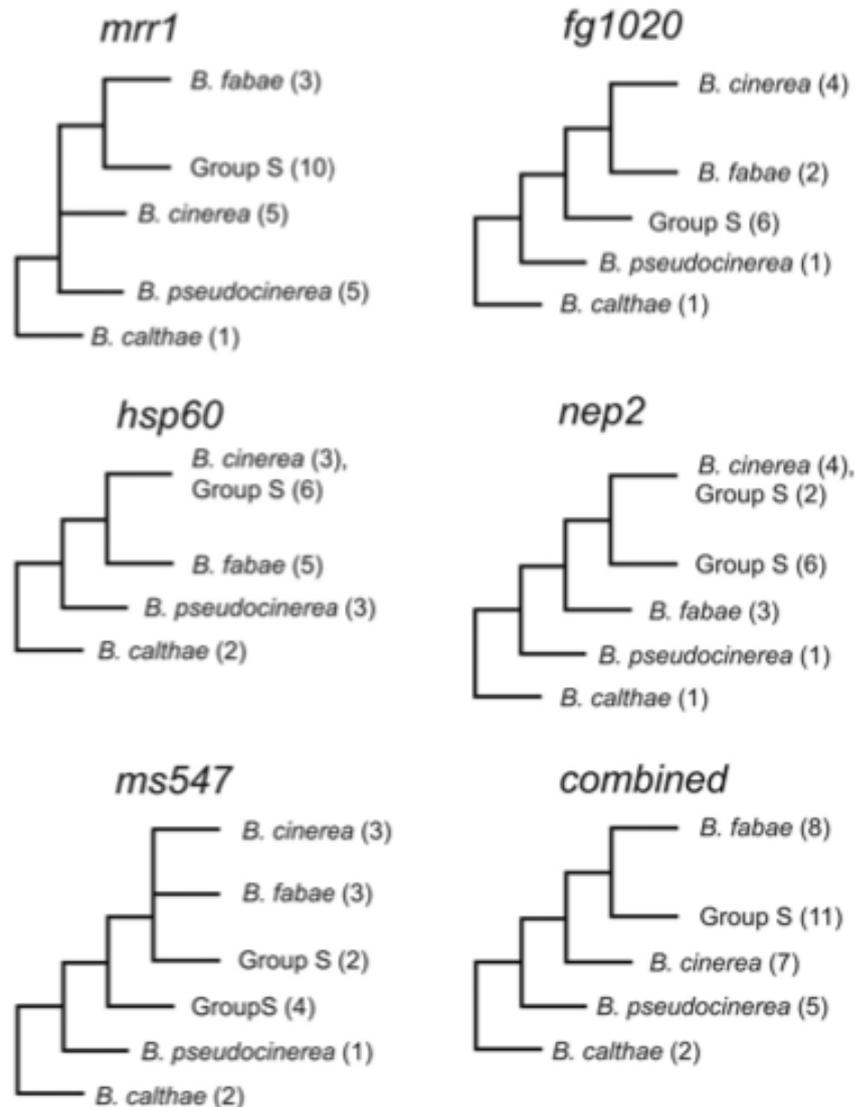


Figure 2 : Phylogénie du clade I établie avec les gènes (*mrr1*, *fg1020*, *hsp60*, *nep2* et *ms547*) et incluant l'entité *Botrytis* groupe S.

Les cladogrammes des cinq gènes ont été réalisés par la méthode de maximum de vraisemblance. Le cladogramme concaténé représente l'analyse combinée des cinq gènes. Les branches aux des valeurs de bootstrap inférieur de 70% ont été regroupées. Les numéros entre les parenthèses représentent le nombre de spécimens par clade (Leroch et al., 2013).

Botrytis groupe S est majoritaire dans les populations de pourriture grise isolées sur fraisiers.

Pour consolider la position taxonomique du groupe S, il faut envisager de séquencer d'autres gènes, étudier la diversité des populations de *B. cinerea* dans différentes régions du continent

Introduction générale

européen et de réaliser des croisements entre des souches du groupe S et *B. cinerea* pour vérifier l'existence d'une barrière inter-espèce.

- *Botrytis sinoallii* : une nouvelle espèce pathogène provoquant la pourriture grise des plantes du genre *Allium* en Chine.

Le genre *Allium* fait partie des monocotylédones, incluant entre autres les oignons, les oignons verts, les aulx et les ciboulettes. Ces cultures ont un intérêt économique important en Chine. La maladie de la pourriture grise est parmi les facteurs limitant la culture de ces plantes. Hennebert a identifié sept espèces de *Botrytis* (*B. aclada*, *B. byssoidea*, *B. cinerea*, *B. porri*, *B. globosa*, *B. squamosa*, *B. sphaerosperma*) provoquant cette maladie chez les plantes du genre *Allium* (Hennebert, 1963).

En 2006, des études morphologiques réalisées sur des souches collectées sur oignon, oignon vert, ail et ciboulette ont permis d'identifier quatre souches appartenant à *Botrytis spp* non définies. Ces dernières se caractérisent par une production abondante des petites sclérotés.

La comparaison des trois gènes *g3pdh*, *hsp60* et *rpb2* chez plusieurs espèces *Botrytis* ainsi que leurs analyses phylogénétiques ont montré que les souches non définies de *Botrytis spp* constituent un clade monophylétique indépendant des autres espèces appartenant à une nouvelle espèce, nommée *Botrytis sinoallii* (Zhang *et al.*, 2010b).

Botrytis sinoallii est plus proche phylogénétiquement de *B. ranunculi*, *B. ficariarum*, *B. elliptica* et *B. squamosa* (Figure 11). En revanche, *B. sinoallii* est différente morphologiquement de ces espèces et ne partage pas la même niche écologique. *B. elliptica* infecte des plantes hôtes du genre *Lilium spp*, alors que *B. sinoallii* infecte les plantes du genre *Allium*. La fréquence de cette espèce dans les populations de pourriture grise reste faible par rapport à *B. cinerea* et *B. squamosa*.

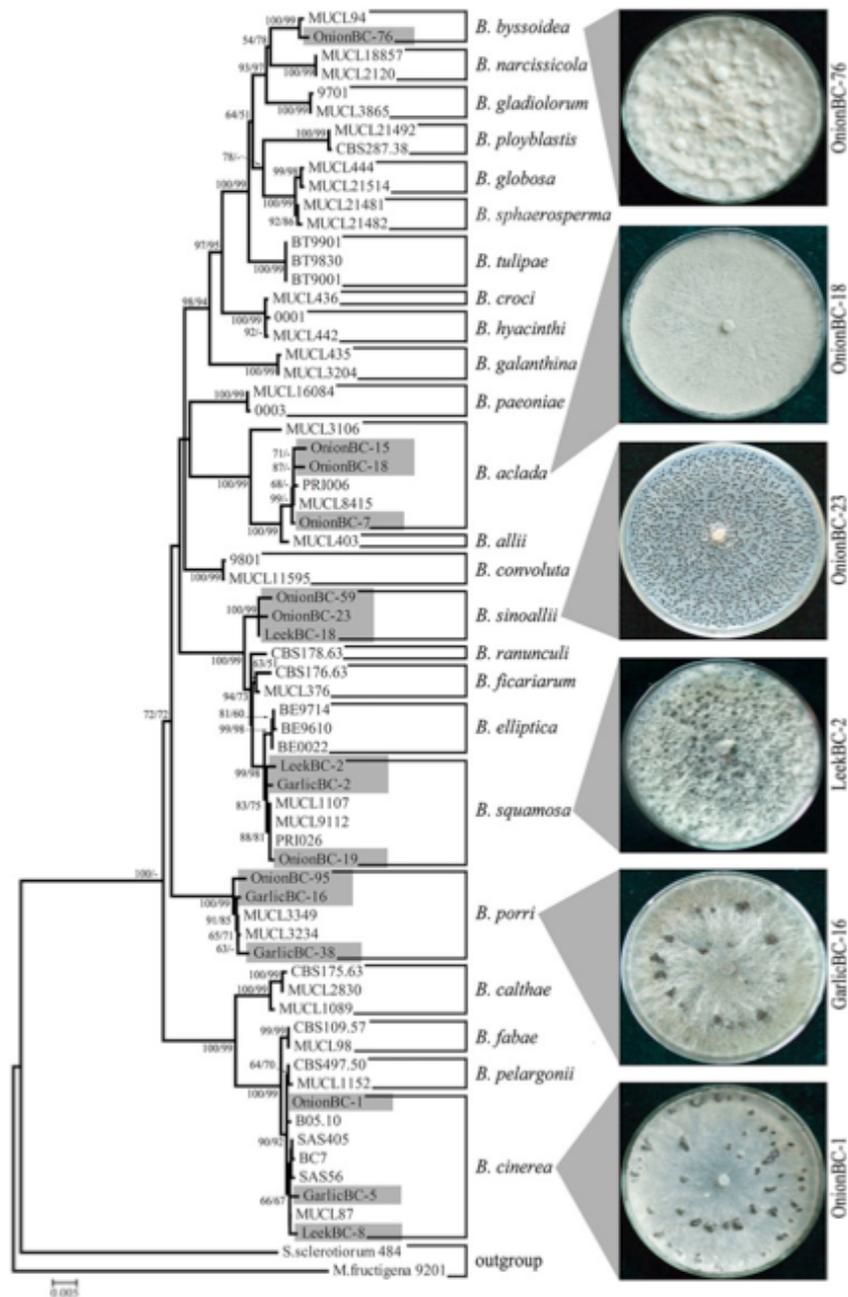


Figure 3: La phylogénie du genre *Botrytis*, incluant la nouvelle espèce *B. sinoallii*. (analyses combinées des données de trois gènes *g3pdh*, *hsp60* et *rpb2* séquencés chez 66 souches de *Botrytis* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Monilia fructigena* utilisées comme ‘out-group’). Les valeurs au niveau des nœuds représentent les valeurs de bostrap (N=1000). La longueur des branches est proportionnelle aux nombres de substitutions de nucléotides telle qu’elle est mesurée par la barre d’échelle (0,5% divergence de séquence) (Zhang et al., 2010b).

Ces résultats suggèrent que *B. sinoallii* forme une nouvelle espèce; ils restent cependant insuffisants : des tests de croisements intra et inter-espèce pourraient permettre de mettre en évidence un isolement reproducteur entre *B. sinoallii* et les autres espèces de *Botrytis*. Le séquençage d’autres gènes pourrait confirmer la position taxonomique de l’espèce *B. sinoallii*.

Introduction générale

Enfin, la niche écologique de *B. sinoalli* reste à préciser, par rapport aux autres espèces infectant *Alium sp* (Zhang et al., 2010b).

- *Botrytis fabiopsis* : Une nouvelle espèce provoquant la maladie des tâches de chocolat chez la fève ?

Les fèves (*Vicia fabae*) sont des plantes annuelles légumineuses de la famille des *Fabacées*. Ces plantes représentent un intérêt économique et nutritionnel important. La maladie des tâches de chocolat est parmi les maladies qui infectent les fèves. Au moins deux espèces de *Botrytis* provoquent cette maladie. L'espèce majoritaire est *B. fabae* et l'espèce minoritaire est *B. cinerea*. Le suivi des populations de pathogènes infectant la fève a permis d'identifier des souches distinctes de l'espèce *B. fabae* et *B. cinerea*.

La caractérisation morphologique a révélé que sur la totalité des souches isolées, *B. cinerea*, *B. fabae* et *Botrytis spp* représentent 9,8%, 53,8% et 36,4% respectivement. *Botrytis spp* se caractérise par un mycélium aérien gris-blanc et une faible production de sclérotés et partage donc des caractères phénotypiques avec *B. cinerea* et *B. fabae* (Zhang et al., 2010a).

L'analyse phylogénétique des trois gènes *g3pdh*, *hsp60* et *rpb2* a montré que les souches de *Botrytis spp* forment un cluster indépendant des autres espèces loin phylogénétiquement de *B. cinerea* et *B. fabae*, et plus proche de *B. galanthina* infectant la perce.neige (Figure 12). Des différences morphologiques ainsi que des séquences *nep1+nep2* entre *B. spp* et *B. galanthina* sont en accord avec l'hypothèse que *Botrytis spp* est une espèce indépendante de *B. cinerea*, *B. fabae* et *B. galanthina* nommée *Botrytis fabiopsis* (Zhang et al., 2010a).

Des résultats de test de pathogénicité ont montré des différences d'infection significatives. *B. cinerea* provoque des lésions plus grande que *B. fabae* et *B. fabiopsis*. Alors que les feuilles de fèves inoculées avec des conidies de *B. fabae* et *B. fabiopsis* développent des symptômes correspondant bien à la maladie des tâches de chocolat (Zhang et al., 2010a).

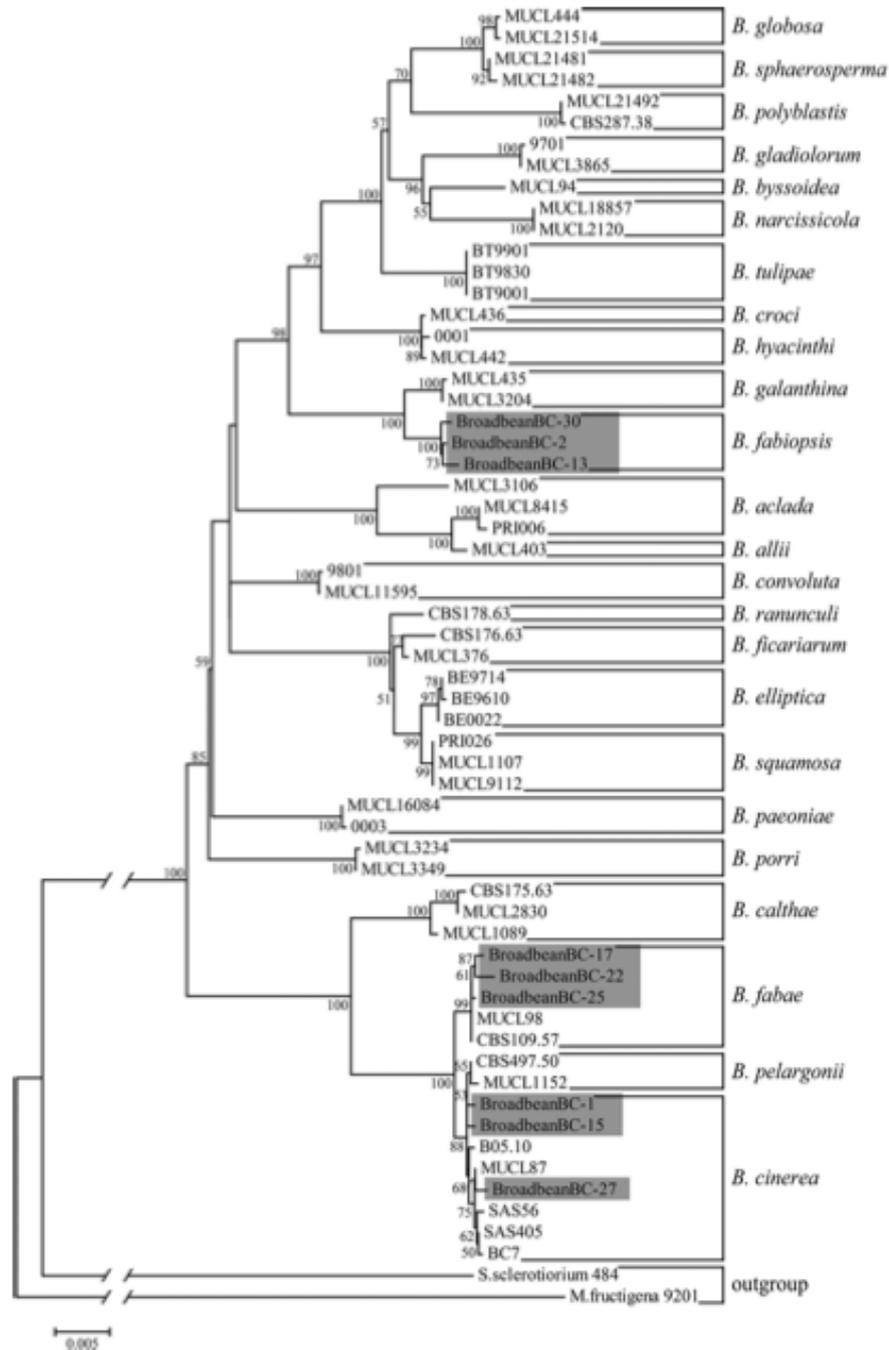


Figure 12: Phylogénie moléculaire de 61 souches de *Botrytis spp.*, *Monilia fructigena* et *Sclerotinia sclerotinium* présentés par un arbre neuburg join (NJ) déduit de l'ensemble de données contenant des séquences d'ADN combinées de *g3pdh*, *rpb2* et *hsp60*. le pourcentage de bootstraap (N = 1 000) est inscrit sur chaque noeud. La longueur des branches est proportionnelle aux nombres de substitutions de nucléotides, mesurées par la barre d'échelle (0,5% divergence de séquence) (Zhang et al., 2010).

Trois critères d'espèces (morphologique, phylogénétique et écologique) ont été utilisés pour définir la nouvelle espèce *B. fabiopsis*. Deux critères sur les trois utilisés favorisent l'idée que

Introduction générale

B. fabiopsis est une nouvelle espèce, tandis que le critère écologique a montré que *B. fabiopsis*, *B. cinerea* et *B. fabae* partagent la même niche écologique.

Pour confirmer que *B. fabiopsis* est une nouvelle espèce, il faudrait réaliser des croisements dans le but de vérifier la présence d'une barrière inter-espèce.

En utilisant les différents critères de définitions d'espèces (Critère biologique, phylogénétique, morphologique, écologique), on constate que le nombre d'espèces appartenant au genre *Botrytis* a augmenté ces dernières années. Selon Staats (Staats et al., 2005), le genre *Botrytis* contenait 22 espèces et une espèce hybride. Alors qu'actuellement le genre *Botrytis* est constitué de 25 espèces et une espèce hybride (Tableau 1). Ce genre renferme plusieurs espèces qui vivent en sympatrie comme le complexe d'espèce : *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* ou le complexe d'espèces *B. fabae* et *B. fabiopsis*.

Dans le chapitre suivant, nous nous focaliserons sur la biologie de *B. cinerea*. Pour comprendre le cycle biologique ainsi que ses mécanismes d'infection. Nous supposons que les caractéristiques biologiques de *B. pseudocinerea* sont similaires.

Introduction générale

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des espèces de *Botrytis* identifiées jusqu'en 2013, incluant le nom des maladies, la forme sexuée, les plantes hôtes (Tableau de Staats et al., 2005 modifié).

Espèces	Nom de la maladie	Mode de reproduction sexuée	Plantes hôtes (Famille des plantes hôtes)	Références
<i>B. cinerea</i>	Pourriture grise	Hétérothallique	>235 espèces de plantes Polyphage (majoritairement des dicots)	Person, 1832
<i>B. aclada</i>	Pourriture grise du col	n.d	<i>Allium</i> (<i>Alliaceae</i>)	Yohalem, 1850
<i>B. allii</i>	Pourriture grise du col	n.d	<i>Allium</i> (<i>Alliaceae</i>)	Yohalem, 1850
<i>B. galanthina</i>		n.d	<i>Galanthus nivalis</i> (<i>Amaryllidaceae</i>)	Berk & Broom, 1886
<i>B. croci</i>	Brûlure du crocus	n.d	<i>Crocus</i> (<i>Iridaceae</i>)	Cooke & Masse 1887
<i>B. paeoniae</i>	Pourriture grise de la Pivoine	Hétérothallique	<i>Paeonia</i> (<i>Paeoniaceae</i>)	Oud, 1897
<i>B. elliptica</i>	Brûlure botrytique du Lys	Hétérothallique	<i>Lilium</i> (<i>Liliaceae</i>)	Cooke, 1901
<i>B. tulipae</i>	Brûlures de la tulipe .	n.d	<i>Tulipa</i> (<i>Liliaceae</i>)	Lind, 1913
<i>B. byssoidea</i>	Pourriture du col	Hétéro-	<i>Allium</i> (<i>Alliaceae</i>)	Walker, 1925
<i>B. squamosa</i>	Brûlure de la feuille de l'oignon	Hétéro-thallique	<i>Allium cepa</i> (<i>Alliaceae</i>)	Walker, 1925

Introduction générale

<i>B. hyacinthi</i>	Feu des jacinthes	n.d	<i>Hyacinthus liliaceal</i> (<i>Hyacinthaceae</i>)	Westerd & Beyma 1928
<i>B. narcissicola</i>	Moisissure du narcisse	Hétérothallique	<i>Narcissus.</i> (<i>Amaryllidaceae</i>)	Kleb, 1928
<i>B. fabae</i>	Tâches de chocolat	n.d	<i>Vicia., Pisum., Lens., Phaseolus vulgaris</i> (<i>Fabaceae</i>)	Sardina, 1929
<i>B. convoluta</i>	Pourriture grise du rhizome	Hétérothallique	<i>Iris</i> (<i>Iridaceae</i>)	Whetzel & Drayton, 1932
<i>B. globosa</i>	Pourriture du col	Hétérothallique	<i>Allium ursinum</i> (<i>Alliaceae</i>)	Raabe, 1938
<i>B. gladiolorum</i>	Moisissures de freesia et glaïeul	Hétérothallique	<i>Gladiolus spp. L.</i> (<i>Iridaceae</i>)	Timm, 1941
<i>B. pelargonii</i>	ND	Hétérothallique	<i>Pelargonium spp. L</i> (<i>Geraniaceae</i>)	Roed, 1949
<i>B. porri</i>	ND	Hétérothallique	<i>Allium</i> (<i>Alliaceae</i>)	Buchw, 1949
<i>B. sphaerosperma</i>	Rouille de l'ail	Hétérothallique	<i>Allium triquetrum</i> (<i>Alliaceae</i>)	Buchw, 1949
<i>B. calthae</i>	n.d	Hétérothallique	<i>Caltha palustris</i> (<i>Ranunculaceae</i>)	Hennebert, 1963
<i>B. ranunculi</i>	n.d	Hétérothallique	<i>Ranunculus spp. L</i> (<i>Ranunculaceae</i>)	Hennebert, 1963
<i>B. ficariarum</i>	n.d	Hétéro- thallique	<i>Ficaria verna</i> (<i>Ranunculaceae</i>)	Hennebert, 1963

Introduction générale

<i>B. fabiopsis</i>	Tâches de chocolat	n.d	<i>Vicia spp. L., (Fabaceae)</i>	Zhang, 2010
<i>B. sinoallii</i>	Pourriture grise du col	n.d	<i>Allium spp (Alliaceae)</i>	Zhang, 2010
<i>B. pseudocinerea</i>	Pourriture grise	Hétérothallique	<i>Vigne, tomate, haricot et nombreux autres (polyphage)</i>	Walker, 2011

5. Cycle biologique de *Botrytis cinerea* :

Botrytis cinerea a une stratégie pathogène dite nécrotrophique. Il attaque les tissus vivants et induit leur mort, mais il est aussi capable de se développer sur les tissus morts (mode de vie saprophyte).

Le cycle infectieux de *B. cinerea* se caractérise par la production de conidies (spores asexuées). Elles peuvent être transportées par le vent sur de longues distances et elles forment la source d'inoculum primaire (Figure 13A). L'attachement des conidies à la surface de l'hôte passe par deux étapes distinctes : la première étape implique des forces d'adhésion faibles qui résultent d'interactions hydrophobes entre les conidies et la surface (Doss *et al.*, 1993). La deuxième étape sert à renforcer l'adhésion entre les conidies et la surface des tissus infectés. L'extrémité du tube germinatif produit une couche extracellulaire qui agit comme un adhésif à la surface de l'hôte. Cette couche protège aussi la conidie contre les mécanismes de défense de la plante (Doss *et al.*, 1995).

Une fois attachées à la surface des plantes, les conidies commencent le processus de germination. La germination (Figure 13B) constitue une étape fondamentale pour le développement du champignon. Le tube germinatif peut pénétrer l'hôte soit par les ouvertures naturelles des pétales, des sépales, des feuilles et des jeunes fruits, soit par des blessures, soit par le tissu intact (Clark & Lorbeer, 1977) (Elad, 1988). Divers auteurs ont observé un gonflement au niveau de l'extrémité de tube germinatif. Des études microscopiques et histologiques (Tenberge, 2004) montrent que *B. cinerea* produit une structure nommée pseudo-appressorium (Figure 13C) (Williamson *et al.*, 1995, Cole *et al.*, 1996). D'autres études ont montré que *B. cinerea* produit également des pseudo-appressoria multi-lobés, nommés coussins d'infection (Garcia-Arenal & Sagasta, 1980). Ces structures jouent un rôle

Introduction générale

dans l'initiation de l'infection car elles produisent plusieurs enzymes lytiques contribuant à la dégradation de la paroi et de la membrane cytoplasmique de la cellule végétale.

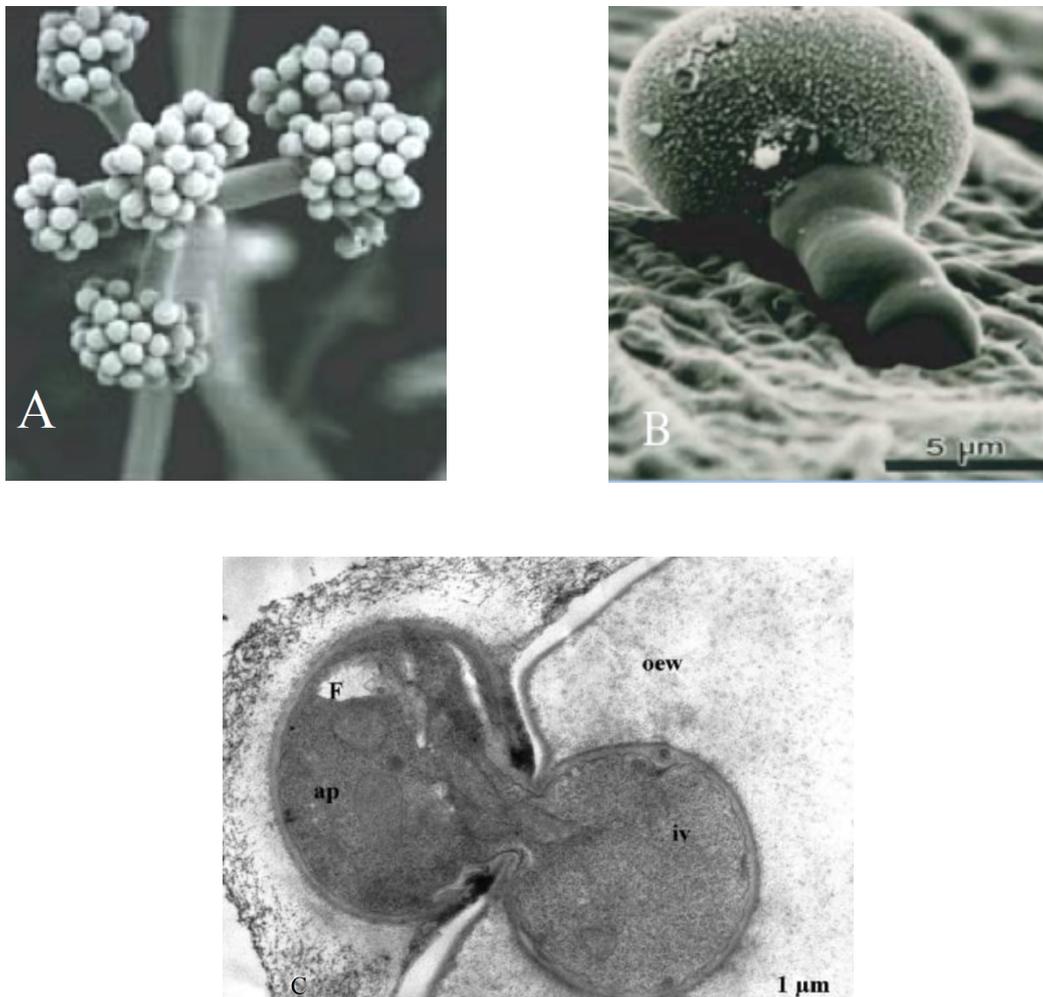


Figure 13 : Structures d'infection à partir des conidies de *B.cinerea*. A) Conidiophore de *Botrytis cinerea* avec des conidies matures. B) Germination d'une conidie à la surface d'un pétale d'une rose. C) Structure d'infection de *B. cinerea* sur feuille d'haricot. Pénétration de *B. cinerea* dans la paroi externe de l'épiderme de la feuille après 12h d'inoculation. (ap) appressorium, (oew) paroi externe de l'épiderme. Iv : vésicule d'infection (Tenberge, 2004); (Williamson et al., 2007).

B. cinerea tue les cellules de la plante hôte en produisant divers phytoalexines (botcinolide (Cutler *et al.*, 1993), botrydial et des sesquiterpènes tricycliques (Colmenares *et al.*, 2002b), de l'acide oxalique (Dutton & Evans, 1996) et des espèces réactives d'oxygène (ROS).

(ROS : super-oxyde, des radicaux hydroxyliques et du peroxyde hydrogène). Après la mort des cellules végétales, les hyphes colonisent le tissu végétal. En contact avec l'air et sous l'influence de la lumière, les hyphes vont produire des conidiophores porteurs de conidies qui

Introduction générale

sont dispersées par le vent et la pluie et qui vont provoquer un nouveau cycle d'infection. ce Cycle est très court et ne dure que quelques jours (6 à 7 jours). *B. cinerea* est sous forme haploïde pendant ce cycle sur le végétal.

En dehors de ce cycle asexué, *B. cinerea* peut également se reproduire en passant par un cycle sexuel. Il est hétérothallique possédant un seul locus sexuel avec deux allèles *mat1-1* et *mat1-2* (Faretra *et al.*, 1988, Amselem *et al.*, 2011b). Le cycle sexuel de *B. cinerea* nécessite deux isolats sexuellement compatibles de mating types différents (*mat1-1* et *mat1-2*). Les sclérotes produisent des ascogones (gamètes femelles). Les microconidiophores produisent les microconidies (gamètes mâles). La fusion entre les ascogones et les microconidies suivie d'une division méiotique et d'une mitose conduit à la formation des apothécies (Beever & Weeds, 2007) contenant des asques à 8 ascospores. Ces ascospores produisent après germination le mycélium de la recombinaison sexuelle. Le cycle sexuel est facilement réalisable au laboratoire mais il est rarement détecté dans la nature (Figure 15). Cependant, elle joue un rôle important dans la diversité génétique de *B. cinerea*.

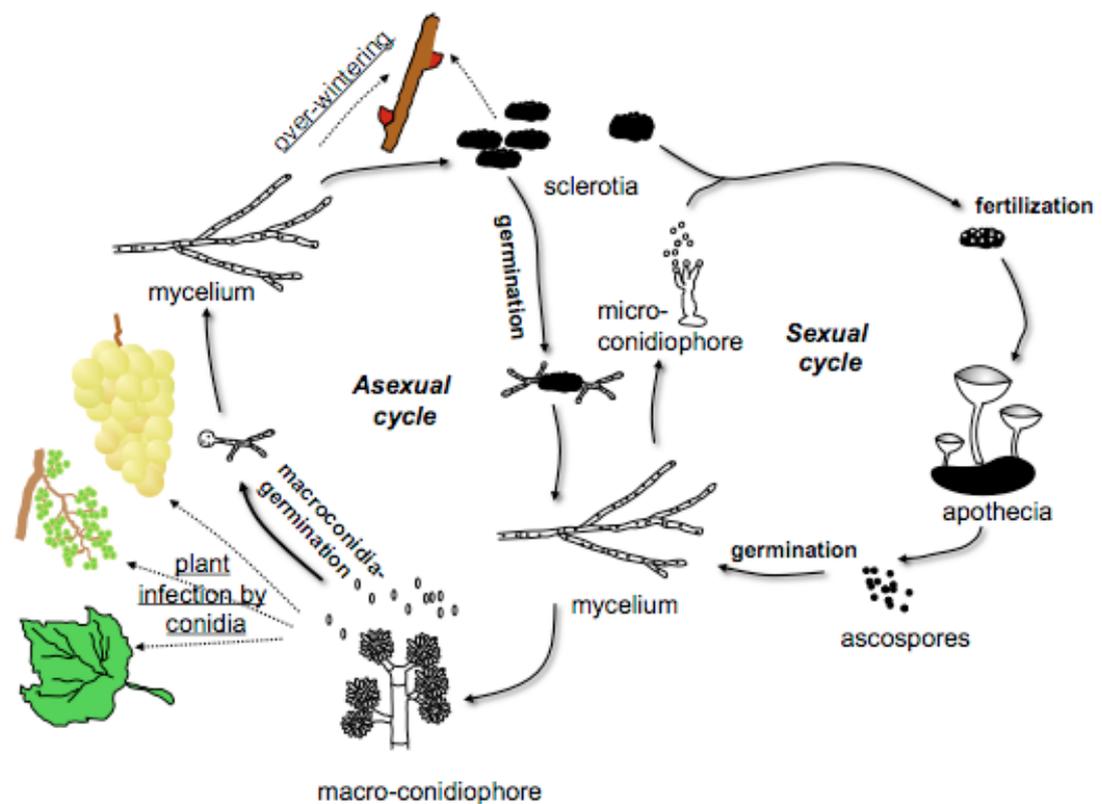


Figure 4 : Cycle de vie de *B. cinerea*. (Fillinger et al., 2007)

6. Mécanismes moléculaires de l'infection

Des études moléculaires et biochimiques ont révélé l'implication d'un certain nombre de protéines (facteurs) dans le processus infectieux. Nous en détaillons les principaux dans les paragraphes suivants.

6.1. Dégradation et pénétration de la paroi cellulaire.

La pénétration des tissus végétaux nécessite la production d'une protéine membranaire nommée tétraspanin Bcpls1 (Gourgues *et al.*, 2004) et d'enzymes lytiques pour dégrader la paroi (Cell Wall Degrading Enzymes, CWDE). Deux types d'enzymes ont été identifiés, les

Introduction générale

cutinases et les lipases. Les simples mutants *ΔcutA* et *Δlip1* ainsi qu'une inactivation de ces deux gènes n'affectent pas le pouvoir pathogène de *B. cinerea* (van Kan *et al.*, 1997, Reis *et al.*, 2005). Le séquençage du génome de *B. cinerea* a montré l'existence de cinq autres gènes de cutinases et douze gènes lipases, (van Kan *et al.*, 2006). Il est probable que ces gènes aient des fonctions redondantes expliquant l'absence de phénotype des mutants *ΔcutA* et *Δlip1* et *ΔcutAΔlip1*

Après la dégradation de la cuticule, *B. cinerea* occupe l'espace périplasmique de l'épiderme végétal. Ce dernier est composé de pectines. C'est pour cela que *B. cinerea* sécrète des enzymes à activité pectinase. La première famille est celle des pectine-méthyl estérases (PME) (Reignault *et al.*, 2008, Valette-Collet *et al.*, 2003)(Reignault *et al.*, 2008, Valette-Collet *et al.*, 2003) qui servent à dégrader les pectines riches en méthyl (Reignault *et al.*, 2008 ; Valette-Collet *et al.*, 2003 (Reignault *et al.*, 2000). La deuxième famille est celle des pectine lyases qui servent à dégrader les pectines non méthylés (Movahedi & Heale, 1990). Le rôle des deux familles d'enzymes dans l'infection n'est pas trivial. En dehors de la redondance fonctionnelle de plusieurs gènes, les résultats d'études fonctionnelles sont souches dépendantes et variables selon les plantes hôtes.

B. cinerea produit aussi des exo- et endopolygalacturonases (Johnston & Williamson, 1992). L'étude du génome a révélé la présence d'au moins six gènes codant pour des polygalacturonases, mais seulement les deux gènes *bcp1* et *bcp2* semblent essentiels au processus d'infectieux (Have *et al.*, 1998, Kars *et al.*, 2005a).

D'autres enzymes sont impliquées dans la dégradation de la pectine et son composé principal, l'acide D-galacturonique : les L-galactonate deshydratases, les 2-céto-3-désoxy-L-galactonate aldolases. Un certains nombre de ces enzymes sont nécessaires au processus infectieux. *B. cinerea* produit d'autres enzymes dégradant la paroi telles que la cellulase et la β-1,4-xylanase (Noda *et al.*, 2010).

6.2. Les toxines fongiques

B. cinerea secrète un arsenal de composés phytotoxiques (métabolites secondaires) pour tuer les cellules de la plante hôte. Deux composés ont été étudiés plus précisément, l'acide botcinique (Cutler *et al.*, 1996) et le botrydial (Colmenares *et al.*, 2002a). Le botrydial est un sesquiterpène provoquant des lésions nécrotrophiques. Sa biosynthèse implique cinq gènes organisés en un cluster dont deux gènes essentiels *bcbot1* (P450 monooxygénase) (Siewers *et al.*, 2005) et *bcbot2* (sesquiterpène cyclase) (Pinedo *et al.*, 2008); (Wang CM *et al.*, 2009). La production d'acide botcinique et/ou de botrydial est nécessaire pour la virulence (Siewers *et al.*, 2005); (Pinedo *et al.*, 2008).

Outre ces métabolites phytotoxiques, *B. cinerea* produit des protéines phytotoxiques. Deux petites protéines dites «necrosis and ethylene-inducing peptide» ou «NEP1-like» (Staats *et al.*, 2007) ont été identifiées. Ces protéines constituent une famille de protéines phytotoxiques secrétées capables de provoquer la mort cellulaire (Gijzen & Nürnberger, 2006).

6.3. La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Chez *B. cinerea*, la pathogénie implique la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS. Les ROS incluent l'anion O_2^- , le radical hydroxyl OH^\bullet et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La production de ROS est observée lors de l'interaction entre la surface des plantes et les champignons (Schouten *et al.*, 2002). La génération des H_2O_2 par *B. cinerea* implique les superoxydes dismutase (SOD) et le complexe NADPH oxydase (NOX). En fait les superoxydes dismutases (SOD1 et SOD2) permettent la dismutation de l'ion superoxydes O_2^- en H_2O_2 . Cette dismutation permet de détoxifier les cellules des ions O_2^- et de produire du H_2O_2 qui est la molécule (ROS) dominante impliquée dans la virulence (Forman *et al.*, 2010). Le complexe NOX est essentiel dans la formation de sclérotés ainsi dans le succès d'infection (Segmüller *et al.*, 2008). Il est formé par deux unités transmembranaires BcNOXA et

Introduction générale

BcNOXB. La première sous-unité est impliquée dans la propagation de la lésion, tandis que BcNOXB est essentiel dans la pénétration de tube germinatif dans les cellules de la plante hôte (Siegmund *et al.*, 2013).

6.4. Signalisation moléculaire impliquée dans l'infection.

Les champignons sont confrontés à plusieurs défis majeurs, comme l'adaptation aux changements environnementaux. Les pathogènes doivent également percevoir et s'adapter à la plante hôte. Cette adaptation implique des cascades de signalisation. Ces dernières années, beaucoup de progrès ont été faits dans la caractérisation des cascades de signalisation majeures et de leur impact sur le développement et la virulence de *B. cinerea*. Plusieurs voies de signalisation ont été étudiées, parmi lesquelles, la voie AMPc-dépendante. Elle est impliquée dans plusieurs processus comme la croissance, la conidiation, la germination des spores, la détection des nutriments et la virulence (Figure 16) (Schumacher *et al.*, 2008).

Les voies de MAP kinases sont impliquées aussi dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*. Elles jouent un rôle fondamental dans les stades précoces d'infection mais également dans le développement et l'adaptation aux changements de l'environnement (Figure 15). Trois cascades de MAP kinases ont été caractérisées chez *B. cinerea* (Xu, 2000) : la première voie implique BcBMP1 (Zheng *et al.*, 2000), la deuxième voie implique BcSAK1 (Segmüller *et al.*, 2007) et la dernière voie est celle de BcBMP3 (Rui & Hahn, 2007), homologue des MAPK Fus3/Kss, Hog1 et SLT2 de *Saccharomyces cerevisiae* respectivement. Ces trois voies sont essentielles au processus infectieux.

D'autres voies ou d'éléments de signalisation ont été étudiés chez *B. cinerea* montrant également l'implication de la voie Ca²⁺/calmodulin dépendante et des petites protéines G dans la virulence (Figure 16).

Introduction générale

Par contre, à ce jour aucun récepteur couplé aux protéine G (GPCR) (Kulkarni *et al.*, 2005) impliqué dans la pathogénie n'a été identifié chez *B. cinerea* (Figure 16).

D'autres protéines sont impliquées dans la transduction du signal comme les histidines kinases (HKs). Les champignons filamenteux comme *B. cinerea* en possèdent une vingtaine (Catlett *et al.*, 2003) dont la plupart à fonction inconnue (Amselem *et al.*, 2011a). Seule Histidine kinase de class III, Bos1 est impliquée dans la virulence mais aussi dans le développement et la résistances aux fongicides. L'Histidine kinase Bos1 régule la phosphorylation des MAPK BcSak1 (Fillinger *et al.*, 2012, Viaud *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2008) et indirectement celle de BcBMP3 (Liu *et al.*, 2011).

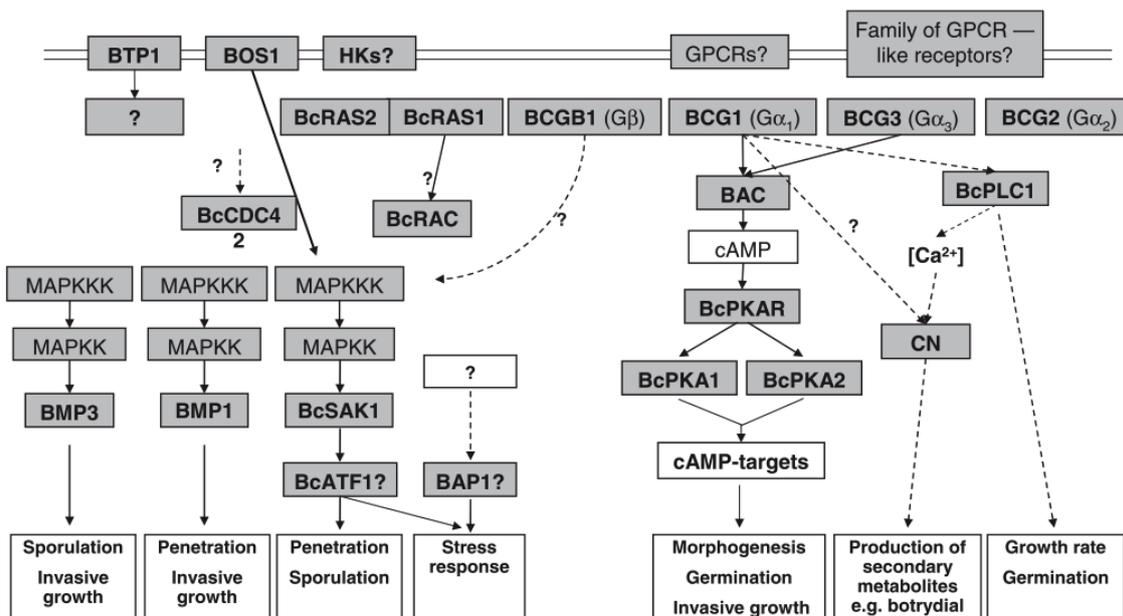


Figure 5 : Schéma représentative des différentes voies de signalisation chez *B. cinerea* (Williamson *et al.*, 2007).

Introduction générale

Tableau 3 : Principaux gènes impliqués dans la virulence chez *B. cinerea* d'après (Choquer et al., 2007)

Processus biologique	Gène et fonction	Souche étudiée	Phénotype des mutants <i>in vitro</i>	Phénotype des mutants <i>in planta</i>	Références
Pénétration de l'appressorium	<i>bcpls1</i> : Tétraspamine	T4	n.d	Défaut de pénétration des feuilles des plantes	(Gourgues et al., 2004)
Synthèse de la paroi cellulaire	<i>Bchsl</i> : Chitine synthase	Bd90	Défaut pariétale	Colonisation réduite	(Soulié et al., 2003)
Biosynthèse de botrydial	<i>Bcbot1*</i> Cytochrome P450	T4	Défaut de production de botrydial	Colonisation réduite	(Siewers et al., 2005)
Génération d'H ₂ O ₂	<i>bcsod1</i> Superoxyde dismutase	B05.10	Sensibilité au stress oxydatif	Colonisation réduite	(Rolke et al., 2004)
Dégradation de la paroi des cellules végétales	<i>bcpme1*</i> : Pectine méthyl-estérase	Bd90	Réduction de la croissance	Colonisation réduite	(Valette-Collet et al., 2003)
	<i>bcpj1</i> : endo-polygalacturonase	B05.10	Réduction de la croissance	Colonisation réduite	(Have et al., 1998)
	<i>bcpj2</i> : endo-polygalacturonase	B05.10	n.d	Retard dans la formation des lésions secondaires	(Kars et al., 2005b)
	<i>xyn11a</i> : Endo-β-1,4-xylanase	B05.10	Réduction de l'activité Endo-β-1,4-xylanase	Retard dans la formation des lésions primaires	(Brito et al., 2006)
Transduction de signal	<i>bcg1</i> : sous-unité Gα de la protéine G.	B05.10	Altération morphologique, défaut dans la sécrétion de botrydial et des protéases	Arrêt de l'infection	(Schulze Gronover et al., 2001)
	<i>bcg2</i> : sous-unité Gα de la protéine G	B05.10	n.d	La réduction de la colonisation	
	<i>bcg3</i> : sous-unité Gα de la protéine G	B05.10	Défaut de germination, de croissance et de sporulation	Retard dans la formation des lésions primaires	(Doehlemann et al., 2006)
	<i>bac</i> : Adénylate cyclase	B05.10	Réduction de la croissance, de la sporulation et de la germination	Réduction de la colonisation	(Klimpel et al., 2002); (Doehlemann et al., 2006)

Introduction générale

Transduction de signal					
	<i>bmp1</i> : MAP kinase	B05.10	Défaut de germination sur surfaces hydrophiles	Absence d'appressorium, défaut de pénétration et de colonisation.	(Zheng et al., 2000); (Doehlemann et al., 2006)
	<i>bmp3</i> : MAP kinase	B05.10	Réduction de la croissance végétative, absence des sclérotes	Réduction d'efficacité de pénétration et réduction de colonisation	(Rui & Hahn, 2007)
	<i>bcsak1</i> : MAP kinase	B05.10	Défaut de conidiation, augmentation de la formation des sclérotes	Absence de pénétration, réduction de lésions secondaires	(Segmüller et al., 2007)
La voie Ca ²⁺ /calmodulin dépendante	<i>bos1</i> : Histidine kinase	USW11 B05.10	Résistance aux fongicides, osmo-sensibilité, défaut de conidiation	Défaut de pénétration*. Réduction de la colonisation	(Viaud et al., 2006, Liu et al., 2008)
	<i>bcp1</i> : Cyclophilin A	T4	Résistance à la cyclosporin A	Réduction de la colonisation	(Viaud <i>et al.</i> , 2003)
	Bcpic5*	B05.10	Résistance à la drogue FK506	Réduction de la colonisation	(Gioti <i>et al.</i> , 2006)

* : Facteurs de virulence souches dépendantes.

n.d : Effet non déterminé.

7. La lutte contre la pourriture grise.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour lutter contre la pourriture grise. La méthode principale s'appuie sur l'utilisation de fongicides (lutte chimique). En l'absence de variétés résistantes, les méthodes non chimiques comprennent surtout des mesures prophylactiques et la lutte biologique.

7.1. Lutte non-chimique

7.1.1. Mesures prophylactiques :

La prophylaxie représente un ensemble de mesures visant à réduire l'installation et la propagation de l'organisme pathogène. Ces mesures prophylactiques occupent une place importante dans la lutte contre les maladies fongiques. Elles exigent un contrôle de la température, de l'humidité relative et, dans le cas des cultures annuelles, cela implique également la rotation des cultures et des semis sains. Dans le cas concret de la lutte contre la pourriture grise, les mesures suivantes sont conseillées :

- Eliminer les feuilles sénescentes et les organes infectés des parcelles et des serres. Le but de cette opération est de diminuer les sources possibles d'inocula primaires (Howard *et al.*, 1994, Decognet *et al.*, 2010). Le retrait des feuilles sénescentes dans les serres peut diminuer le nombre des lésions et la mort des plantes d'environ 50% (Elad *et al.*, 2004).
- Augmenter l'aération et l'ensoleillement des grappes des tomates et des vignes par effeuillage (Decognet *et al.*, 2010) et tailles régulières. Réduire ainsi la densité des plantes diminue les zones de confinement qui entraîneraient l'augmentation de l'humidité relative autour des grappes dans les serres.

Introduction générale

- Fertiliser ‘avec modération’ permet également de réduire le développement de l’organisme pathogène. Plusieurs études ont démontré l’efficacité de ces méthodes (Daugaard *et al.*, 2003, Elad & Volpin, 1993). Une diminution d’apport en nitrates et une addition de potassium dans le fertilisant réduit significativement la maladie de la pourriture grise causée par *B. cinerea* de 27-30%, tandis que l’ajout de calcium réduit l’incidence de la maladie de 35 à 50%.

7.1.2. La lutte biologique :

Selon l’organisation internationale de la lutte biologique (OILB), la lutte biologique est définie ainsi : «Utilisation d’organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des bio-agresseurs. Elle se base sur la relation naturelle entre deux êtres vivants, ainsi que sur l’utilisation de composés minéraux, organiques et d’extraits de plantes.

- Les agents biologiques.

Des nombreuses études ont décrit des organismes ayant une activité antagoniste à *B. cinerea*. Parfois ils ont été isolés de l’environnement naturel de ce dernier. Ces organismes se sont révélés être de bons candidats de bio-contrôle anti-botrytis dans les conditions de laboratoire, alors que, dans les conditions du champ, seuls certains sont efficaces et peu de produits industriels en résultent. Il peut s’agir de champignons, de levures ou de bactéries (Droby *et al.*, 2009); (Elmer & Reglinski, 2006). Les modes d’action impliqués dans la protection biologique des plantes contre *B. cinerea* sont nombreux (Jamalizadeh *et al.*, 2011). Le tableau 3 récapitule les agents de lutte biologique anti-botrytis, leur mode d’action et le cas échant, la formulation industrielle correspondante.

Introduction générale

Les agents de la lutte biologique peuvent avoir les activités suivantes :

1. Antibiose : l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène qui ont un effet négatif sur la croissance de celui-ci (Melin *et al.*, 2007).
2. Hyperparasitisme : il s'agit d'un organisme antagoniste, qui colonise sa cible, en l'occurrence *B. cinerea*, et la détruit (Bull *et al.*, 1998).
3. Compétition nutritive : *B. cinerea* a besoin de nutriments exogènes pour assurer son cycle infectieux. La présence d'autres microorganismes peut inhiber sa croissance par la compétition pour certains éléments nutritifs (Elad & Stewart, 2004).
4. Interférence avec le pouvoir pathogène : l'agent de contrôle biologique peut interférer avec les facteurs de pathogénie du champignon, par exemple, en inhibant les enzymes hydrolytiques. L'interférence est efficace à des phases précoces de l'infection (Baarlen *et al.*, 2004).
5. Stimulateur des défenses des plantes : ce mode d'action est majoritaire chez les bactéries telles que *Pseudomonas spp* (Bunster *et al.*, 1989). Elles induisent des changements physiologiques de la plante qui répond à cette infection, notamment, par un changement des caractéristiques de surface des feuilles de la plante. Ceci a pour conséquence de gêner l'attachement et la croissance des agents pathogènes sur les feuilles.

Tableau 4 : Exemples des agents de contrôle biologique antagonistes de *B. cinerea*. (D'après Elmer & Reglinski, 2006)

Les organismes	Mode d'action	Produit industriel	Validation (Laboratoire et dans les champ)	Références
1/ Champignons filamenteux et les oomycètes				
<i>Gliocladium spp</i>	Antibiose et hyper-parasitisme	n.d	Essais sur baies de raisin ^{L.C.}	Machowicz-Stefaniak (1998)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Antibiose et hyper-parasitisme.	n.d	Essais sur disques foliaires. Raisins nécrosés ^{L.C.}	Stewart et al (1998) Fowler et al (1999)
<i>Pythium radiosum</i> <i>P. periplocum</i>	Hyper-parasitisme.	n.d	Essais <i>in vitro</i> sur vigne.	Paul (1999a,b)
<i>Trichoderma altroviride (LC52)</i>	Antibiose.	Sentinel (Agrimm Technologies, NZ)	Vignobles.	*
<i>T. harzianum (T39)</i>	Compétition nutritive.	Trichodex (Makhteshim-Agan, Israël).	Grappes de raisins.	O'Neill et al (1996) Elad (1996) Elade & Stewart (2004)
<i>T. harzianum (P1)</i>	Induction des défenses des plantes.		Essais en vignoble	
<i>T. viride (Td50)</i>		Trichopulvin 25WP (Research Institute of Plant Protection, Romania)	Essais en vignoble	Letorre et al (1999)
<i>Ulocladium atrum (U385)</i>	Compétition nutritive.		Essais en vignoble Essai sur framboisiers.	Lennartz et al (1998), Schoene & Kohl (1999), Schoene et al (2000), Roudet & Dubos (2001), Metz et al (2002)
	Hyper-parasitisme.			
<i>Ulocladium oudemansii (HRU3)</i>	Interférence avec le pouvoir pathogène	Botry-Zen (Botry-Zen Ltd, NZ)	Essais en vignoble	Reglinski & Kingston (2001), Elmer et al (2003), Reglinski et al (2005), Elmer et al (2005)
<i>Ulocladium spp</i>			Grappe de raisins ^{L.}	Fowler et al (1999).

Introduction générale

2/ Levures				
<i>Acremonium cephalosporium</i>	Compétition nutritive.		Essais sur baies de raisin ^{L,C} .	Zahavl et al (2000).
<i>Aureobasidium pullulans</i>		Blossom protect Botector	Essais sur baies de raisin ^{L,C} .	Lima et al (1996,1997,1999), Schena et al (1999), Castoria et al (2001).
<i>Candida guilliermondii</i>			Essais sur baies de raisin ^{L,C} .	McLaughlin et al (1992), Zahavi et al (2000)
<i>C. saltoana</i>		Bio-Coat and Blocure	Essais en vignobles ^C .	Schena et al (2004)
<i>Cryptococcus laurentii LS-28</i>			Essais sur baies de raisin ^L	Lima et al (1998,1999)
<i>Metschnikovia spp. LS15</i>			Essais sur les baies de raisin ^L . Essais en vignoble ^C .	Schena et al (2000)
<i>Metschnikovia fructicola</i>		Interférence avec le pouvoir pathogène.	Schemar (AgroGreen, Minrav Group, Israël)	Essais sur baies de raisin ^C .
<i>Metschnikovia pulcherrina 320</i>	Compétition nutritive.		Essais sur baies de raisin ^L . Essais en vignobles ^C .	Nigro et al (1999)
<i>Pichia membranifaciens</i>			Essais <i>in vitro</i> sur vignes	Masln et al (2000,2001)
<i>Rhodotorula glutinis LS.11</i>	Interférence avec le pouvoir pathogène.		Essais sur les baies de raisin ^L .	Lima et al (1998,1999)
<i>Saccharomyces chevalleri</i>		Saccharpulvin 25PU (RiPP) Bucharest, Romania	Essais en vignobles.	Sesan et al (1999)
<i>Trichosporon pullulans (RB9)</i>			Essais sur baies de raisin ^L Essais en vignobles.	Schimldt et al (1996) Holz & Volkman (2002)
3. Les bactéries				
<i>Bacillus spp</i>	Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante (SDN)		Essais sur grappes de raisins ^C . Essais sur vignes.	Ferreira (1999) Paul et al (1998)
	Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante.	Serenade (Agra Quest, USA)	Essais aux champs sur les biais de raisins.	Esterio et al, (2000) Schilder et al (2002)

Introduction générale

<i>Bacillus subtilis (QST-713)</i>	Modification de la mouillabilité de la surface		Essais sur les biais de raisins.	Paul et al (1997)
<i>Bacillus circulans</i>	Modification de la mouillabilité de la surface		Essais sur grappes de raisins ^c .	Ellis (1996), Seddon et al (2000), Schmltt et al (2002)
<i>Brevibasillus brevis</i>	Compétition nutritive.		Essais sur vigne ^L	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Modification de la mouillabilité de la surface		Essais sur grappes de raisins ^c .	Krol (1996)
<i>Serretta liquetaciens</i>	Modification de la mouillabilité de la surface		Essais sur disques de foliaires.	Whiteman & Stewart (1998)

n.d : Non déterminé.

* : www.agrimm.co.nz

c : Essais effectués au champ.

L : Essais effectués au laboratoire.

7.1.3. Stimulation des défenses de la plante : Agent non-biologie (composés organiques, minéraux).

L'interaction entre la plante et l'agent pathogène provoque des réactions de défense chez la plante. Cette défense se manifeste par la résistance aux pathogènes. La résistance peut être induite par des agents biologiques non pathogènes (Elad & Stewart, 2004). Ces derniers provoquent soit des changements à la surface comme l'épaississement des structures pariétales pour renforcer leur rôle de barrière physique, soit la synthèse de substances antimicrobiennes phytoalexines comme le resvératol ou des composés impliqués dans la signalisation vers d'autres cellules comme l'acide salicylique et l'acide jasmonique. Ces phytohormones régulent la résistance des cellules et induisent la synthèse des protéines de défense. Enfin, la plante peut produire, dans le cas d'une agression, des protéines de défense (ou protéine PR : Pathogenesis Related). Ces protéines inhibent le pouvoir pathogène des microorganismes (dégradation des enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène ou la dégradation des structures pariétales et des membranes plasmiques) (Klarzynski *et al.*, 2000, Elad, 1996).

Des analogues de l'acide salicylique ont été fabriqués et utilisés pour induire la résistance des plantes contre *B. cinerea* et des virus phytopathogènes.

- Extraits de plantes et composés minéraux et organiques.

Des extraits de plantes ont été étudiés pour contrôler les bioagresseurs. Dans le cas de *B. cinerea*, un extrait de feuilles de la Renouée de Sakhaline a été utilisé pour induire les réactions de défense chez la vigne (Carlen *et al.*, 2004). Cet extrait a été commercialisé sous forme d'un bio-fongicide nommé 'Milsana' aux Etats Unis. Un autre extrait utilisé contre *B. cinerea*, est un mélange d'extrait d'algues et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), contenus dans

Introduction générale

le produit Synermix. Ce mélange induit la synthèse et l'accumulation du resvératrol en vignoble (Jeandet. *et al.*, 2000)

La propolis est une résine de consistance visqueuse, qui se caractérise par une activité antimicrobienne (Tosi *et al.*, 1996). La propolis a été utilisée par Lima *et al.*, (1998) pour inhiber la croissance *B. cinerea* (Lima *et al.*, 1998).

En France, l'extrait de β -1,3 glucan de l'algue rouge (*Laminarin digitata*) a été développé. Ce produit induit les réactions de défense contre *B. cinerea* dans les grappes de raisins.

Il existe des fongicides d'origine naturelle à base de composés minéraux et organiques pour lutter contre *B. cinerea*. Nigro *et al* (Nigro *et al.*, 2006) ont étudié l'activité de 19 sels sur la croissance de *B. cinerea*. Plusieurs de ces sels (carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, carbonate de potassium, chlorure d'aluminium) limitent la croissance de *B. cinerea* et par conséquent, diminuent l'incidence de la maladie. Bautista-Banos *et al* (Bautista-Bañosa *et al.*, 2006) ont mis en évidence l'effet du chitosan, une forme soluble de la chitine contre *B. cinerea*. Le chitosan est utilisé comme agent de lutte contre *B. cinerea* en protection post-récolte. Il induit une résistance dans le fruit.

La lutte biologique se base donc sur des agents microbiens et des fongicides d'origines végétale, minérale ou organique. Même si elle est souvent efficace contre *B. cinerea* dans les conditions contrôlées du laboratoire, elle se heurte à plusieurs obstacles pour une application industrielle : le coût de fabrication, la difficulté de fabrication en grandes quantités et des efficacités très variables.

En ce qui concerne les agents microbiens, ils ont montré une efficacité en présence d'une faible ou moyenne pression épidémique de *B. cinerea*. Ils dépendent aussi des facteurs environnementaux et écologiques. Même si la lutte biologique ne constitue pas, en l'état actuel, une solution pour remplacer les fongicides de synthèse, des approches de combinaison des deux moyens de lutte peuvent être envisagées pour contrôler cette maladie.

7.2. La lutte chimique :

La lutte chimique reste, à ce jour, le principal moyen pour combattre la pourriture grise. Elle se base sur des fongicides de synthèse.

Sur vigne, les applications de fongicides anti botrytis s'effectuent entre la fin floraison et la véraison. Quatre stades de développement de la vigne peuvent être ciblés pour des traitements spécifiques (Tableau 5).

Tableau 5 : Stades cibles des traitements anti-botrytis.

Stade de développement	Effet du traitement
A : Chute des capuchons floraux	Limite l'infection des pièces florales.
B : Fermeture des grappes	Protection de l'intérieur de la grappe.
C : Véraison	Limite la propagation des inocula primaires.
D : Trois semaines avant la récolte	Protection des baies jusqu'à la maturité complète.

Actuellement, les stratégies varient de 0 à 3 traitements par saison selon la situation épidémique (importance de la pression de la maladie, conditions climatiques). L'utilisation régulière des fongicides anti-botrytis conduit à l'apparition de souches résistantes et, par conséquent, à l'échec du traitement. Pour contourner le phénomène de la résistance, il est recommandé, en France, de limiter l'application de fongicides ayant un même mode d'action à une fois par saison (Note technique commune Gestion de la résistance – Maladies de la vigne ; <http://www.afpp.net/apps/accueil/autodefault.asp?d=5121>).

7.3. Les fongicides :

Les fongicides sont destinés à lutter contre les maladies des plantes provoquées par des champignons ascomycètes, basidiomycètes et des oomycètes (Leroux *et al.*, 2002).

Ils peuvent être classés selon plusieurs critères : mode d'action biologique (préventif/curatif), comportement dans les plantes (pénétrant, systémique) et leurs structures chimiques. L'industrie phytosanitaire s'est accordée à classer les fongicides selon leurs modes d'action biochimique (FRAC). Il y a des fongicides dits multi-sites qui affectent plusieurs cibles.

Introduction générale

D'autres fongicides, dits uni-sites, ont pour cible une protéine essentielle au champignon (Leroux et *al.*, 2002).

7.3.1. Les fongicides multi-sites :

Les fongicides multi-sites sont les fongicides les plus anciennement utilisés. Les premiers fongicides multi-sites étaient à base de cuivre ou de soufre. L'intégration de la chimie de synthèse dans le domaine de l'agrochimie a permis de développer plusieurs familles chimiques de fongicides multi-sites (Tableau 6) (Leroux et *al.*, 2002).

Ils peuvent inhiber les enzymes impliquées dans le catabolisme primaire, le cycle de Krebs ou la chaîne respiratoire. Ils inhibent aussi d'autres processus comme la perméabilité cellulaire. Peu affectés par la sélection de résistances, ces fongicides se caractérisent par leurs effets non sélectifs et une efficacité à forte dose. Par conséquent, ils comportent des risques écotoxicologiques et toxicologiques pour les organismes non cibles.

Tableau 6 : Tableau des différentes familles chimiques de fongicides multi-sites.

Famille chimique	Fongicides
Sulfamides	dichlofluanide, tolyfluanide
Phtalimides	captafol, captane, folpet
Dithiocarbamates	ferbame, mancozèbe, manèbe, métirame, propinèbe, thirame, zinèbe, zirame
Chloronitriles	chlorothalonil
Triazines	anilazine
Guanidines	guazatine, iminoctadine
Quinones	dithianon
Quinoxalines	chinométhionate/ quinométhionate
Maleimides	fluoroimide
Minéraux	cuivre, soufre

7.3.2. Les fongicides uni-sites :

7.3.2.1. Les fongicides affectant la respiration :

Les fongicides uni-sites sont les plus utilisés actuellement. Ils se caractérisent par une matière active ciblant une protéine cellulaire, perturbant un processus cellulaire donné.

Introduction générale

L'un des processus ciblés par les fongicides est la respiration cellulaire qui permet la production d'énergie sous forme d'ATP. Chez les champignons et les eucaryotes en général, les phases finales se déroulent dans la mitochondrie. Celle-ci contient une série de transporteurs d'électrons (Yamaguchi & Fujimura, 2005) parmi lesquels cinq complexes protéiques ayant des fonctions enzymatiques cataboliques. Tous les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, mis à part le complexe IV, constituent les cibles de divers fongicides. Ces derniers ont une action préventive car ils bloquent la germination des spores de champignons et immobilisent les zoospores des Oomycètes (Tableau 7).

Tableau 7 : Fongicides inhibant la respiration cellulaire (Source FRAC)

Famille chimique	Cible et Mode d'action		Maladies /organismes cibles	
Pyrimidiamines	Complexe I : NADH- oxydoréductase.	inconnu	Rouilles et oïdiums sur plantes ornementales	
Pyrazole-5- carboxamides				
Phényl-benzamides	Complexe II : Succinate déshydrogénase (SDH).	Inhibition du complexe II	Maladies du gazon, charbons du blé et du maïs	
Phényl-oxo-éthyle thiophène amides			n.d	
Pyridinyle-éthyle- benzamides			Ascomycètes et Basidiomycètes	
Furane-carboxamides			Maladies du gazon, charbons du blé et du maïs	
Oxathiine-carboxamides				
Thiazole-carboxamides				
Pyrazole-4- carboxamides				
Pyridine-carboxamides			Ascomycètes et Basidiomycètes	
Méthoxy-acrylates	Complexe III : Ubiquinone-cytochrome c réductase	Fixation de l'ubiquinone Q: QoI: Fixation sur la face externe de la membrane mitochondriale	Nombreuses maladies provoquées par les Eumycètes chez riz, vigne, céréales, pomme de terre....	
Méthoxy-carbamates				
Oximino-acétates				
Oximino-acétamides				
Dihydro-dioxazines				
Benzyle-carbamate				Active contre les eumycètes, dont <i>B. cinerea</i>
imidazolinones				
oxazolidines				
Cyano-imidazoles	Complexe III : Ubiquinone-cytochrome c réductase	Qil : Fixation sur la face interne de la membrane mitochondriale interne	Oomycètes.	
Sulfamoyl-triazoles				
Triazolo- pyrimidylamines	Complexe III : Ubiquinone-cytochrome c réductase	Qxl : Fixation non caractérisée	Oomycètes.	
dinitrophénylcrotonates	ATP synthase	Découplant phosphorylation oxydative	Oïdiums.	
2,6-dinitro-anilines			Mildiou, Pourriture grise, pourriture blanche sur arachide, galles sur fruits et légumes.	
organostanniques	ATP synthase	Inhibiteur phosphorylation oxydative	Pyriculariose, anthracoses du haricot et mildious	
Thiophène-carboxamides	ATP synthase	Inhibiteur de libération d'ATP	Piétin échaudage du blé (<i>Gaeumannomyces graminis</i>)	

7.3.2.2. Les fongicides affectant la biosynthèse d'acides aminés et des acides nucléiques :

La synthèse de l'ARN constitue également une cible pour deux familles chimiques de fongicides. La première famille correspond à celle des phénylamides qui sont des fongicides systémiques spécifiques des oomycètes. Ces substances antifongiques entraînent une baisse des teneurs en ARN. Par ailleurs, elles sont concernées par la résistance (Davidse *et al.*,

Introduction générale

1988). La deuxième famille est celle des hydroxypyrimidines spécifiques des oïdiums. Le bupirimate s'utilise sur cultures pérennes. La cible serait l'adénosine désaminase qui est responsable du passage de l'adénosine à l'inosine dans la voie de récupération des purines (Hollomon & Chamberlain, 1981).

Parmi les fongicides, il n'a pas été démontré formellement l'existence d'inhibiteurs d'acides aminés, mais ce mode d'action est suggéré pour les fongicides de la famille des anilopyrimidines. Des études suggèrent que ces fongicides inhibent la cystathionine- γ -lyase (CGL) et la cystathionine- β -lyase (CBL) impliquées dans la synthèse de méthionine et de ses dérivés : homocystéine, cystéine, S-adenosylméthionine (Leroux, 1996). Les anilopyrimidines inhibent aussi la sécrétion des protéines extracellulaires dont les enzymes hydrolytiques impliquées dans le processus infectieux du champignon.

7.3.2.3. Les fongicides inhibant la biosynthèse de composants des parois cellulaires :

Les parois cellulaires fongiques sont composées de mélanine et de plusieurs polysaccharides dont la chitine, les β -glucanes (chez les eumycètes) et la cellulose (chez les oomycètes). Ces composés représentent des cibles pour différents groupes de fongicides. Le premier groupe cible les polysaccharides. Le deuxième groupe est celui des inhibiteurs de la biosynthèse de la mélanine (Tableau 8).

Les fongicides interagissant avec les polysaccharides se répartissent en deux groupes. Le premier groupe est celui des inhibiteurs des chitines synthèses d'origine naturelle, nommés polyoxines. Ce sont des analogues de l'uridine-diphosphate-N-acétylglucosamine (UDP-N-GlcNAc) et des inhibiteurs compétitifs des chitines synthèses. Le deuxième groupe est celui des inhibiteurs de cellulose synthase actifs contre les oomycètes (Blum *et al.*, 2010).

Les inhibiteurs de la biosynthèse de la mélanine se distinguent en deux grandes familles, appelées « Melanin Biosynthesis Inhibitor-Réduction (MBI-R) » et « Melanin Biosynthesis

Introduction générale

Inhibitor-Dehydratase (MBI-D)». La première famille inhibe la polyhydroxynaphthalène réductase. La deuxième famille inhibe la scytalone déhydratase (Tableau 8) (Suzuki *et al.*, 2010).

Tableau 8 : les fongicides inhibiteurs des polysaccharides et de la biosynthèse de la mélanine.

Famille chimique	Cible et mode d'action		Maladies / organismes cibles
Les inhibiteurs de polysaccharides			
Polyoxines	Chitines synthèses	Inhibiteurs compétitifs	Brûlure de la gaine causée par <i>Rhizoctonia solani</i> sur le riz, chancres du pommier et du pêcher.
Cinnamides	Cellulase synthase	n.d	Anti-mildious.
Valinamides			
Mandelamides			
Melanin Biosynthesis Inhibitor-Réduction : MBI-R	Inhibition de la polyhydroxynaphthalène réductase		Pyriculariose du riz <i>Magnaporthe oryzae</i> . (Suzuki <i>et al.</i> , 2007).
Melanin Biosynthesis Inhibitor-Dehydratase : MBI-D	Scytalone déhydratase		

7.3.2.4. Les fongicides anti-microtubules et anti-cytosquelette :

D'autres fongicides ciblent le cytosquelette et ses composants. La tubuline, le composant majeur des microtubules, représente la cible de plusieurs familles de fongicides. En se fixant sur la sous-unité β de la tubuline (Clemons et Sisler, 1971; Davidse, 1973), ils empêchent la polymérisation et, par conséquent, l'assemblage des microtubules.

Il existe de nombreuses familles chimiques (Tableau 9) ciblant le cytosquelette. Les benzimidazoles et les thiophanates, empêchant la polymérisation de la tubuline, ont une action curative. En revanche, l'utilisation massive de ces fongicides a conduit à l'apparition de graves problèmes de résistance. D'autres molécules de chimie différentes, capables de se fixer sur la β -tubuline, ont été développées : celles des N-phenyl carbamates et des benzamides spécifiques des oomycètes.

Tableau 9 : les fongicides inhibiteurs du cytosquelette.

Famille chimique	Cible	Mode d'action	Applications
Benzimidazoles	β-tubuline	Polymérisation de la tubuline. (Clemons & Sisler, 1971, Davidse, 1973).	Nombreuses maladies fongiques provoquées par des Eumycètes.
Thiophanates			
N-phenyl carbamates		Fixation à la β-tubuline.	Pourriture grise.
Benzamides			Divers Ascomycètes et certains Oomycètes.
Benzamides spécifiques des oomycètes	Cytosquelette	Des études suggèrent la délocalisation des protéines de type spectrine associées au cytosquelette (Toquin <i>et al.</i> , 2007).	Mildious de la vigne et de la pomme de terre.

7.3.2.5. Les fongicides inhibant les transductions des signaux :

Les voies de signalisation sont importantes dans l'adaptation des champignons à des changements de l'environnement. Plusieurs familles de fongicides ciblent des voies de signalisation (Tableau 10), parmi lesquelles les quinoléines et les quinazolines. Ces deux familles chimiques interfèrent avec une ou plusieurs activités serine-thréonine kinase. D'autres familles de fongicides ont été développées dont le mode d'action n'est pas encore clair comme la famille des dicarboximides (ou imides cycliques) et la famille des phénylpyrroles. Il existe aussi d'anciennes molécules nommés hydrocarbures aromatiques. Ces molécules étaient utilisées pour les traitements du sol.

Des études réalisées sur *Neurospora crassa*, *B. cinerea* et d'autres champignons suggèrent que la cible des dicarboximides et des phénylpyrroles est une histidine kinase impliquée dans la transmission des signaux relatifs à l'osmorégulation (Fillinger *et al.*, 2012, Alberoni *et al.*, 2010).

Tableau 10 : les fongicides affectant les transductions des signaux.

Famille chimique	Cible	Mode d'action	Maladies / organismes cibles
Quinoléines	Probablement une serine-thréonine kinase	Interférence avec l'activité serine-thréonine kinase (Wheeler <i>et al.</i> , 2003)	Oïdiums des céréales (<i>Erysiphe graminis</i>) et de la vigne (<i>Erysiphe necator</i>)
Quinazolines	Inconnue	Interférence avec la transduction de signaux (Gilbert <i>et al.</i> , 2009)(Gilbert <i>et al.</i> , 2009)	
Dicarboximides	Inconnue	Peroxydation des lipides chez <i>Ustilago maydis</i> et <i>B. cinerea</i> Certaines études suggèrent plusieurs modes d'action (inhibition de la synthèse d'ADN, ségrégation des chromosomes). Signalisation osmotique	Ascomycètes (<i>B. cinerea</i> , <i>Alternaria spp</i> , <i>Monilia spp</i> , <i>Sclerotinia spp...</i>) et Basidiomycètes (<i>Rhizoctonia solani</i> ...)
Phénylpyrroles	Probablement une histidine kinase	Signalisation osmotique	Pourriture grise et divers Ascomycètes et Basidiomycètes.
Thiophosphate	Inconnue	Modification de plusieurs processus cellulaires.	<i>R. solani</i> .
Thiadiazole			oomycètes telluriques.
Hydrocarbures aromatiques	Probablement des protéines kinases	Inhibition de la germination des conidies et de la croissance mycélienne	Utilisé fréquemment pour les traitements du sol

7.3.2.6. Les fongicides inhibant le métabolisme lipidique :

Les lipides jouent un rôle important dans l'intégralité et le fonctionnement des membranes cellulaires. Ils constituent la cible de plusieurs fongicides tels que les inhibiteurs de la biosynthèse des phospholipides, les inhibiteurs des acides gras et les inhibiteurs des stérols. Nous détaillerons le rôle des stérols, leur biosynthèse ainsi que leurs inhibiteurs dans le paragraphe 8. Les fongicides inhibiteurs des phospholipides sont des pro-fongicides qui doivent subir une réaction enzymatique pour être actifs. Ensuite, ils inhibent la trans-méthylation de l'éthanolamine en choline dans la voie de biosynthèse de la phosphatidylcholine. Les inhibiteurs de la biosynthèse des acides gras sont actifs uniquement contre les oomycètes (Tableau 11).

Introduction générale

Tableau 11 : les fongicides inhibant le métabolisme lipidique.

Famille chimique	Mode d'action	Applications
Phosphorothiolates	Inhibition de la trans-méthylation d'éthanolamine (Uesugi, 2001)	les maladies du riz en Asie (pyriculariose , helminthosporiose et brûlures de la gaine causées par <i>Rhizoctonia solani</i> .
Dithiolates		
Carbamates	inconnu. (Burden <i>et al.</i> , 1990)	<i>Pythium spp</i> et <i>Phytophthora spp</i>

8. Les stérols et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (SBI) :

8.1. Les stérols : définition, structure et rôle :

Les stérols sont des molécules lipidiques localisées dans les membranes cytoplasmiques et les endo-membranes des eucaryotes. Ils se caractérisent par une région hydrophobe constituée d'un noyau tétracyclique, un groupement hydroxyle sur le troisième carbone et une chaîne aliphatique sur le 17^{ème} carbone (Figure 17A). La structure des stérols varie essentiellement au niveau de la chaîne aliphatique en C17 ainsi qu'au niveau de la position et du nombre d'insaturations (Figure 17B).

En utilisant la nomenclature des stérols officielle IUPAC (www.iupac.org), la dénomination d'un stérol se fait d'abord en fonction l'absence ou la présence de groupement méthyle ou éthyle en C 24. On distingue (cholest(a), ergost(a), stigma(a)) auxquels on ajoute les préfixes et les suffixes usuels de la nomenclature IUPAC. Par exemple cholesta-5-en-3 β -ol (cholestérol), du stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (stigmastérol) et du (22E)-ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergostérol).

Le stérol majoritaire des mammifères est le cholestérol, chez les plantes, on trouve du sitostérol, stigmastérol et campestérol, tandis que chez les Eumycètes, l'ergostérol est le stérol majoritaire (Weete *et al.*, 2010).

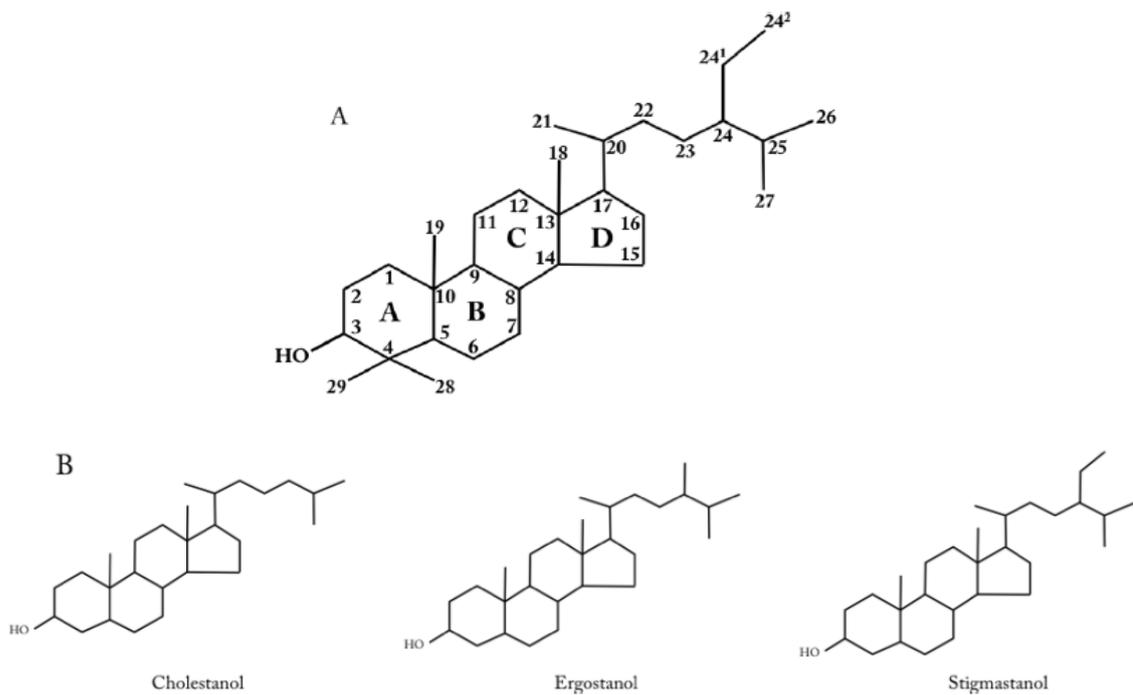


Figure 6: (A) : Système actuel de numérotation des stérols, (B) représentation schématique des trois différentes séries structurales de stérols.

Les stérols jouent plusieurs rôles, le rôle principal structural au niveau des membranes en s'intercalant entre les phospholipides, ils peuvent également interagir avec le fonctionnement des protéines membranaires et diminuer la perméabilité des membranes aux substances hydrosolubles (Yeagle, 1990). La fonction hydroxyle permet l'orientation de la molécule de façon parallèle aux phospholipides dans les couches membranaires. De ce fait les stérols sont impliqués dans la régulation de la fluidité et de la perméabilité membranaire. Ils participent avec les phospholipides à la formation des rafts qui constituent des plateformes riches en phospholipides et en stérols permettant l'interaction avec des protéines impliquées dans la signalisation, le transport des stérols et l'endocytose (Sturley, 2000, Alonso & Millán, 2001, Pasrija *et al.*, 2005).

8.2. La biosynthèse de l'ergostérol :

La voie de biosynthèse de l'ergostérol a été caractérisée chez *S. cerevisiae* grâce à l'analyse de mutants appelés ERG car déficients en ergostérol. La biosynthèse de l'ergostérol est similaire chez les champignons filamenteux y compris *B. cinerea*. Nous décrivons ici la biosynthèse chez les ascomycètes.

Le précurseur de la voie de biosynthèse est l'acétyl-CoA qui permet la formation de farnésyl-pyrophosphate (FPP) (Chambon *et al.*, 1991). La condensation de deux molécules de FPP permet la synthèse de squalène grâce à l'enzyme squalène synthase (Erg9) (Jennings *et al.*, 1991).

Le squalène subit une époxydation catalysée par l'enzyme squalène époxydase (Erg1) pour former du squalène 2,3-époxyde (Jahnke & Klein, 1983) qui est le substrat de la cyclase, Erg7, conduisant à la formation du premier stérol, le lanostérol (Corey *et al.*, 1994). Le lanostérol va subir une méthylation au niveau du carbone C-24 conduisant à l'éburicol. Ce dernier est le substrat de la 14 α -déméthylase, une monooxygénase à cytochrome P450 (Cyp51, Erg11) (Yoshida *et al.*, 1986) (Gachotte *et al.*, 1997). Chez les champignons filamenteux, Cyp51 produit du 4,4-diméthylergosta-8,14,24(24¹)-triène-3 β -ol qui est réduit en 4,4 diméthylfécostérol par la Δ^{14} -réductase (Erg24). L'étape suivante conduit à une déméthylation en C-4 (Figure 18). Ce processus implique un complexe d'enzymes nommé C4-déméthylase composé de trois enzymes et d'une protéine d'ancrage membranaire, Erg28. Les trois enzymes sont : La C-4 méthyle oxydase (Erg 25), la C-3 déshydrogénase, la C-4 décarboxylase (Erg26) et la 3-cétoréductase (Erg27) (Figure 18).

Erg25 oxyde le méthyle pour former un acide carboxylique (Bard *et al.*, 1996) Erg26 entraîne une décarboxylation pour former une molécule avec un groupement cétone (Baudry *et al.*, 2001), alors que, Erg27 réduit le groupement cétone en hydroxyle. Un deuxième cycle s'effectue pour enlever le second méthyle en C-4. Cela permet le passage de 4,4-

Introduction générale

diméthylfécostérol en fécostérol. Ce dernier est le substrat de l'enzyme $\Delta^8\text{e}\Delta^7$ isomérase permettant la production de l'épistérol qui subira des réactions de désaturation en C-5,6 par la C5 stérol désaturase (Erg3). Erg5 (C-22 désaturase) introduit une double liaison en C-22 sur l'Ergosta-5,7,24(24¹)triène-3 β -ol pour former de l'ergosta-5,7,22,24(24¹)-tétraène-3 β -ol. L'ergostérol (l'ergosta-5,7,22-triène-3 β -ol) est alors formé par la réduction de la double liaison en C-24-24¹. La chaîne de biosynthèse de l'ergostérol chez *S. cerevisiae* diffère de celle des champignons filamenteux par l'étape de C-24 méthylation qui s'effectue après les étapes de C-4 déméthylation (Figure 18).

8.3. Les fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols.

Les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS) sont destinés à lutter contre la plupart des champignons phytopathogènes. Les IBS ciblent la voie post-squalène et se divisent en quatre familles (Figure 18):

- Les inhibiteurs de la squalène époxydase (Erg1) :

La squalène époxydase (Erg1) est une enzyme présente chez les eumycètes et non fonctionnelle chez les oomycètes, ce qui explique pourquoi les inhibiteurs de la squalène époxydase ne sont pas efficaces contre les mildious.

Les inhibiteurs de la squalène époxydase se répartissent en deux familles chimiques les allylamines et les thiocarbamates. Les allylamines ont une action fongistatique par accumulation de squalène sous forme de vésicules lipidiques dans le cytoplasme provoquant un ralentissement de la croissance. Les deux familles sont des inhibiteurs non compétitifs de la squalène époxydase (Leroux, 2003, Leroux et al., 2002).

Introduction générale

- Les inhibiteurs de 14 α -déméthylase (Cyp51/Erg11) : IDMs

Les inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols représentent le groupe le plus important des IBS utilisés en agriculture. Introduits il y a une trentaine d'années, ils représentent environ 25% du marché mondial des fongicides. La plupart des IDM ont des activités curatives. Ces fongicides inhibent la 14 α -déméthylase provoquant l'accumulation de 14 α -méthylstérols et la chute du taux de l'ergostérol. Les IDMs se caractérisent par un large spectre d'action contre diverses maladies. En revanche sont peu ou pas efficace contre la pourriture grise (Leroux, 2003, Leroux et al., 2002).

- Les inhibiteurs de la Δ^{14} réductase (Erg24) et/ou $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomérase (Erg2) :

La famille chimique inhibant la Δ^{14} réductase et/ou la $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomérase est celle des morpholines et amines. Deux fongicides représentent cette famille, le fenpropimorphe et la fenpropidine qui sont employés contre les oïdiums. La réaction de Δ^{14} -réduction catalysée par Erg24 et l'isomérisation $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomérase catalysée par Erg2 génèrent des composés stéroliques instables à haute énergie (Rahier *et al.*, 2009). Les inhibiteurs bloquent ces enzymes en mimant de façon stable ces stérols à carbocation transitoire.

Introduction générale

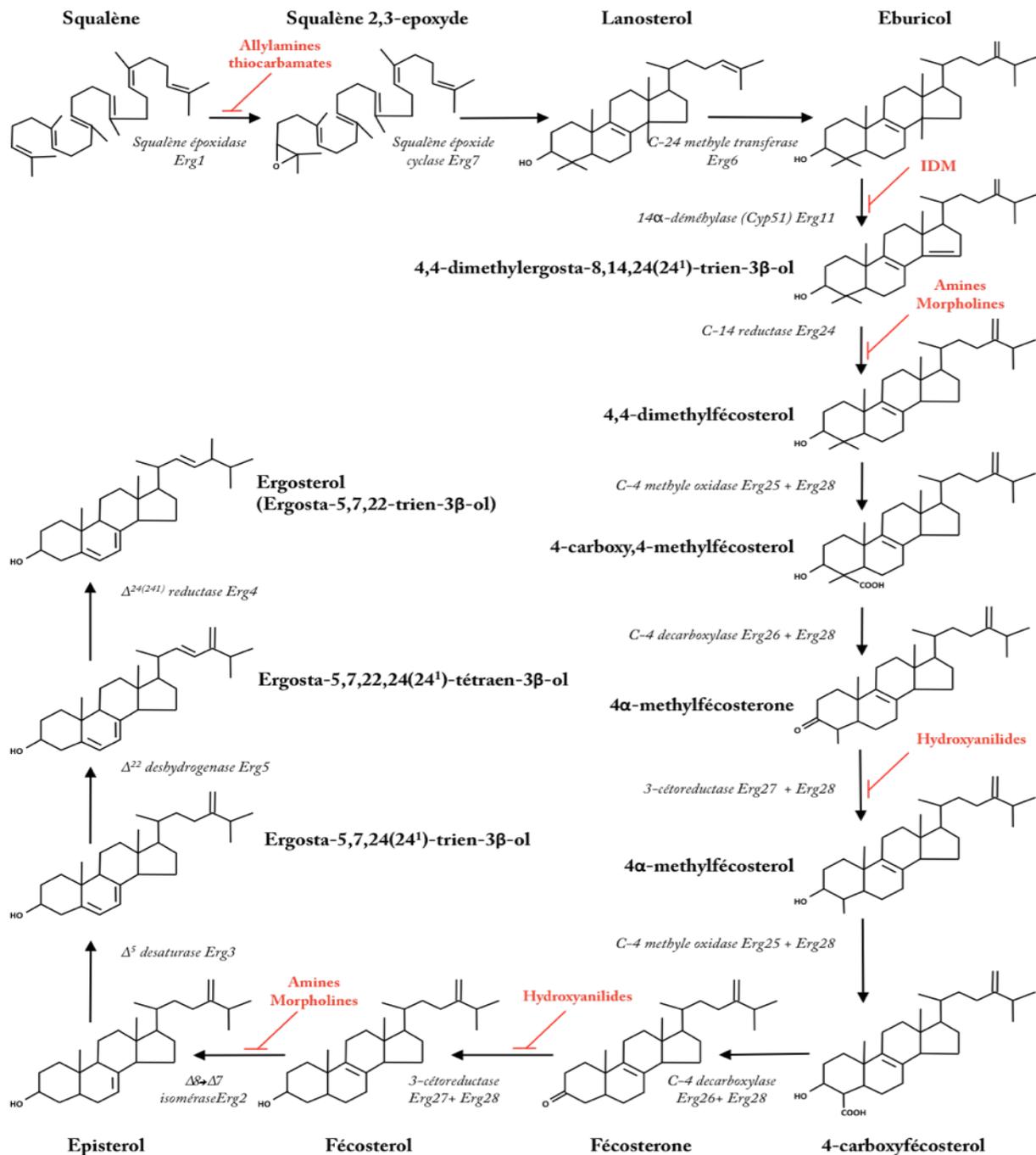


Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez les champignons filamenteux et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS).

- Les inhibiteurs de la 3-cétoréductase (Erg27) :

Le fenhexamid appartenant à la famille des hydroxyanilides introduit en 2000 (Figure 18). Il se caractérise par un spectre d'action restreint (*Botrytis spp*, *Monilia spp* et *Sclerotinia sclerotiorum*). Une nouvelle molécule la fenpyrazamine (en cours

Introduction générale

d'homologation en France) appartenant à la famille des amino-pyrazolinones présente un même spectre d'action que le fenhexamid (FRAC)².

Le fenhexamid inhibe l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne chez *B. cinerea*. Il est sans effet sur la germination des conidies.

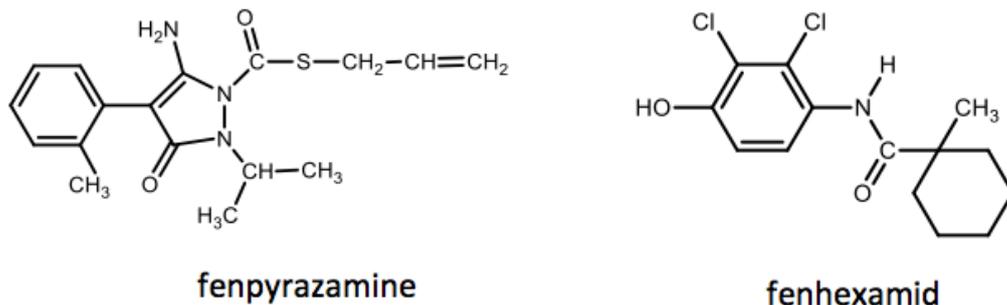


Figure 8 : Structure chimique du fenhexamid et de la fenpyrazamine.

La comparaison des profils en stérols des souches de *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* (Debieu *et al.*, 2001); (Debieu *et al.*, 2013) traitées et non traitées au fenhexamid a permis de déterminer le mode d'action du fenhexamid. Cette comparaison a mis évidence que le stérol majoritaire chez les souches testées non traitées est l'ergostérol, tandis que chez les souches de *B. cinerea* traitées le taux des composés stérones est important. Les composés stéroliques intermédiaires détectés (principalement 4 α -méthylfécostérone, 4 α -méthylfécostérol, fécostérone, épistéron) et l'absence des composés produits par les deux enzymes C-4 méthylxidase et C-3 déshydrogénase qui précèdent la 3-cétoréductase (Erg27). Ceci suggère une inhibition de 3-cétoréductase. Des études d'inhibition de la 3-cétoréductase *B. cinerea* réalisées à partir des microsomes a montré que le fenhexamid est un bon inhibiteur de la 3-cétoréductase NADPH dépendant (Debieu *et al.*, 2013).

² FRAC Code List© 2013.

Introduction générale

La fenpyrazamine est parmi les derniers fongicides mis au point. Des tests réalisés sur des grappes aux champs ont montré que la fenpyrazamine montre une efficacité très importante sous différentes conditions contre *B. cinerea*. La germination des conidies n'est pas affectée par le traitement à la fenpyrazamine. Cependant, il inhibe l'élongation de tube germinatif avec des changements morphologiques observés tels que des gonflements. Des analyses des profils de stérols de *B. cinerea* par GC-MS a détecté un faible taux de l'ergostérol avec des concentrations élevées des substrats de 3-cétoréductase, ce qui suggère que la fenpyrazamine inhibe la 3-cétoréductase. Des essais *in vitro* de l'enzyme confirme que la fenpyrazamine cible la 3-cétoréductase. ($IC_{50}=0,15\mu M$) (Soichi Tanaka *et al.*, 2013).

9. Les fongicides anti-botrytis autorisés en France.

Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur les différentes familles chimiques utilisées pour lutter contre *B. cinerea* en France. Les familles chimiques anti-botrytis autorisées (Walker *et al.*, 2013) se caractérisent par des modes d'actions différentes : Les thiophanates représenté par le *thiophanate méthyl*. Il inhibe l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne en se fixant sur la β -tubuline (Clemons & Sisler, 1971, Davidse, 1973). Après plusieurs années d'utilisation, des souches résistantes ont été sélectionnées chez *B. cinerea*. La famille des N-phenyl carbamates *diethofencarbe* est largement utilisée contre la pourriture grise en association avec la carbendazime, un benzimidazole. A cause de l'émergence des souches résistantes, l'utilisation des fongicides anti-microtubules a diminué et ils ont été remplacés par des fongicides d'autres modes d'action.

En France, un seul fongicide multi-site est autorisé. Il s'agit du thirame appartenant à la famille des dithiocarbamates. Son utilisation est limitée à une application par saison à cause de sa faible efficacité contre *B. cinerea* ainsi que de sa faible pénétration dans la plante. Le thirame cible plusieurs fonctions thiol des enzymes impliquées dans la respiration des spores.

Introduction générale

D'autres fongicides ciblent les enzymes impliqués dans le processus respiratoire : En France, deux fongicides sont autorisés; le premier est le fluazinam qui inhibe la germination des spores et la croissance mycélienne chez *B. cinerea*. Il s'agit d'un découplant de la phosphorylation oxydative. Le fluazinam peut être appliqué une fois par saison. Le deuxième fongicide est le boscalid, un pyridine-cardoxamide, introduit en France en 2005. C'est un inhibiteur du complexe II (Succinate déshydrogénase). Il bloque le transfert d'électrons du succinate vers l'ubiquinone, en se positionnant dans une zone délimitée par les sous unités de la SDH (SdhB, SdhC et SdhD) (White et al., 1978; Ramsay et al., 1981). Le fluopyram ayant le même mode d'action est homologué depuis 2013 (Bayer CropScience).

Il existe deux familles chimiques affectant l'osmo-régulation chez *B. cinerea*. Il s'agit des dicarboxamides (Iprodione) et celle des phénylpyrroles représentée par le fludioxonil. Ces deux familles interfèrent avec la signalisation osmotique probablement via une histidine kinase (Fillinger et al., 2012).

La famille des anilinopyrimidine Pyriméthanil est utilisée aussi comme anti-botrytis. Des études suggèrent que cette famille inhibe la biosynthèse de la méthionine (Masner et al., 1994; Fritz et al., 2003).

En ce qui concerne l'utilisation des inhibiteurs des biosynthèses des stérols, le fenhexamid est le seul fongicide autorisé en France pour lutter contre la pourriture grise. Il peut être appliqué une fois par saison.

En France, l'utilisation des fongicides anti-botrytis est variable selon les vignobles. Par exemple en Alsace deux familles chimiques sont utilisées : les anilinopyrimidines et les phénylpyrroles, tandis que en Champagne cinq familles chimiques sont utilisées anilinopyrimidines, pyrimidine, hydroxyanilide, phénylpyrroles et SDHI (Figure 20) (Walker et al., 2013).

Introduction générale

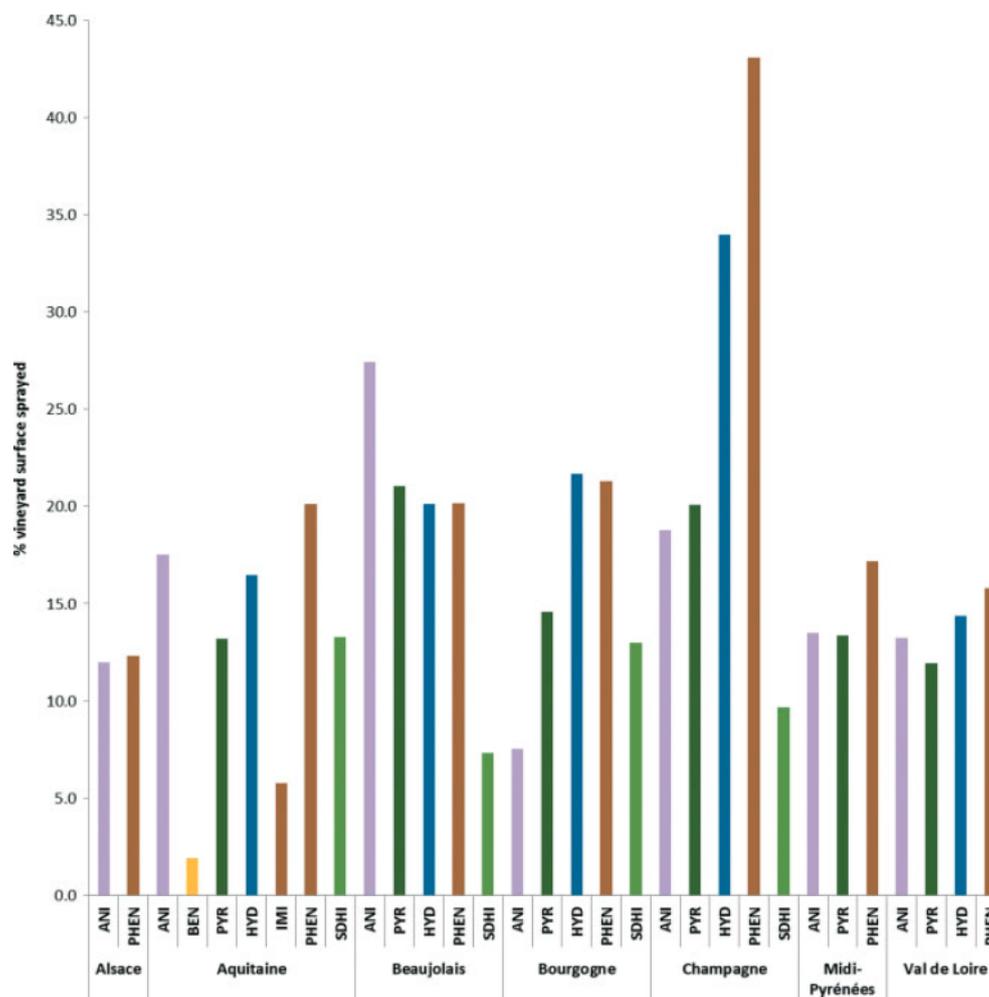


Figure 9 : La proportion de vignes traitées avec différents botryticides dans sept régions du territoire français. ANI : anilinopyrimidine, PHEN : phenylpyrroles, BEN : benzimidazole, PYR : pyrimidine, HYD : hydroxyanilide, IMI : dicarboximides, SDHI : succinate dehydrogenase inhibitors (Walker et al., 2013)

10. La résistance aux fongicides : définitions et notions.

Avant de détailler le phénomène de résistance aux fongicides chez *B. cinerea*, nous allons introduire les définitions et termes nécessaires à la compréhension de ce paragraphe.

La résistance innée, intrinsèque ou naturelle concerne une population ou une espèce insensibles à un fongicide (Mouches, 2005), alors que la résistance acquise résulte d'un polymorphisme intra-espèce qui sera sélectionné par le fongicide considéré.

Par ailleurs, la résistance à un fongicide peut être appréhendée au niveau individuel et populationnel.

- Résistance individuelle : dans ce cas, on parle d'une résistance biologique (Figure 21) qui définit la diminution de la sensibilité à un fongicide d'un individu. Elle peut être quantitative ou qualitative. Dans le cas d'une résistance quantitative, le niveau de sensibilité d'un individu à un fongicide décroît progressivement avec l'application de celui-ci. Il s'agit de l'accumulation de plusieurs mutations ayant des effets additifs (déterminisme polygénique) (Deising *et al.*, 2008).

Dans le cas d'une résistance qualitative, une seule mutation confère un niveau de résistance à un individu dans la population suffisant pour survivre au traitement fongicide et être sélectionné. Elle est généralement due à une seule mutation, donc monogénique. La résistance biologique peut s'évaluer par la mesure d'activité biologique en conditions contrôlées (sur milieux nutritifs ou sur tissus végétaux). Cette mesure consiste à déterminer des CI_{50} (concentration inhibant de 50 l'activité biologique mesurée) ou des CMI (Concentration minimale inhibitrice). Les CI_{50} peuvent être mesurées sur l'élongation du tube germinatif ou sur la croissance mycélienne. On peut la déterminer aussi sur l'enzyme cible appelé alors I_{50} (Concentration inhibant 50% l'activité enzymatique de la cible) (Milgroom *et al.*, 1989). Les valeurs de CI_{50} ou de I_{50} permettent de déterminer les facteurs de résistance en calculant les ratios entre la CI_{50} de la souche testée avec celle d'une souche sensible.

Introduction générale

La résistance au niveau individuel résulte généralement d'une mutation (déterminisme monogénique). Elle peut entraîner la résistance à plusieurs fongicides différentes (même mode d'action ou non). Dans ce cas, on parle de résistance croisée positive. A contrario, si elle entraîne une hypersensibilité à un autre fongicide, on parle de résistance croisée négative.

La connaissance des résistances croisées est importante pour les recommandations des traitements (combinaisons des fongicides à éviter ou à favoriser).

Cependant, au sein des populations de champignons phytopathogènes la recombinaison sexuelle peut entraîner la combinaison de plusieurs allèles de résistance monogéniques, générant ainsi des souches multi-résistantes.

- Résistance populationnel : elle traduit l'efficacité d'un fongicide et elle est liée à la fréquence des individus résistants dans une population et à leurs niveau de résistance.

Si la fréquence de ces individus résistants augmente dans la population (sous la pression sélective du fongicide), l'on peut atteindre le seuil de résistance pratique, c'est-à-dire le fongicide donné a perdu son efficacité et ne permet plus de contrôler la maladie.

Qu'il s'agisse de résistance qualitative et quantitative, l'application répétée du même fongicide (même mode d'action, même famille chimie) est donc à éviter, car elle favorise la résistance pratique.

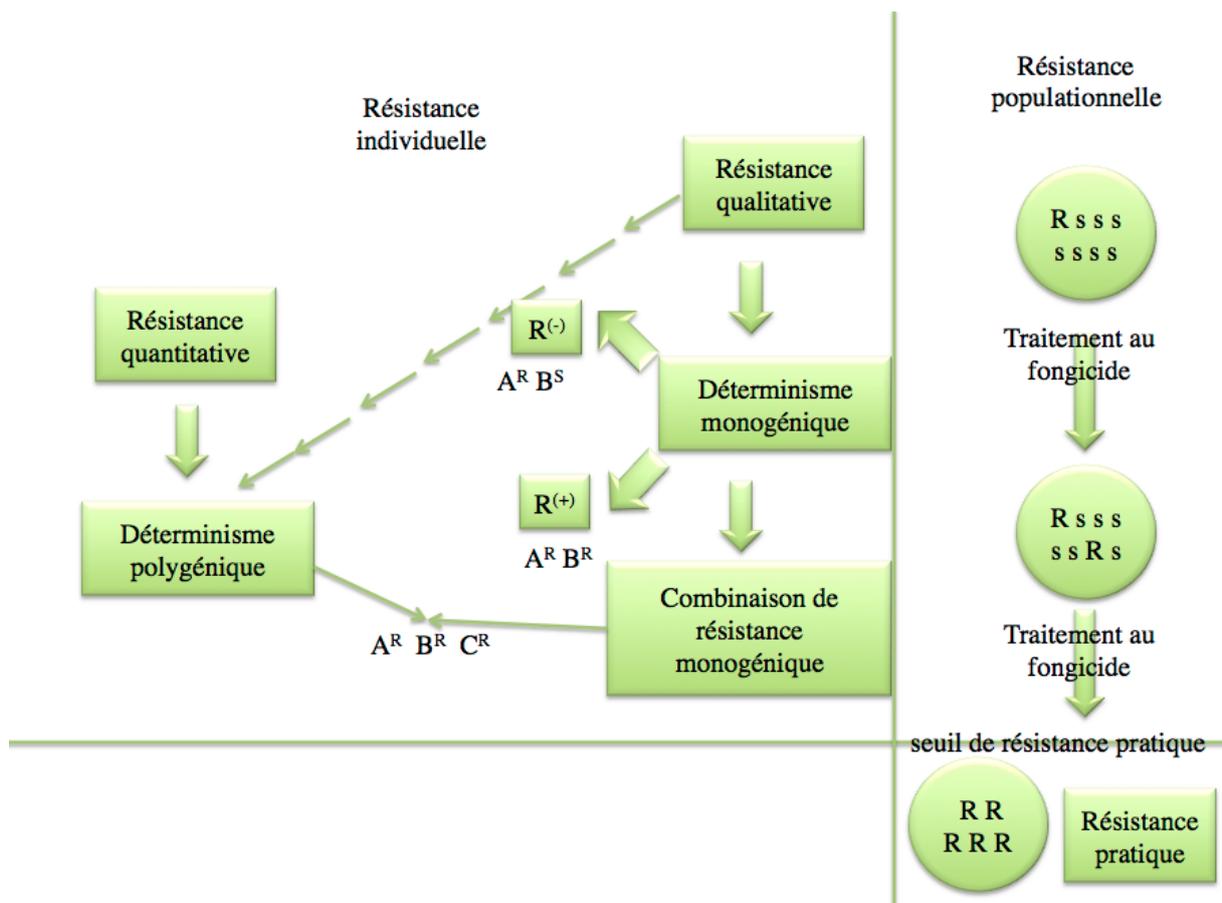


Figure 10 : Schéma récapitulatif des différents types de résistance. s : individu sensible, R : individu résistant, R⁽⁺⁾ : résistance croisée positive, R⁽⁻⁾ : résistance croisée négative, A^RB^S : individu résistant au fongicide A et sensible au fongicide B, A^RB^R : individu résistant aux fongicides A et B. A^RB^RC^R : individu résistance multiple.

10.1. Mécanisme de résistance.

La résistance à un fongicide peut être due à plusieurs mécanismes de résistance : 1/ La modification de la cible est due à une mutation ou un polymorphisme provoquant le changement de la structure de la protéine cible du fongicide. Elle modifie l'affinité du fongicide pour celle-ci. 2/ La surexpression de la cible : ce mécanisme engendre une production massive de la cible ce qui nécessite une dose plus importante de fongicide pour inhiber son activité. 3/ Modification du transport : il s'agit soit une pénétration réduite, c'est-à-dire le fongicide pénètre dans la cellule à des doses insuffisantes pour inhiber la cible, soit d'une excrétion accrue impliquant des transporteurs membranaires. La surexpression de ce(s)

Introduction générale

transporteur(s) non sélectif(s) conduit à une sensibilité réduite à des molécules très variées, appelée également multidrogue-résistance (MDR) 4/ Le contournement par une voie alternative ou un système secondaire est mis en place pour remplacer le système principale qui est enrayé par le fongicide. 5/ La métabolisation : ce mécanisme permet de métaboliser la matière active en des métabolites moins actifs. Il implique trois superfamilles d'enzymes : des hydrolases, des glutathion-S-transférases et des monooxygénases à cytochromes P450.

Le mécanisme de résistance le plus répondu chez les champignons est la modification de cible (Tableau 12). Il entraîne la résistance spécifique à un ou plusieurs fongicides ayant le même mode d'action (même cible, même famille chimique). Depuis deux décennies, on observe également l'apparition de souches résistantes par efflux actif (Tableau 12). Chez *B. cinerea*, trois phénotypes MDR ont été identifiés dans les vignobles : 1/ Le premier phénotype MDR1 résulte de la surproduction du transporteur membranaire de type ABC BcAtrB. Plusieurs mutations différentes (délétion chez les souches du groupe S) du facteur de transcription *mrr1* induisent la surexpression de ce transporteur (Leroch *et al.*, 2013). Les souches MDR1 sont résistantes entre autres aux phénylpyrroles et aux anilinopyrimidines. 2/ Le deuxième phénotype MDR2 est dû à la surexpression du transporteur de type MFS (major facilitator superfamily) BcMfsM2, généré par une insertion unique dans son promoteur. Les souches MDR2 sont plutôt résistantes aux SDHI, aux IDM et au fenhexamid. 3/ Le phénotype MDR3 est une combinaison de MDR1 et MDR2 par recombinaison génétique (Tableau 12). Par conséquence, les souches MDR3 cumulent les deux spectres de résistance (Leroux *et al.*, 1999, Kretschmer & Hahn, 2008, Leroux & Walker, 2013).

Introduction générale

Tableau 12 : Tableau résumant les mécanismes de résistance aux anti-botrytis.

Mode d'action	Résistance au champ	Détection des résistances spécifiques en France			Références
		Phénotypes	Génotype	Type/ mécanisme de résistance	
Multi-sites	-	-	-	-	
Inhibiteurs de microtubules	+	BenR1	<i>mbc1</i> E198A	Mutation de cible	(Yarden & Katan, 1993, Leroux et al., 2002, Zhao <i>et al.</i> , 2010)
	+	BenR2	<i>mbc1</i> F200Y	Mutation de cible de cible	
Inhibiteurs de complexe II	+	CarR1-CarR7	<i>sdhB</i> H272Y/R/L, N230I,P225L/T/F <i>sdhDH</i> 338R	Mutation de cible	(Avenot & Michailides, 2010, Kim & Xiao, 2010, Leroux <i>et al.</i> , 2010, Veloukas & Karaoglanidis, 2012)
Découplant phosphorylation oxydative	-	-	-	-	(Tamura, 2000)
Inibiteurs de la biosynthèse de la méthionine	+	AniR1	n.d	Mécanisme inconnu	(Leroux et al., 2002, Fritz <i>et al.</i> , 2003, Bardas <i>et al.</i> , 2008)
Inhibiteurs de l'osmo-régulation	+	ImiR1	<i>bos1</i> , I365N/R/S et autres	n.d	(Leroux et al., 2002, Liu et al., 2011, Fillinger et al., 2012)
Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols	+	HydR1	*	Résistance naturelle	(Debieu et al., 2001, Leroux et al., 2002, Fillinger <i>et al.</i> , 2008, Billard <i>et al.</i> , 2012, Seiya Saito <i>et al.</i> , 2010)
		HydR2	**	Inconnu	
		HydR3 ⁺	<i>erg27</i> F412S/I/V	Mutation de la cible	
		HydR3 ⁻	<i>erg27</i> L195F, V309M, A314V, S336C, N369D, L400F/S		
Tous	-	MDR1,MDR2,MDR3		Transport membranaire ; excrétion accrue	(Leroch et al., 2013b, (Leroux et al., 1999, Kretschmer & Hahn, 2008, Leroux & Walker, 2013).

ND : non déterminé.

* : Le mécanisme de résistance fera l'objectif du chapitre I.

** : Le mécanisme de résistance fera l'objectif du chapitre II

10.2. Etat de résistance du complexe *Botrytis* au fenhexamid:

Au sein des populations de pourriture grise trois phénotypes résistants au fenhexamid ont été identifiés: HydR1, HydR2, HydR3 (Leroux et al, 2002). Les deux derniers correspondent à l'espèce *Botrytis cinerea*, concernée par la résistance acquise alors que HydR1 correspond à l'espèce *Botrytis pseudocinerea* naturellement résistant au fenhexamid.

10.2.1. La résistance acquise au fenhexamid chez les souches (HydR3) *B. cinerea*:

Le phénotype HydR3 décrit pour la première fois en 2002 a été divisé en deux sous-catégories en fonction du niveau de résistance au fenhexamid des souches ; HydR3⁻ pour les moins résistantes et HydR3⁺ pour les plus fortement résistantes (Fillinger et al., 2008). Comme nous l'avons mentionné précédemment, le fenhexamid inhibe la 3-cétoréductase (Erg27) impliquée dans la biosynthèse des stérols. Le séquençage du gène *erg27* a permis d'identifier la mutation du résidu F412 chez les isolats HydR3⁺ (F412S, 85% des isolats), (F412I, 11,5% des isolats) et (F412V, 3,5% des isolats). Le phénotype HydR3⁻ résulte d'une de ces sept mutations ont été identifiées (L195F, V309M, A314V, S336C, N369D et L400F/S) (Albertini & Leroux, 2004) (Fillinger et al., 2008) (Figure 22).

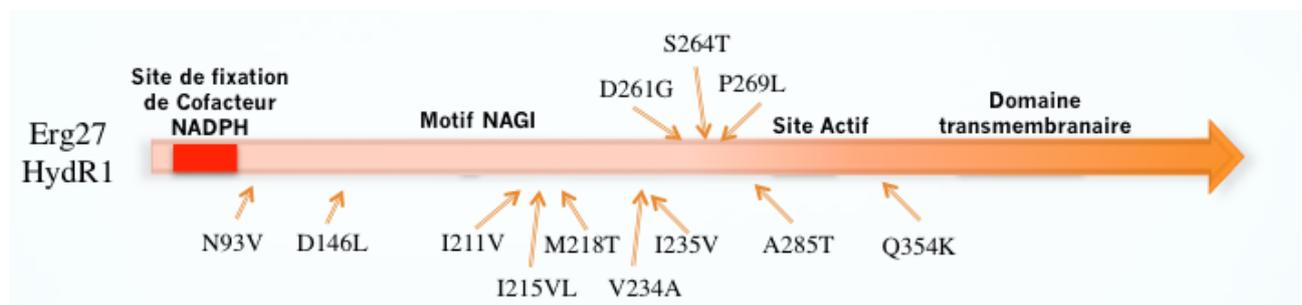


Figure 11 : La structure et les domaines fonctionnels de la protéine 3-cétoréductase Erg27 de *B. cinerea*. Les mutations détectées chez les HydR3⁻ sont indiquées par les flèches noires alors que les mutations identifiées chez les HydR3⁺ sont indiquées en rouge.

Des études biochimiques réalisées sur les souches HydR3 ont montré une diminution de l'affinité du fenhexamid pour la 3-cétoréductase, avec une diminution plus importante chez

Introduction générale

les HydR3⁺ par rapport aux HydR3⁻ (Debieu *et al.*, 2013). D'autres études (Fillinger *et al.*, 2008 (Billard, 2011) ont confirmé l'implication de ces mutations dans la diminution de l'affinité de la 3-cétoréductase pour le fenhexamid et par conséquent, l'impact de ces mutations dans la résistance au fenhexamid. Ce type de résistance a fait l'objet de la thèse d'Alexis Billard et ne sera pas repris ici.

La fréquence des HydR3 a augmenté ces dernières années ainsi que le nombre des parcelles présentant des souches HydR3. La fréquence des souches HydR3 est proportionnelle au nombre de pulvérisation (Figure 23), c'est-à-dire que le traitement par le fenhexamid exerce une pression de sélection positive sur les souches HydR3. D'ailleurs, il est limitée à une seule pulvérisation par saison pour maintenir la fréquence des souches HydR3 stable (Walker *et al.*, 2013).

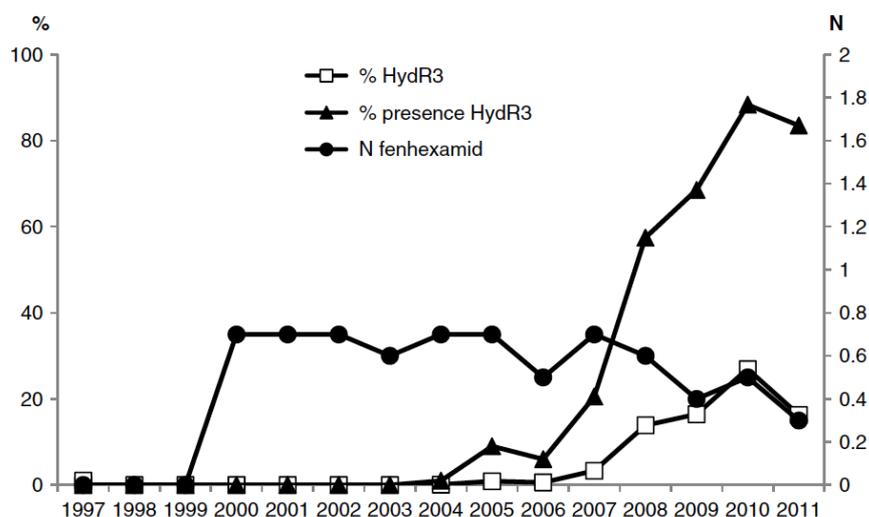


Figure 12 : Evolution de la résistance de *B. cinerea* aux hydroxyanilides dans les vignobles de la région Champagne et la pression de sélection en fonction de nombre de traitements par saison (Walker *et al.*, 2013). La fréquence moyenne des souches HydR3 dans les échantillons : \square , la fréquence des parcelles présentant des souches HydR3 : \blacktriangle , le nombre de traitements \bullet .

10.2.2. La résistance acquise au fenhexamid chez les souches HydR2 de *B. cinerea* :

Les souches HydR2 de *B. cinerea* sont très rares dans les vignobles français. Seules quelques souches ont été isolées en Allemagne et au Japon dans les parcelles d'essai. Le séquençage du

Introduction générale

gène *erg27* chez les isolats HydR2 n'a révélé aucune différence par rapport aux souches sensibles (Billard, *comme perso*).

Des études de synergie menées sur les isolats HydR2 ont montré l'existence d'un effet synergique entre le fenhexamid et les inhibiteurs de la C14-déméthylase (IDM), une monooxygénase à cytochrome P450, ce qui suggère l'implication d'un cytochrome P450 dans la résistance au fenhexamid (Leroux et *al.*, 2002).

10.2.3. La résistance naturelle au fenhexamid de *B. pseudocinerea* (HydR1):

Le phénotype HydR1 correspond à l'espèce *B. pseudocinerea* naturellement résistante au fenhexamid. Les souches HydR1 sont faiblement représentées dans les populations de la pourriture grise (Walker et *al.*, 2011). Des études menées sur des isolats HydR1 ont montré une sensibilité aux inhibiteurs de la 14 α -déméthylase (IDM), aux inhibiteurs de la Δ 14 réductase, à certains SDHI (Boscalid) et aux inhibiteurs de la biosynthèse des phospholipides (Edifenphos).

Le séquençage du gène *erg27* (Tableau 12) a révélé la présence de 12 acides aminés polymorphes chez *B. pseudocinerea* par rapport à *B. cinerea*. Des études réalisées par Debieu et *al* suggèrent que les 12 acides aminés sont impliqués dans la perte d'affinité du fenhexamid pour l'enzyme 3-cétoréductase (Debieu et *al.*, 2013). Cependant, les profils de résistance au fongicides ainsi que les points cités ci-dessous étaient en faveur d'un autre mécanisme de résistance que la modification de la cible pour cette espèce cryptique.

Il s'agit notamment de

- La Synergie entre le fenhexamid et les inhibiteurs de la 14 α -déméthylation (Leroux et *al.*, 2002 ; Billard, 2011).
- La résistance croisée négative entre le fenhexamid et l'edifenphos, un phosphorothiolate utilisé contre le pathogène du riz *Magnaporthe oryzae*. Il s'agit

Introduction générale

d'un pro-fongicide dont l'activation nécessite le clivage d'une liaison P-S (Uesugi, 2001). L'hypersensibilité de *B. pseudocinerea* à l'édifenphos suggère une activation de ce pro-fongicide par un mécanisme similaire

- Le profil de métabolisation du fenhexamid entre *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* (Suty et al., 1999). Cette analyse par chromatographie sur couche mince faite par Bayer a montré que certaines souches résistantes au fenhexamid avant son introduction (celles correspondant à l'espèce *B. pseudocinerea*) dégradent le fenhexamid en d'autres molécules, alors que cette dégradation n'était pas observée chez des souches sensibles de *B. cinerea*.

L'ensemble de ces données suggérait alors que la résistance naturelle de *B. pseudocinerea* était liée à la métabolisation du fenhexamid probablement par un cytochrome à P450.

Au cours de sa thèse, Alexis Billard a recherché et identifié le gène *bc1g_02909* codant une monooxygénase à cytochrome P450 responsable de la résistance de *B. pseudocinerea* au fenhexamid.

11. Objectifs de la thèse.

Les objectifs de cette thèse sont de caractériser finement les phénomènes de résistance au fenhexamid rares (HydR1 et HydR2) et de développer un outil pour les détecter et quantifier dans les populations de pourriture grise. Concrètement, nous allons décrire dans les chapitres suivants :

1. L'étude de la résistance au fenhexamid chez *B. pseudocinerea* (HydR1) : le rôle du polymorphisme du gène *erg27* et l'implication du cytochrome BC1G_02902 dans cette résistance.
2. Développement d'une méthode de qPCR espèce spécifique pour détecter et quantifier la présence de *B. pseudocinerea* au sein de population de pourriture grise.

Introduction générale

3. L'analyse génétique du phénotype Hydr2 et cartographie génétique afin de localiser le locus *hydr2* chez *B. cinerea*.

Chapitre I

Implication de Cyp684 dans la résistance au fenhexamid chez *B.* *pseudocinenrea*

Avant propos

L'étude de la résistance naturelle au fenhexamid chez l'espèce *B. pseudocinerea* fait suite au travail de thèse d'Alexis Billard (Billard, 2011). En plus d'avoir montré une synergie entre l'IDM prochloraz et le fenhexamid, il a montré par remplacement génique que le gène *erg27^{B.pseudocinerea}* ne contribuait que faiblement à la résistance au fenhexamid. Se basant sur l'hypothèse qu'une monooxygénase à cytochrome P450 était impliquée dans la résistance naturelle de

B. pseudocinerea, il a recherché et identifié le gène *bc1g_02902* codant un P450 nécessaire à cette résistance.

Le manuscrit qui suit reprend donc une partie du travail de thèse d'A. Billard, ainsi que les résultats que j'ai obtenus au cours de la présente thèse, notamment la caractérisation moléculaire du gène *cyp684* chez *B. pseudocinerea* et d'autres espèces proches, l'étude de son expression chez *B. cinerea* et *B. pseudocinerea*, ainsi que l'analyse des domaines protéiques. Par ailleurs, j'ai déterminé les facteurs de résistance et de synergie au fenhexamid de toutes les souches et mutants de cette étude. Le manuscrit devrait être soumis pour publication prochainement.

En fin de chapitre, nous présenterons des résultats supplémentaires permettant d'aborder d'autres aspects d'étude de ce mécanisme de résistance très original.

Article : Natural fenhexamid resistance in *B. pseudocinerea* involves the cytochrome P450 Cyp684.

Natural fenhexamid resistance in *B. pseudocinerea* involves the cytochrome P450 Cyp684.

Billard. A*; Azeddine. S*; Audéon. C; Bach. J; Lanen. C; Debieu. D⁺; Fillinger.S⁺

INRA UMR 1290 BIOGER-CPP *avenue Lucien Brétignières 78850 Thiverval-Grignon France,*

* :

I. Introduction.

Grey mould is a fungal disease affecting over than 200 host-plants caused by a species complex with two characteristics species, the major species *Botrytis cinerea* and the minor species *Botrytis pseudocinerea* present at 0-15% in grey mould populations (Walker *et al.*, 2011).

Several criteria were used to describe *B. pseudocinerea* (Giraud *et al.*, 2008). The phylogenetic species concept confirmed that *B. pseudocinerea* corresponded to an isolated gene pool, the biological species concept revealed the presence of an interspecies barrier not allowing crosses between the two species, whereas, the morphological species concept did not show any morphological difference between *B. cinerea* and *B. pseudocinerea*. Finally, the ecological species concept showed that *B. pseudocinerea* is most frequently detected on dead plant tissue and at late spring season. These criteria demonstrated th

at *Botrytis pseudocinerea* is an independent species and that it lives in sympatry with *B. cinerea* (Walker *et al.*, 2011).

The two species differ in their sensitivity to fungicides. *B. pseudocinerea* shows especially strong sensitivity to the phosphorothiolate fungicide edifenphos (Leroux *et al.*, 2002) and resistance to the 3-ketoreductase-inhibitor fenhexamid at the mycelial stage. In contrast, *B. cinerea* isolates are resistant to edifenphos and sensitive to fenhexamid (Leroux *et al.*, 2002).

Fenhexamid belongs to the hydroxyanilide family. It inhibits the 3-ketoreductase enzyme of the C4-demethylation complex involved in ergosterol biosynthesis (Debieu *et al.*, 2001; 2013). This chemical compound has a spectrum restricted to *B. cinerea* and to the phylogenetically closest species such as *Monilia spp* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Rosslénbroich & Stuebler, 2000).

Besides the naturally resistant species *B. pseudocinerea* (formerly known as HydR1), strains resistant to fenhexamid were also identified and characterized among *B. cinerea* isolates

Chapitre I

(HydR3, HydR2) that have acquired the resistance after the introduction of this botryticide (Leroux et al., 2002, Leroux *et al.*, 1999).

The difference in resistance to fenhexamid between *B. pseudocinerea* and *B. cinerea* therefore is selection of resistance. While the first species was resistant before the introduction of fenhexamid (natural resistance), the second species developed resistance later, which was then selected by the fungicide (acquired resistance).

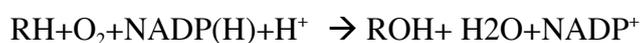
The HydR3 phenotype is split into the categories HydR3⁻ and HydR3⁺. They present moderate to high levels of resistance, respectively, both at germ tube elongation and mycelial growth stages. The resistance mechanism is due to modifications of the 3-ketoreductase target enzyme (Erg27). HydR3⁺'s Erg27 protein sequence presents a modification of the phenylalanine at the C-terminus of the putative transmembrane domain at position 412, either to serine, to isoleucine or to valine. In HydR3⁻ strains, Eight different amino acid replacements were found in erg27 alleles either as single or as double mutations (L195F, N196Y, V309M, A314V, S336C, N369D, L400F/S) (Fillinger *et al.*, 2008). In *B. pseudocinerea* Erg27, twelve amino acids differ from those found in *B. cinerea* (N39V, D146L, I211V, I215V, M218T, V234A, I235V, D261G, S264T, P269L, A285T and Q354K) (Albertini & Leroux, 2004). None of the polymorphic amino acids identified in HydR3^{+/-} strains corresponds to those found in *B. pseudocinerea* strains. Biochemical studies have shown that erg27 mutations strongly decrease the affinity of fenhexamid for 3-ketoreductase (Debieu *et al.*, 2013). Some or all of the 12 different amino acids in the Erg27 protein of *B. pseudocinerea* (HydR1) may be responsible for the major decrease in the affinity of fenhexamid for 3-ketoreductase, revealed by biochemical studie (Debieu et al., 2013).

Several evidences suggest a different (additional) mechanism responsible for *B. pseudocinerea*'s natural resistance to fenhexamid: i/ a synergistic effect between fenhexamid and the DMIs prochloraz or tebuconazole (Leroux et al, 2002); ii/ hypersensitivity to

Chapitre I

edifenphos a pro-fungicide whose activation requires cleavage of a P-S link. This activation involves a cytochrome P450 monooxygenase (Sugiura *et al.*, 1993), iii/ Studies of Suty *et al.* (Suty *et al.*, 1999) indicated, that *B. pseudocinerea* is able to metabolize fenhexamid. All together these results suggest the involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in this case of fenhexamid resistance.

Cytochrome P450 proteins, named for their absorption band at 450 nm due to their carbon – monoxide bound form (Garfinkel, 1958), constitute one of the largest superfamilies of enzymes. They are classified on the basis of protein sequence identity and phylogeny into a family, if more than 40% identical with their homologs, and into the subfamily in the case of more than 55% identity (Nelson *et al.*, 1996). The reactions catalysed by P450s are based on the activation and heterolytic cleavage of molecular oxygen, with the insertion of one atom into the substrate and the reduction of the other to form water, with concomitant oxidation of the co-enzyme NADPH or NADH (reviewed in Mansuy, 1998, Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). The general reaction can be summarized as follows:



Cytochrome P450s are present in all biological kingdoms where they are involved in different vital processes. Only Cyp51 is conserved in all phyla from animals and plants to fungi. Its enzymatic function is that of 14 α -demethylase. In yeasts and filamentous fungi it catalyses C14-demethylation of lanosterol and eburicol, respectively (Kalb *et al.*, 1986, Warrilow *et al.*, 2008).

To date, two classifications are used to differentiate CYPs: (a) an old nomenclature including 4 classes. (b) a new nomenclature proposed by Hannemann (2006) distinguishes 10 classes and seems to be more stringent for some particular cases. In this manuscript we will use the old classification based on the electron donor associated with cytochrome P450 reductase. Class I P450s require FAD containing reductase and iron sulphur redoxin; class II proteins

Chapitre I

only need an FAD/FMN containing P450 reductase for electron transfer, whereas class III enzymes do not need any electron donor. Finally, class IV proteins receive electrons directly from NADPH (Paine *et al.*, 2005).

In eukaryotes, class I P450s are characteristic of the inner mitochondrial membrane. Generally, mitochondrial P450s are found in insects, nematodes and mammals. Class II enzymes are most common in eukaryotes; they are integral membrane proteins of the endoplasmic reticulum (ER). In fungi, they are involved in sterol and mycotoxin biosynthesis, detoxification of phytoalexins and lipid metabolism. Class III P450s are involved in the synthesis of signalling molecules, such as jasmonate in plants. Class IV is a unique soluble fungal cytochrome P450; it reduces NO to N₂O (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Nguyễn, 2010).

Although sequence identity among P450 proteins is often below 20%, the cytochrome P450 enzymes are characterized by conserved motifs. The first is the heme-binding loop (F-X-X-G-X-R-X-C-X-G) with the highly conserved cysteine located before the L helix; the second one is E-X-X-R, located in the K helix is needed to stabilize the core structure, and last motif is A/G-G-X-D/E-T-T/S which corresponds to the proton transfer groove. The N-terminal region is highly variable; it serves as membrane anchor and frequently contains a cluster of prolines (P-P-X-P) preceded by a cluster of basic residues. Most eukaryotic P450s are associated with microsomal membranes (Lewis, 2001, Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). In the cytochrome P450 proteins, six substrate recognition sites (SRS) are generally present, predicted on the basis of the three dimensional structure and the sequence alignments to the Cyp102 protein (Gotoh, 1992).

The involvement of cytochrome P450s in the resistance to xenobiotics is widespread among insects (Mouches, 2005) and plants, while it is rare in fungi. The first case of resistance to fungicides was described in *Magnaporthe oryzae* towards edifenphos. The activation of this

pro-fungicide requires P-S cleavage by a cytochrome P450. In resistant strains, edifenphos is not metabolised and therefore not activated (Uesugi & Takenata, 1992). The resistance is probably due to a mutation in a cytochrome P450 encoding gene.

In this work we evaluated the role of the polymorphism of the *B. pseudocinerea erg27* gene in the natural resistance to fenhexamid and we aimed to identify the additional resistance mechanism suspected to explain also the synergy between DMIs and fenhexamid through the identification of a potentially involved cytochrome P450.

II. Experimental procedures

Fungal strains, medium and culture condition

All strains used in this study are listed in Table 1. The *B. cinerea* strain B05.10 whose genome has been sequenced (Amselem *et al.*, 2011) was used as wild type reference and recipient strain for transformation. The *B. pseudocinerea* strain 900 was used for gene inactivation experiments. All strains were grown on NY medium (2 g malt, 2 g yeast extract and 12.5 g agar per 1 L of deionized water) at 23 °C, under continuous white light, to maximize conidia production.

Table13: list of strains used in this study.

Strains	Genotype	Species	Origin
B05.10	HydS	<i>B. cinerea</i>	Germany
VD661	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD340	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD681	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD933	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD359	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD207	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD213	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD390	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD226	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
VD969	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
L	HydS	<i>B. cinerea</i>	Champagne
900	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD200R	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD312	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD233	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD696	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD256	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD320	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD231	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD195	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD184	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD296	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
VD165	HydR1	<i>B. pseudocinerea</i>	Champagne
2220	HydS	<i>B. fabae</i>	Tunisia
2230	HydS	<i>B. fabae</i>	Tunisia
2235	HydS	<i>B. fabae</i>	Tunisia
2240	HydS	<i>B. fabae</i>	Tunisia
1988	HydS	<i>B. pelargonii</i>	van Kan collection
1999	HydR	<i>B. calthae</i>	van Kan collection
erg27(5)	B05.10: erg27 ^{B.pseudocinerea-hph}	<i>B. cinerea</i>	In this study
erg27(14)	B05.10: erg27 ^{B.pseudocinerea-hph}	<i>B. cinerea</i>	This study
erg27(18)	B05.10: erg27 ^{B.pseudocinerea-hph}	<i>B. cinerea</i>	This study
erg27(21)	B05.10: erg27 ^{B.pseudocinerea-hph}	<i>B. cinerea</i>	This study
900A	900 Δ cyp684	<i>B. pseudocinerea</i>	This study
900B	900 Δ cyp684	<i>B. pseudocinerea</i>	This study
900C	900 Δ cyp684	<i>B. pseudocinerea</i>	This study

Fungicide susceptibility assay

Prochloraz and fenhexamid were kindly provided by Bayer CropScience (Monheim, Germany). Ethanolic stock solution of these fungicide were kept at 4°C. All dilutions were made in ethanol.

Susceptibility to fenhexamid (Bayer CropScience) was assayed in all strains and transformants, on the basis of mycelial growth. It was measured on 90 mm-diameter Petri dishes containing 20 ml of YSS medium (1.5 g L⁻¹ K₂HPO₄; 2 g L⁻¹ KH₂PO₄; 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0.5 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 2 g L⁻¹ yeast extract; 10 g L⁻¹ and 12.5 g L⁻¹) with a range of fenhexamid concentrations (0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 mg L⁻¹)

Chapitre I

with 0.1% ethanol final concentration. For each set of conditions tested, we inoculated three petri dishes with a non-sporulating mycelial plug (4 mm in diameter) from a four-day-old culture grown on YSS in the dark. Plates were incubated at 20°C in the dark and colony diameters recorded after 3 and 4 days of incubation. We calculated an EC₅₀ value (effective fungicide concentration required to inhibit mycelial growth by 50%) with GraphPad prism 5.03 software, using nonlinear regression curve to logarithmic fungicide concentrations. Resistance factors (RF) were deduced as ratio of the EC₅₀ of the analysed strain to that of the B05.10 reference strain. The strains were classified as hypersensitive (RF<0.5), sensitive (0.5≤RF≤3), weakly resistant (3≤RF≤10), moderately resistant (10≤RF≤100) and highly resistant (RF>100).

For gene expression analyses mycelium were cultivated in liquid YSS medium inoculated with 10⁵ spores mL⁻¹ and incubated at 23°C at 150 rpm for 22 hours. The culture was divided into separate cultures that were amended with fenhexamid at a final concentration of 10 mg l⁻¹ or with ethanol 0.1% for the control and further incubated during 0, 30, 60, 90 minutes.

Synergy determination

The interaction between fenhexamid and prochloraz was quantified by testing ranges of these fungicides alone (fenhexamid: 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 mg L⁻¹ or prochloraz: 0, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg L⁻¹) and as mixture (fenhexamid : prochloraz with a mass ratio of 2:1 at 0, 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 mg L⁻¹) on mycelial growth. EC₅₀ values were calculated with Graph prism 5.03 software, using a nonlinear curve fitted to log(fungicide concentration). The Wadley formula (Gisi *et al.*, 1985) describing the theoretical response of fungicides (EC_{50theo}) of a two component mixture as: $EC_{50theo} = (a+b)/(a/EC_{50A} + b/EC_{50B})$ where A and B represent the two tested compounds (fenhexamid and prochloraz, respectively), a and b their ratio in the

Chapitre I

mixture was used to calculate level of interaction, calculated as follows $SF = EC_{50\text{theo}}/EC_{50\text{obs}}$ in which $EC_{50\text{obs}}$ is the observed EC_{50} value of the specific mixture. By definition additive interaction is at work if $SF = 1$, synergism if $SF > 1$ and antagonism if $SF < 1$. Because of the strong biological variation of the test system, synergism was considered significant if $SF \geq 1.5$ (Gisi et al., 1985, Stergiopoulos *et al.*, 2002).

Nucleic acid manipulations

Is not otherwise indicated all procedures were performed according to standard protocols (Green & Sambrook, 2012). All primer sequences are listed in Table 2.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from one-week-old *B. cinerea* mycelium grown on YSS media (1.5 g L⁻¹ K₂HPO₄, 2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, 2 g L⁻¹ yeast extract, 10 g L⁻¹ and 12.5 g L⁻¹ agar) using a Sarcosyl based protocol (Dellaporta *et al.*, 1983). DNA was treated with 10 g/ml RNase during one hour at 37°C and then extracted by phenol/chloroform.

Table 2: Primer sequences designed for this study. Overlapping sequences in bold.

Primers	Sequences (5' to 3')	Purpose
LP cinerea	CCACCCCATGTACAAAGGTC	Sequencing
RP cinerea	CAGCCTCGTAGTCCGAAGTC	
LP1 ORP	CTTCGGACTACGAGGCTGTC	
RP1 ORF	CTTAAAGGATTCCTCCGAAGC	
LP2 ORF	GATGTTTCATGGCGACTGATG	
RP2 ORF	TAAGTAGCCTGACGCGATGTTAT	
UTR3'-F-cyp684	CGCTATGACGAGACACAATATG	
UTR3'-R-cyp684	CTTCACGACAATCCTGTAGTTTG	
UMP	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAG AGT	RACE-PCR
cyp67_GSP3	CCCCGAAGCTGAGTTCCTCCCAATTAC	
cyp67_GSP4	AGGATTCCGACATTGGCGACGATAG	
cyp67_3'_GSP1	AATACTTCCCGGATCCAGAGAGCTTCG	
cyp67_3'_GSP2	ATCTCCACGCTCGAGGGTATGAGTGAT	qRT-PCR
cyp684 qLP	ATCTCCATAGCCTGCCATTG	
cyp684 qLP	GTAGTGCCTAGCCATTGAAC	
Bc-EF1a_Fwd	TTCCCGCCCAACTGACA	
Bc-EF1a_Rev	CGTTCCAATACCACCAATCTTGT	<i>erg27</i> gene construction
Erg27-up-puc-F	ctatgaccatgattacgaattc ACCAGCTTTCAAAGGAAG	
Bpc-900-up-R	cagccaag TATGCGATCGAACCCAATTTTG	
Hygro-3-F	gatcgcata CTTGGCTGGAGCTAGTGG	
Hygro-3-R	tccatgatgct GTCGACGTTAACCTGGCTG	
Bc-down-2-F	acgtcgac AGCATCATGGAAGTTCAC	
Bc-down-2-R	cgacggccagtgc caagcttAGAGACGTGGAACAGTCAC	
Bpc-900-up-2-F	TGTACGTGGTTCAACCTGGA	Homocaryons verification
Bc-down-3-R	CTCATTGCCTACACCCGATT	<i>erg27</i> insertion verification
Pseudo-seq-10	GTCCGAGGGCAAAGGAATAG	
Bc-down-4-R	TGCGTACAGTTACTGGCATCA	Sequencing
seq13	CACAGGTCTTCTCCGATTG	
seq14	TCACATCGAGCGAAAGCTAA	
Bpc-900-up-2-F	TGTACGTGGTTCAACCTGGA	
cyp68.41	AACAAATTTTACGCGTCTAGTGA	<i>cyp684</i> gene construction
cyp68.42	CATGAGCGGAGACGATCGAGCCTGAGTAAA	
cyp68.43	CTCGATCGTCTCCGCTCATGAGACAATAAC	
cyp68.44	AAAGGATGGATTCTGGGTGAGCAAAAACAG	
cyp68.45	TCACCCAGAATCCATCCTTTTTGCATGAAT	
cyp68.46	CCCTTGTGCAGGTTAAGAAA	
del_LP	CGCGTCTAGTGATATCCCATC	Deletion promoter
cyp67_del_RP	TGATCACGGAGTGTCTCGAT	Gene expression
BC1G_02902-LP	CTTCAAGAAATCGCAGTGGT	
BC1G_02902-RP	TTCTCTCGTCGTAGCATTCC	
11822-LP	AGCGAGTCATGGTCACAAAT	
11822-RP	GGATCAAACCTTTCGAGCAGA	
04457-LP	ATGTCTGCGACTCTCTTTGG	
04457-RP	TTCCCCTCCTTAAAATACGG	
05184-LP	TATGTATGTGATGCGGATGC	
05184-RP	TGACTTGGAGTGGGTGATT	
09786-LP	AAACTTGCGCAGATTATTGG	
09786-RP	GAAGCGAACAAAAAGGTGAA	
04582-LP	GTTAGCACAGGCAAAAAGGAA	
04582-RP	CAAAGGGCATGAAATGATTC	
11409-LP	GATGTTGCCTCATTCAAACC	
11409-RP	GGCGATCGTCTTTTGAGTAA	
02530-LP	GCAGCGAAATTCACAAGATT	
02530-RP	GTGGATACGGAGGGTTTCTT	

06459-LP	GTTTTTCATCGTTGCAGCTTT	Gene expression
06459-RP	TGTGTCGTAATCCGGTTTTT	
05268-LP	GATCTTCTGAATGCGATGCT	
05268-RP	TTTCTGGTGGATTACCTCA	

RNA extraction

Total RNA was extracted using the Extract-All reagent (Eurobio, les Ulis, France) following the manufacturer's recommendations. Genomic DNA was eliminated by a TurboDNase (Ambion) treatment during 30 minute at 37°C, and subsequent phenol/chloroform extraction. The RNA concentrations were quantified spectrophotometrically and integrity was verified by gel electrophoresis.

5' RACE and 3' RACE

5' and 3' extremities of the *cyp684* mRNA were determined using the SMARTer™ RACE cDNA amplification kit (Clontech Inc). and the oligonucleotides UMP/*cyp67_GSP4* and UMP/*cyp67_GSP3* according to the supplier's instructions. The PCR products were sequenced using *cyp67-3'-GSP1* and *cyp67-3'-GSP2* (table 2).

cyp684 expression analysis

2 µg of total RNA extracted from mycelia grown as described above, was used for cDNA synthesis with MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and oligo (dT) primers. *cyp* expression screening was performed on the basis of classical PCR with the primers listed in Table 2 adding 1 µl of the 5 times diluted of cDNA. Real-time RT-PCR was carried out with the oligonucleotides BC1G_02902LP and BC1G_02902RP (Table 2) at 300 µM final concentrations using 5 µl of 5 times diluted newly synthesized cDNA in 25 µl final volume with Mesagreen qPCR Master Mix Plus w/o UNG (Eurogentec, Belgium). All primer sets were verified for amplification efficiencies 94.8% to 102 % and for absence of non-

Chapitre I

specific amplicons. Relative expression levels were determined according to Livak and Schmittgen (2001) using the $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ method with *Ef1 α* as control gene with primers BC-EF1a-fwr and BC-EF1a-rev (Table 2) and the B05.10 to sample as calibrator. Means and standard deviations were calculated from two technical replicates of two biological replicates.

All reactions were performed in CFX96™ real-time PCR detection systems running with CFX Manager software (BioRad, Marne-la-Coquette, France).

cyp684 gene structure

The structure and coding sequence of *cyp684* was analysed in the different *Botrytis* species after PCR on purified genomic DNA. The presence of the promoter deletion 24 bp upstream of the Start codon was verified by PCR using the primers del_LP and *cyp67_del_RP* leading to 200 bp and 175 bp amplicons respectively. Open reading frame and 3'UTR were amplified and sequenced using the primers LP1 ORF/RP1 ORF; LP2 ORF/RP2 ORF, UTR3'-F-*cyp684*/UTR3'-R-*cyp684* respectively (Table 2).

erg27 replacement construct

The replacement of the B05.10 *erg27* gene (GI: 29150685) by the homologous *B. pseudocinerea* gene was carried out with a replacement plasmid constructed by the Gibson assembly cloning method (Gibson et al, 2009, 2010). Oligonucleotides *erg27-up-puc-F* and *Bpc-900-up-R* (table 2) were used to amplify the complete *erg27* gene (3960 bp) using *B. pseudocinerea* DNA (strain 900); *bc-down-2F*/ *bc-down-2R* (table 2) were used to amplify the right flank downstream of *erg27* (1018 bp) on *B. cinerea* DNA (strain B05.10). The *hph* hygromycine resistance gene (1422 bp) was amplified from pKhyg with the primers *Hygro-3-F* and *Hygro-3-R* (table 2). The plasmid pUC18 was digested with *EcoRI* and *HindIII* prior to assembly with the three PCR products according to the manufacturer's instructions. The

Chapitre I

assembly product was introduced into *E. coli* DH5 α thermocompetent cells (NEB). Colonies were selected on 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin. Extracted plasmids were verified by PCR and restriction analysis prior to B05.10 transformation.

cyp684 inactivation construct

Oligonucleotides cyp68.41 and cyp68.42 and cyp68.45 and cyp68.46 (table 2) were used to amplify the left flank (924 bp) and the right flank (1032 bp) respectively of the *cyp684* gene on *B. pseudocinerea* 900 DNA. cyp68.43 and cyp68.44 (table 2) amplified the hygromycine *hph* resistance cassette (1547 bp) on pKhyg. Proofreading Taq polymerase (Finnzyme) was used according to the manufacturer's recommendations. The replacement construct was created using Double-Joint PCR (Yu *et al.*, 2004). The final amplicon harboring the *hph* gene between the *cyp684* flanks was cloned into pCRII-Blunt-TOPO[®] vector (Clontechinc). The vector containing the deletion cassette was called pCRII- Δ *cyp684*.

B. cinerea and *B. pseudocinerea* transformation

Protoplasts were prepared from the two strains B05.10 and 900 and transformed according to (Levis *et al.*, 1997) and modified according to (Liu *et al.*, 2008). The transformants were selected on isotonic medium (0.2 g KH_2PO_4 , 0.1 g MgSO_4 , 0.1 g KCl, 2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400g saccharose, 4 g NaNO_3 and 12.5 g agar per 1 L of deionized water) with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) and incubated at 23°C in the dark. Transformants were picked after 5 days and cultured on selective MM medium (1 g KH_2PO_4 , 0.5g MgSO_4 , 0.5 g KCl, 1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g glucose 2 g NaNO_3 and 12.5 g agar per L of deionized water; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of hygromycin B) until conidia were produced. Several successive conidial isolations were performed on transformants on selective medium, until homokaryons were obtained.

Validation of gene replacement events

The insertion of *erg27^{B.pseudocinerea}* and the presence of the selection marker at the *locus* were verified by PCR with the primers Pseudo-seq-10 and Bc-down-3-R (table 2). Transformants having integrated the construction into the locus yielded a single 1500 bp band, whereas those with ectopic integration yielded no band. The difference between heterokaryons and homokaryons were verified by PCR with Bpc-900-up-2-F and Bc-down-3-R (table 2). The presence of *erg27^{B.pseudocinerea}* polymorphism in the coding sequence was confirmed by sequencing the entire *erg27* gene from genomic DNA extracted from isolated transformants using seq13/seq14 and Bpc-900-up-2-F (table 2).

The replacement of *cyp684* and monocopy insertion of the construct was verified by PCR and Southern blot. Genomic DNA from wild type strain 900 and three *900Δcyp684* transformants was extracted. 10 µg of DNA was digested overnight with *SpeI* and blotted on positively charged nylon membranes. Probes were labelled by the Ready-to-Go DNA labelling kit (Amersham) with 20 µCi of (³²P)-dCTP following the manufacturer's recommendations. The left flanking region, amplified by primers *cyp68.41* and *cyp68.42* (table 2) was used as DNA probe for *cyp68.4* deletion analysis. Membranes were hybridized 16 hours at 65°C. The loss of *SpeI* restriction site in mutants allows to discriminate a 5kb DNA band in *900Δcyp684* transformants and a 2,4 kb band in wild type DNA.

Sequence analyses

The Cyp684 protein sequences were aligned to the *A. nidulans* CYPome sequences (Kelly *et al.*, 2009) using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004). The alignment was submitted to the PHYLIP package (Felsenstein, 1989). Classification of Cyp684 domains was performed with InterProScan (Hunter *et al.*, 2012). The motif structures of each protein presented in (Fig 3)

Chapitre I

were predicted using PRINTS (Attwood *et al.*, 2003) and Substrates recognition sites (SRS) were predicted by alignment to the Cyp102 protein (Gotoh, 1992)

III. Results

The erg27 gene is not involved in fenhexamid resistance in B. pseudocinerea

The role of the *erg27* polymorphism in *B. pseudocinerea*'s natural resistance to fenhexamid was investigated by a gene replacement strategy of the *erg27* gene in the sensitive *B. cinerea* strain B05.10 by that of *B. pseudocinerea* (for details see Materials & Methods). The transformants selected on hygromycine were analysed after two cycles of conidium isolation for the complete gene replacement event. We tested two validated homokaryotic transformants for their sensitivity to fenhexamid at the mycelial stage of growth.

Table 3: In vitro effects of fenhexamid on *B. cinerea* (B05.10) *B. pseudocinerea* wild type (900) and *B. cinerea erg27* replacement mutants B05.10::*erg27*^{*B. pseudocinerea*} (*erg27*(14), *erg27*(18)).

	<i>B. cinerea</i>	<i>B. pseudocinerea</i>	B05.10:: <i>erg27</i> ^{<i>B. pseudocinerea</i>}	
EC ₅₀ mg L ⁻¹ (Fenhexamid)	0.035 ± 0.04	13.2 ± 0.5	<i>erg27</i> (14)	<i>erg27</i> (18)
			0.062 ± 0.06	0.062 ± 0.07

The resistance factor for fenhexamid of the *B. pseudocinerea* strain 900 relative to *B. cinerea* B05.10 was over 256. The introduction of the *B. pseudocinerea* a *erg27* gene into B05.10 did not significantly modify the EC₅₀ value of the recipient strain (Table 3) Our results indicate that the polymorphism of the *erg27* gene including 12 polymorphic amino acids is not involved in fenhexamid resistance of *B. pseudocinerea*.

Candidate gene identification by similarity and gene expression approaches.

We then went out to identify the cytochrome P450 gene potentially involved in the synergy between fenhexamid and prochloraz in *B. pseudocinerea* and eventually in its resistance to fenhexamid. We hypotehised that the P450 candidate should be highly similar to Cyp51, the target of prochloraz and displaying higher expression levels in *B. pseudocinerea* than in *B. cinerea*.

From the Broad Institute's *B. cinerea* B05.10 genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/GenomeDescriptions.html

Chapitre I

[#BC1](#)), we identified 60 putative cytochrome-encoding genes with decreasing similarity to *B. cinerea* Cyp51 (BC1G_11853) using blastp.

Gene expression analysis on the corresponding genes was carried out by semi quantitative RT-PCR on RNAs of both species grown in the presence or not of 10 mg l⁻¹ of fenhexamid during 1 hour. Among them, *bc1g_02902* was the only tested gene exhibiting a higher constitutive expression and induction by fenhexamid in *B. pseudocinerea* (data non shown).

We precised the gene expression in two strains of *B. cinerea* (B05.10, L) and *B. pseudocinerea* (900, VD256) respectively treated or not with fenhexamid by quantitative RT-PCR (Fig. 1). This analysis showed steadily increasing expression of *bc1g_02902* in both *B. pseudocinerea* strains during the 90 min after exposure to fenhexamid. In contrast, *bc1g_02902* expression in *B. cinerea* strains was almost stable during fenhexamid treatment, although different between both strains. The *cyp684* expression levels, despite the intraspecies variations, are nearly undetectable in *B. pseudocinerea* without fenhexamid, but over 5 times higher than *B. cinerea* mean values, after 90 minutes of exposure to fenhexamid.

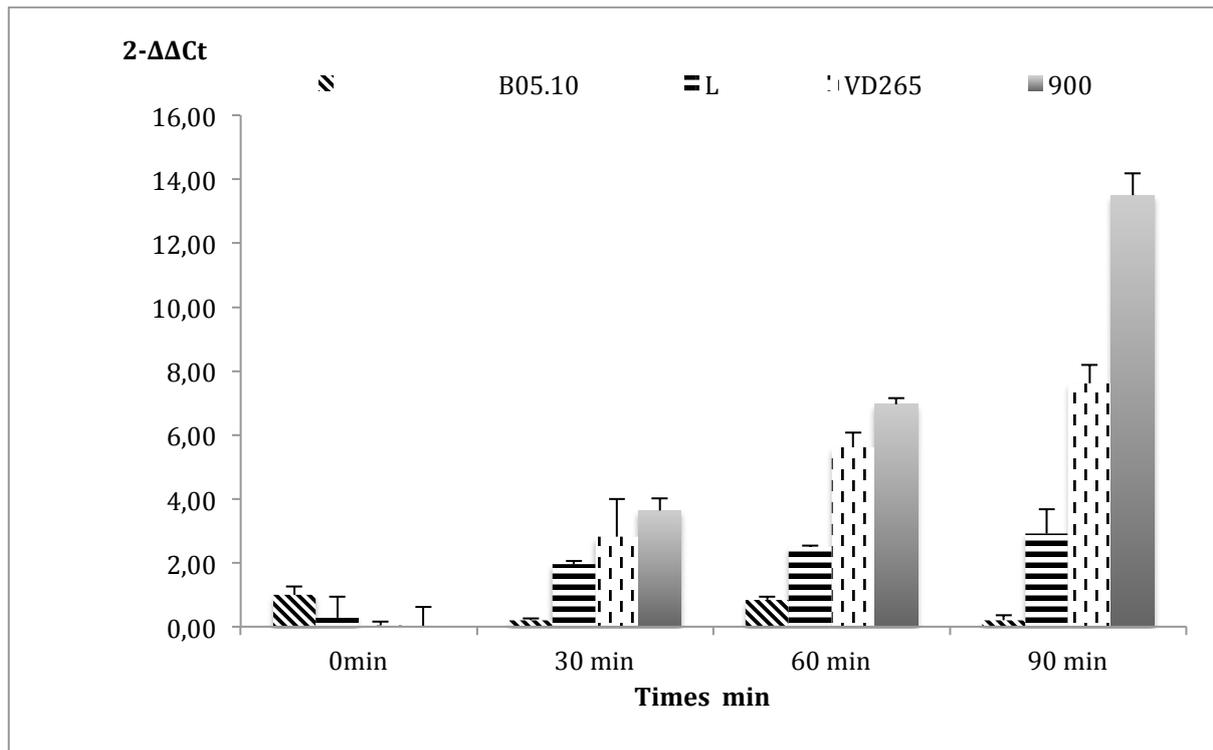


Figure 1: Expression of the *bc1g-02902* gene in *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* during exposure to 10 mg l⁻¹ fenhexamid. The expression values are relative to the *EF1α* gene as reference gene and to B05.10 at t0 (=1) using the 2^{-ΔΔCt} method derived from two independent cultures and two technical replicates (n=4).

Molecular characterization of the cyp684 gene and protein.

We determined the *bc1g_02902* cDNA sequence using the RACE technology to identify its 5' and 3' ends. The deduced coding sequence differs from the automatically predicted coding sequence. It is of 1500 bp long separated by four introns and encodes a protein of 500 amino acids. The introns are located at position 1388 (92 bp), at position 1723 (55 pb), at position 1723 (55 pb) and at position 2929 (60 pb) respectively. The complete sequence was deposited at Genbank (accession number XY).

A full set of cytochrome P450s of filamentous fungi was listed for the first time in *Aspergillus nidulans* (Kelly et al., 2009). To classify the new *B. cinerea* protein among these, we aligned the BC1G_02902 deduced protein sequence with 100 Cyp proteins of *A. nidulans*. These results showed that this protein is most similar to AnCyp684 (46,9% identity). According to

Chapitre I

the nomenclature rules we named the *B. cinerera* and *B. pseudocinerea* BC1G_02902 proteins respectively BcCyp684 and BpCyp684.

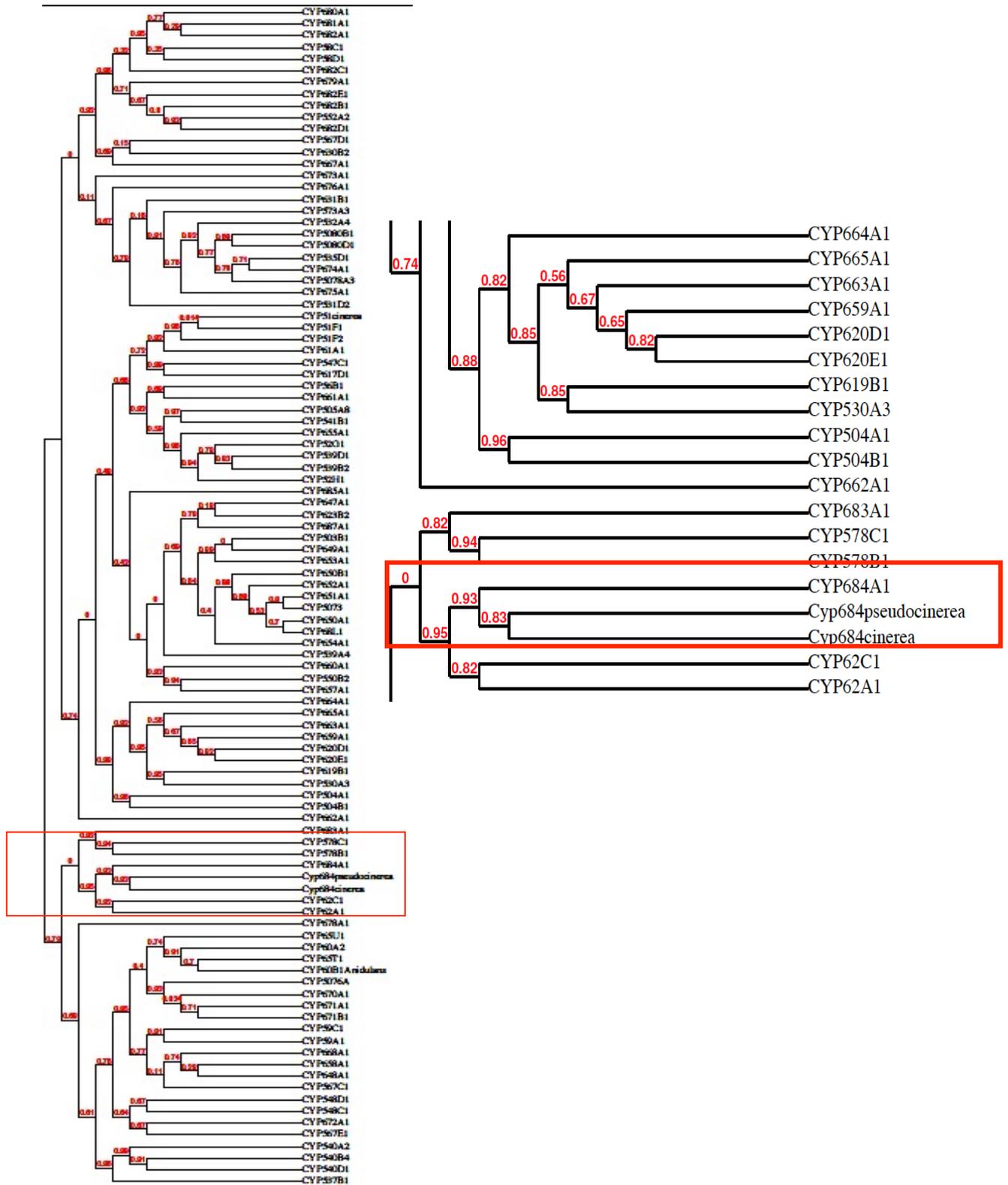


Figure 2: Phylogenetic analysis of Cyp684 compared to the *A. nidulans* CYPome. Phylogenetic position of BC1G_02902 in the tree of *Aspergillus nidulans* P450 protein. Proteins sequences were aligned using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004). The phylogenetic tree was constructed using the PHYLIP package (Felsenstein, 1989)

Chapitre I

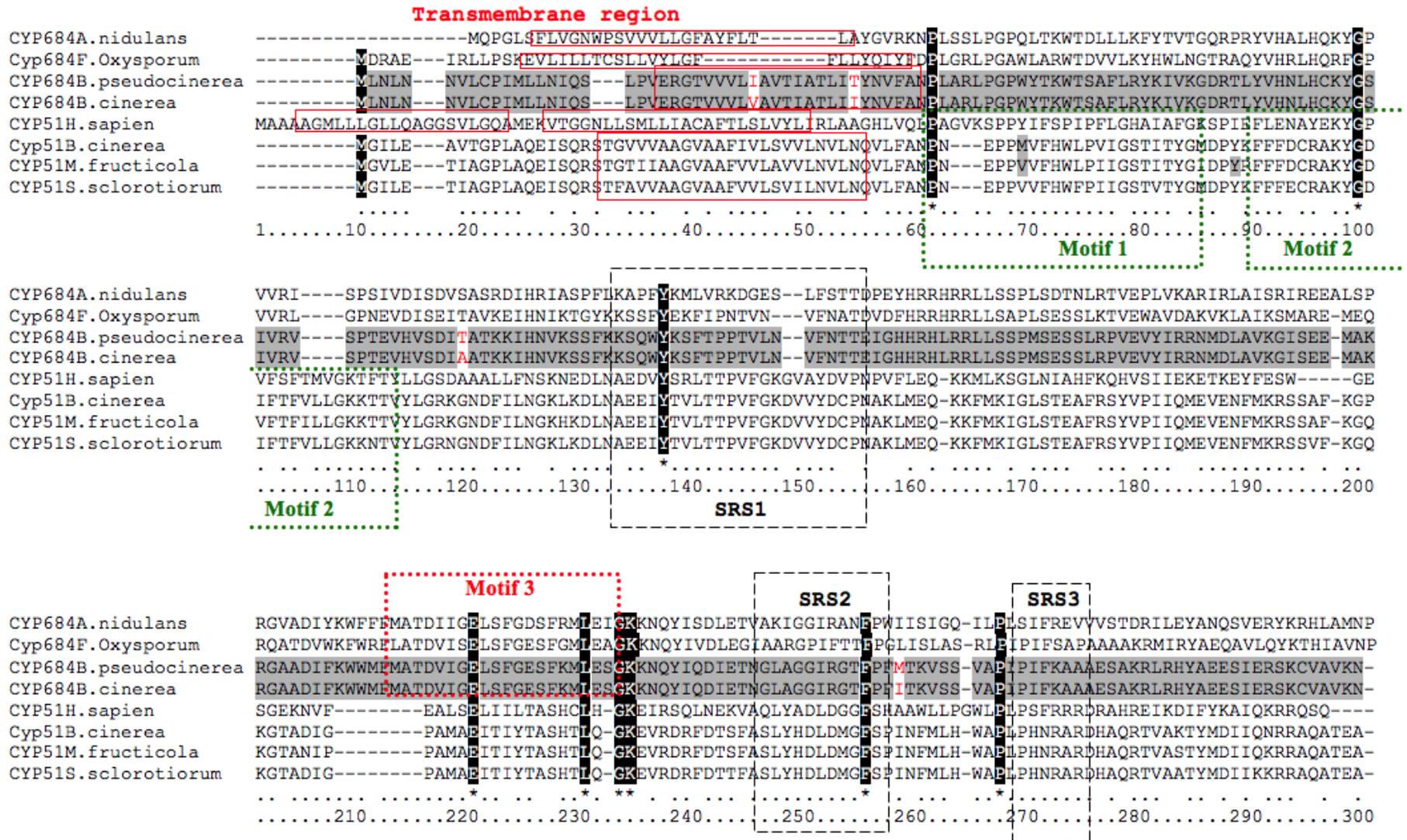
According to the InterProScan pipeline (<http://www.ebi.ac.uk/tools/pfa/prscan/>) (Hunter et al., 2012), BcCyp864 and BpCyp684 proteins can be classified into the E-class family (EP450) group I of P450s. Class E of P450s correspond to class II described in the introduction. They can be distinguished into four groups according to sequence signatures. Those of group I possess 9 signature motifs along the protein sequence out of which 7 were found in BcCyp684 using the *Sprint* data (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/sprint/>) (Table 4).

Both Cyp684 proteins have a transmembrane region in their N-terminal part (residues 21-43) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) and six potential Substrate Recognition Sites (SRS) domains. The comparison of Cyp684 to Cyp51 proteins revealed the following conserved domains: the heme binding loop (F-G-G-G-R-V-C-L-G), the E-T-L-R motif and, finally, the proton transfer groove domain (A-G-S-D-T-T) (Fig 3).

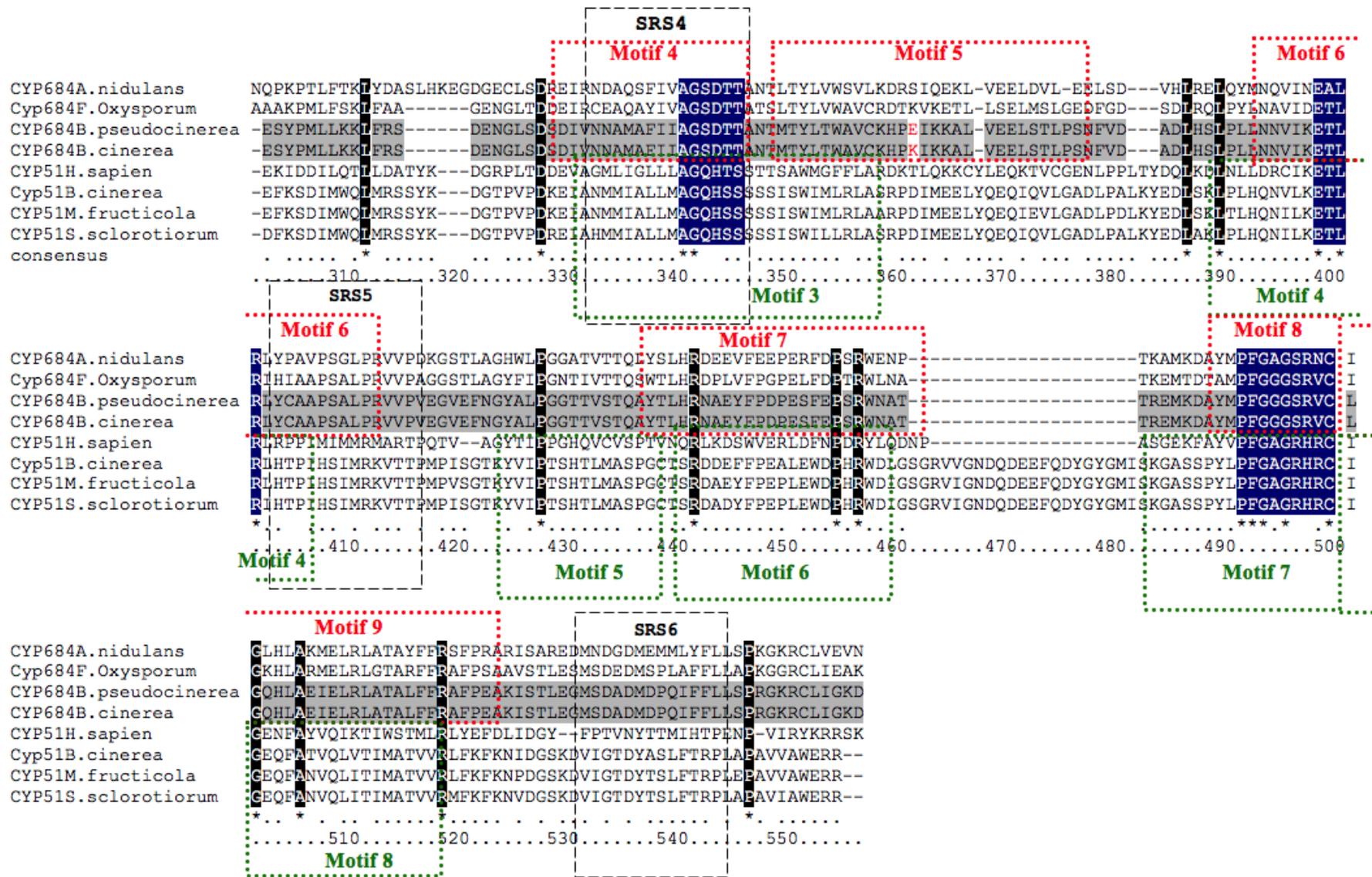
Table 4: Signature motifs of the EP450I family of cytochrome P450 detected in the Cyp684 protein

EP405I Signature	Sequence	Position
Motif 3	MATDVIGELSFGESFKMLE	α E helix (191-209aa)
Motif 4	DIVNNAMAFIAGSDTTA	End of α I helix (298-315aa)
Motif 5	MTYLTWAVCKHPEIKKALVEELSTLPS	Span α I to α J helices (318-344aa)
Motif 6	NNVIKETLRLYCAAPSALP	α K helix (358-376aa)
Motif 7	QAYTLHRNAEYFPDPESFEPSRWNA	Span α K' to α K'' helix (400-424aa)
Motif 8	YMPFGGGSRVC	Span cysteine pocket : Helix L (433-443aa)
Motif 9	CLGQHLAEIELRLATALFFRAFPE	Span cysteine pocket to β 3.3 (433-466aa)

Comparison of the two protein sequences BcCyp684 and BpCyp684 revealed five polymorphic amino acids (V30I, I39T, A100T, I236M and K330E). The comparison of the *cyp684* nucleotide sequences between *B. cinerea* (B05.10) and *B. pseudocinerea* (900) showed the presence of 25 bp deletion in the promoter region and an insertion of 24 pb in the 3'UTR in *B. pseudocinerea*.



Chapitre I



Chapitre I

Figure 3: Muscle alignment of amino acid sequences encoded by *cyp51* gene from human (BAG52338.1), *B. cinerea* (BC1G_11853), *Monilinia fructicola* (ACF06196.1), *Sclerotinia sclerotiorum* (SS1G_04805) and *cyp684* from *Aspergillus nidulans* (CBF89943.1), *Fusarium oxysporum* (EWY92073.1) and *Botrytis pseudocinerea*. Red frames represent the transmembranes region. Grey areas indicate Cyp684 proteins of *B. cinerea* and *B. pseudocinerea*. Green dotted frames indicate Cyp51 motifs and red frames line indicate Cyp684 motifs, motif 1: Span α A helix to β 1-2 strand, motif 2: span β 1-2 strand to α B helix, motif 3: α E helix, motif 4: End of α I helix, motif 5: Span α I to α J helices, motif 6: α K helix, motif 7: Span α K' to α K'' helices, motif 8: Span cysteine pocket and motif 9: Span cysteine pocket to β 3.3 strand helix. Black dotted frames represent the six substrates recognition substrate (SRS). Blue areas indicate conserve domains characterized the cytochromes P450. The conserved residues are colored in black. The five polymorphic amino acid between the two Cyp684 proteins sequences of *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* are written in red.

Functional characterization of cyp684 gene.

We deleted the *cyp684* gene in the *B. pseudocinerea* 900 strain using the gene replacement strategy outlined in (Fig. 4A). Briefly, the *cyp684* gene was replaced by the hygromycine resistance marker *hph*. The transformants were selected and purified on hygromycine containing medium. Three transformants were identified as carrying the replacement event as shown by Southern blot analysis (Fig. 4B). These were named for all further experiments 900 Δ *cyp684*A, B, and C.

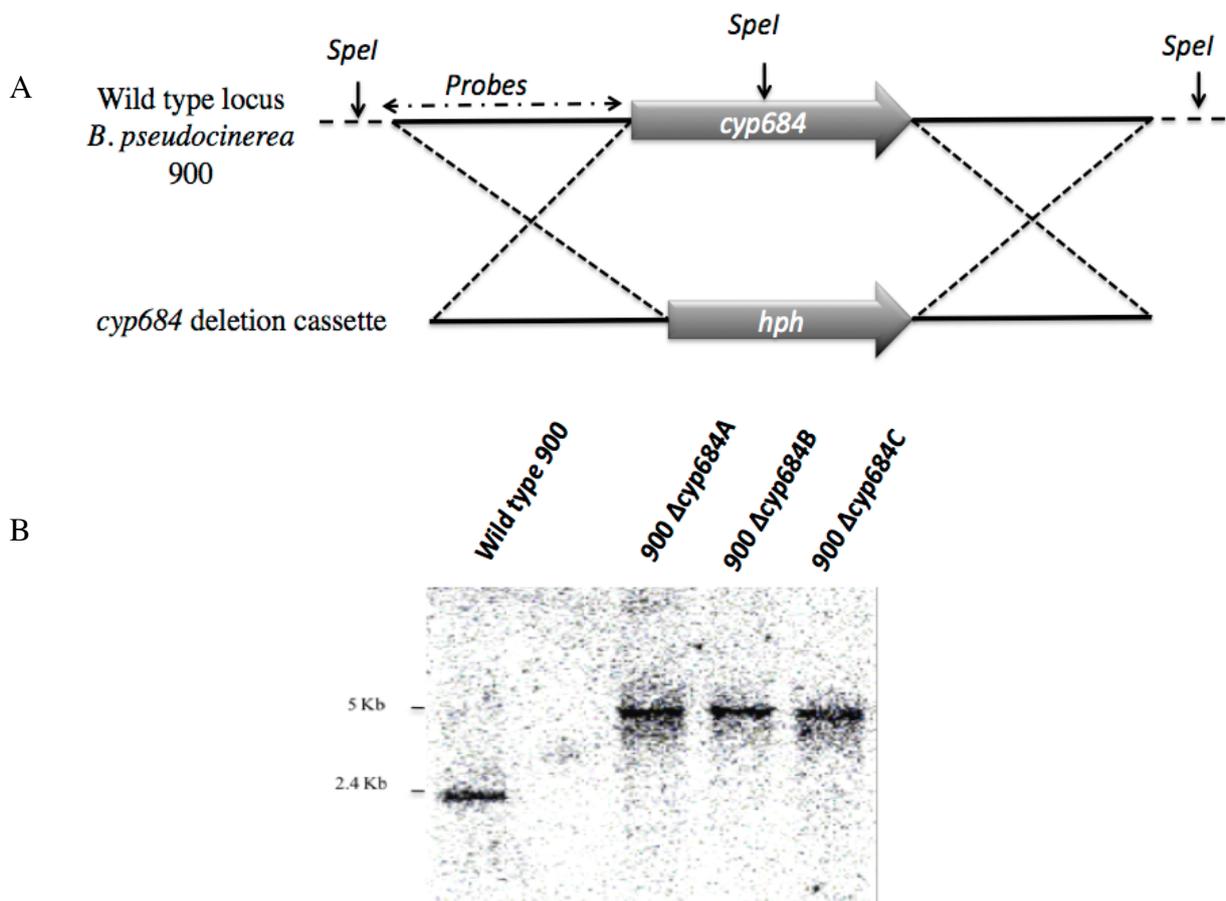


Figure 4: Gene inactivation method of *cyp684* in *B. pseudocinerea* strain 900 (A) and Southern-blot analysis (B) of transformants. A 3 way construct was built with modified double joint PCR technique (see material and methods). *cyp684* deletion causes loss of an *SpeI* site at the locus. The 2,4 kb fragment detected in the recipient strain 900 is replaced by a 5 kb fragment in the replacement mutants.

We tested susceptibility of the 900 Δ *cyp684* mutants to fenhexamid by determining the respective EC₅₀ values at the mycelial stage. Fenhexamid resistance decreased drastically in

Chapitre I

all mutants compared to the recipient *B.pseudocinerea* strain (900). The observed EC₅₀ values were approximately twice as high as the B05.10 strain, compared to >300 times for the recipient strain.

We also precised the synergy between fenhexamid and prochloraz according to the Wadley method (Gisi et al., 1985). Synergy can be considered between compounds in mixture when the ratio EC₅₀theo/EC₅₀obs is higher than 1.5. Synergy was observed in both species. However, the synergy was 4-5 times higher in *B. pseudocinerea* strain 900 than in *B. cinerea* B05.10. The synergy factors decreased by a factor 2 to 5 in the $\Delta cyp684$ mutants compared to the recipient strain 900.

cyp684 gene deletion in *B. pseudocinerea* causes loss of resistance to fenhexamid suggesting that the Cyp684 protein is the key protein in the natural resistance to fenhexamid. Synergy factors show that Cyp684 is also involved in synergy between fenhexamid and prochloraz.

Table 5: Sensitivity to fenhexamid and synergy between fenhexamid + prochloraz in *B.cinerea*, *B. pseudocinerea* and *B. pseudocinerea* $\Delta cyp684$ mutants.

	B05.10	900	$\Delta cyp684A$	$\Delta cyp684B$	$\Delta cyp684C$
EC ₅₀ fenhexamid µg ml ⁻¹	0.035 ± 0.04	13.2 ± 0.5	0.085 ± 0.07	0.049 ± 0.05	0.068 ± 0.08
EC ₅₀ prochloraz µg ml ⁻¹	0.089 ± 0.09	0.054 ± 0.04	0.010 ± 0.011	0.062 ± 0.09	0.058 ± 0.05
EC ₅₀ obs (proch/fen) µg ml ⁻¹	0.01 ± 0.016	0.008 ± 0.007	0.008 ± 0.007	0.006 ± 0.006	0.006 ± 0.005
EC ₅₀ theo ^a (proch/fen) µg ml ⁻¹	0.043	0.160	0.025	0.052	0.064
SF ^b = EC ₅₀ theo/EC ₅₀ obs	4.3	20	4.1	8.6	10.6

^a: Theoretical EC₅₀ of the mixture fenhexamid: prochloraz (2:1) according to Wadley analyses (See Material and methods).

^b: ratio between theoretical and observed EC₅₀ of the mixture.

cyp684 gene structure and fenhexamid susceptibility in *Botrytis* spp.

Sequencing of *cyp684* in several strains of *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* revealed that *B. pseudocinerea* strains are characterized by the deletion of 25 pb in the promoter region. We verified the deletion in several *B. pseudocinerea* strains by PCR compared to *B. cinerea* strains. The test showed that all tested *B. pseudocinerea* strains contained the deletion in the

Chapitre I

cyp684 promoter (data not shown). The sequencing also showed the presence of the 24 bp insert in the 3'UTR region in all *B. pseudocinerea* strains (data not shown). The comparison between the protein sequences of the two *Botrytis* species revealed the presence of five polymorphic amino acids. One *B. pseudocinerea* strain showed an additional polymorphic residue (S256L in strain VD184).

We analysed also the polymorphism of the homologous *cyp684* genes in different *Botrytis* species (*B. fabae*, *B. pelargonii* and *B. calthae*) and we determined the susceptibility of two representative strains to fenhexamid. Except for *B. calthae*, the results presented in table 6 reveal that both promoter and 3'UTR modifications are not restricted to *B. pseudocinerea*. Also *B. fabae* presents the promoter deletion and insertion in 3'UTR. However, *B. calthae* and *B. pelargonii* are characterized by the promoter deletion and absence of the 3'UTR insert as in *B. cinerea*. Considering the polymorphism in the coding sequence, *B. calthae* presents the same peptide sequence as *B. pseudocinerea*, *B. pelargonii* the same as *B. cinerea* and *B. fabae*'s *cyp684* encodes the same peptide sequence as *B. pseudocinerea* with the exception of threonine 39 which is replaced by an isoleucine.

Regarding the sensitivity to fenhexamid, we observed that *B. pseudocinerea* strains are moderately to highly resistant, *B. calthae* is moderately resistant, whereas *B. fabae* and all *B. cinerea* are sensitive to fenhexamid. The fenhexamid sensitivity profiles of different *Botrytis* species indicate that neither the promoter deletion nor the insertion in 3'UTR are involved in resistance mechanisms to fenhexamid. On the opposite, the only amino-acid residue differentiating resistant strains from sensitive ones is threonine at position 39, that is conserved both in *B. pseudocinerea* and *B. calthae*.

Table 6 : Relation between *cyp684* gene structure and fenhexamid sensitivity

Species	Strain	5'UTR Deletion	Polymorphic amino-acid				3' UTR Insertion	FR
			30	39	100	236		
<i>B. cinerea</i>	B05.10	Absent	V	I	A	I	Absent	S
	SAS405	Absent	V	I	A	I	Absent	S
	L	Absent	V	I	A	I	Absent	S
	VD207	Absent	V	I	A	I	Absent	S
	VD969	Absent	V	I	A	I	Absent	S
	VD340	Absent	V	I	A	I	Absent	S
<i>B. pseudocinerea</i>	VD900	Present	I	T	T	M	Present	HR
	VD696	Present	I	T	T	M	Present	HR
	VD233	Present	I	T	T	M	Present	HR
	VD184	Present	I	T	T	M	Present	MR
	VD195	Present	I	T	T	M	Present	MR
	VD320	Present	I	T	T	M	Present	MR
<i>B. calthae</i>	1999	Absent	I	T	T	M	Present	MR
<i>B. pelargonii</i>	1988	Absent	V	I	A	I	Absent	HS
	1999	Absent	V	I	A	I	Absent	HS
<i>B. fabae</i>	2230	Present	I	I	T	M	Present	S
	2240	Present	I	I	T	M	Present	S

Fenhexamid resistance was measured as indicated in experimental procedure.

HS: high sensibility, S: sensibility, MR: moderate resistance, HR: high resistance.

n.d : non determined.

IV. Discussion:

erg27 is not involved in fenhexamid resistance in *B. pseudocinerea*.

Recent studies have shown that grey mould disease is caused by two sympatric species: *B. cinerea* (group II) and *B. pseudocinerea* (group I). *B. cinerea* acquired resistance to several fungicides including fenhexamid is mainly due to target site modification. On the other side *B. pseudocinerea* is not concerned by acquire resistance to fungicide but is naturally resistant to fenhexamid (reviewed in (Walker *et al.*, 2013).

To determine the role of the *B. pseudocinerea erg27* gene in fenhexamid natural resistance, we incorporated the *B. pseudocinerea erg27* gene into a sensitive strain of *B. cinerea*. The resulting *B05.10::erg27^{B. pseudocinerea}* transformants were as sensitive to fenhexamid as the recipient strain indicating that the *erg27* gene coding the fenhexamid target, the 3-ketoreductase is not involved in *B. pseudocinerea's* natural resistance to fenhexamid. Therefore, the twelve polymorphic amino-acids in Erg27 play a minor role in fenhexamid resistance. This is in contradiction to the results previously obtained showing that fenhexamid has a lower affinity to 3-ketoreductase in *B. pseudocinerea* than in *B. cinerea* (Debieu *et al.*, 2013). Are the contradictory results due to the different approaches of growth inhibition *in vivo* (mycelial stage) and enzyme inhibition *in vitro* (microsomal fraction) respectively ? Generally, enzyme inhibition values correlate well with growth inhibition values after site directed mutagenesis of target site (e.g Lalève *et al.*, 2013). If the 3-ketoreductase itself could not explain the reduced affinity of fenhexamid, maybe the other proteins (Erg25, Erg26, Erg28) of *B. pseudocinerea's* C4-demethylase complex are involved. *B. pseudocinerea* displays general polymorphism in many genes (Albertini *et al.*, 2002, Walker *et al.*, 2011). We can suspect that the *erg25*, *erg26* and *erg 28* genes also differ more or less from their *B. cinerea* homologs. These difference might modify the structure of the C4-demethylation

Chapitre I

complex and the affinity of fenhexamid. None of these twelve amino acids is located at the active site, NADPH binding site or the predicted trans-membrane domain of the Erg27 protein. With the constructed strains *B05.10::erg27^{B.pseudocinerea}* we can measure the impact of *erg27* polymorphism alone on fenhexamid affinity.

The cyp684 gene is involved in fenhexamid resistance in B. pseudocinerea

The natural resistance of *B. pseudocinerea* thus involves another resistance mechanisms. As mentioned in the introduction, previous studies suggested the implication of cytochrome P450 in fenhexamid resistance. We identified a putative *B. pseudocinerea* cytochrome P450 named Cyp684 by similarity and expression approaches. All conserved P450 domains could be identified in Cyp684.

cyp684 inactivation in *B. pseudocinerea* led to increased susceptibility to fenhexamid (more than 130 times compared to *B. pseudocinerea* and similar to *B. cinerea*) and to reduced synergy between fenhexamid and prochloraz (over to 2.5 times compared to *B. pseudocinerea*). These results suggest that BpCyp684 is the key player in *B. pseudocinerea* resistance to fenhexamid and also explain synergy between fenhexamid and DMIs.

What makes the difference between B. cinerea's and B. pseudocinerea's cyp684?

Gene expression analysis showed that *cyp684* is overexpressed during fenhexamid treatment in *B. pseudocinerea*. This overexpression is probably due to the alterations found in the 5' and /or UTR3' in *B. pseudocinerea*.

The comparison between *B. cinerea*'s and *B. pseudocinerea*'s Cyp684 proteins revealed the presence of four polymorphic amino acids. The first two amino acids (V30I, I39T) are situated in the putative transmembrane region and the two other polymorphic amino-acids (A100T, I236M) are located outside the different motifs.

Chapitre I

According our results, we do not yet know if gene expression or amino acid changes or both of them are responsible for the higher resistance level to fenhexamid in *B. pseudocinerea*.

cyp684 gene structure and fenhexamid susceptibility in *Botrytis* spp

Fenhexamid has a narrow spectrum of activity. It inhibits growth of *Botrytis* species, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Monilia fructicola* probably due to 3-ketoreductase sensitivity (Debieu et al., 2013).

Beside reduced affinity of 3-ketoreductase to fenhexamid, Cyp684 proteins might contribute to fenhexamid selectivity. Cyp684 homologs can be found in most (but not all) fungal species including those naturally resistant to fenhexamid (data not shown). We could not identify a *cyp684* homolog in the *S. sclerotium* genome.

When we analysed fenhexamid sensitivity profiles and *cyp684* gene structure in different *Botrytis* spp, we found weak differences among *B. pseudocinerea* strains. Some strains were moderately resistant while others strains were highly resistant. Among the other *Botrytis* species, only *B. calthae* was found moderately resistant, whereas the other species (*B. fabae* and *B. pelargonii*) showed high sensitivity to fenhexamid.

The comparison of the *cyp684* genes in *Botrytis* spp showed the promoter deletion in *B. fabae* and the insertion in the 3'UTR in *B. calthae* and *B. fabae*. These elements do not correlate with fenhexamid resistance and are probably not involved. Interestingly *B. calthae* shows the same five polymorphisms in the Cyp684 protein sequence as *B. pseudocinerea*. Therefore, likely all or some of the polymorphic amino acids may be involved in fenhexamid resistance.

How to explain Cyp684's role in fenhexamid resistance

Chapitre I

(Suty et al., 1999) showed that *B. pseudocinerea* strains can metabolize fenhexamid in addition, the synergy experiments indicate the strong synergy between fenhexamid and DMIs in *B. pseudocinerea* (Leroux et al., 2002). These results and the present study suggest that fenhexamid metabolism catalyzed by Cyp684 may be inhibited by DMIs whose primary target is Cyp51 (14 α -demethylase).

In *B. cinerea*, fenhexamid inhibits the 3-ketoreductase stopping ergosterol biosynthesis and therefore causing cell death. In the resistant species *B. pseudocinerea*, Cyp684 is overexpressed and probably degrades fenhexamid to less toxic metabolites allowing ergosterol biosynthesis.

a working model explaining the role of Cyp684 in *B. pseudocinerea*'s natural resistance to fenhexamid and the difference with *B. cinerea* is presented in Fig 5.

In *B. cinerea*, fenhexamid immediately targets the 3-ketoreductase Erg27, whereas in *B. pseudocinerea* it is "trapped" by the Cyp684 protein and metabolized (A).

The difference between both species may be the intracellular concentration of Cyp684 protein and the respective affinity towards fenhexamid (explaining the different synergy factors). The addition of DMIs (e.g. prochloraz) blocks Cyp684 activity in both species, (besides Cyp51 inhibition), therefore stopping fenhexamid metabolism. So, in that case, even *B. pseudocinerea*'s ergosterol biosynthesis is inhibited by fenhexamid.

To our knowledge, this work indicates for the first time that fungicide metabolism confers resistance to a phytopathogenic fungus. If and how far the phenomenon constitutes an evolutionary advantage to *B. pseudocinerea* (and maybe other fungal species) remains to be investigated.

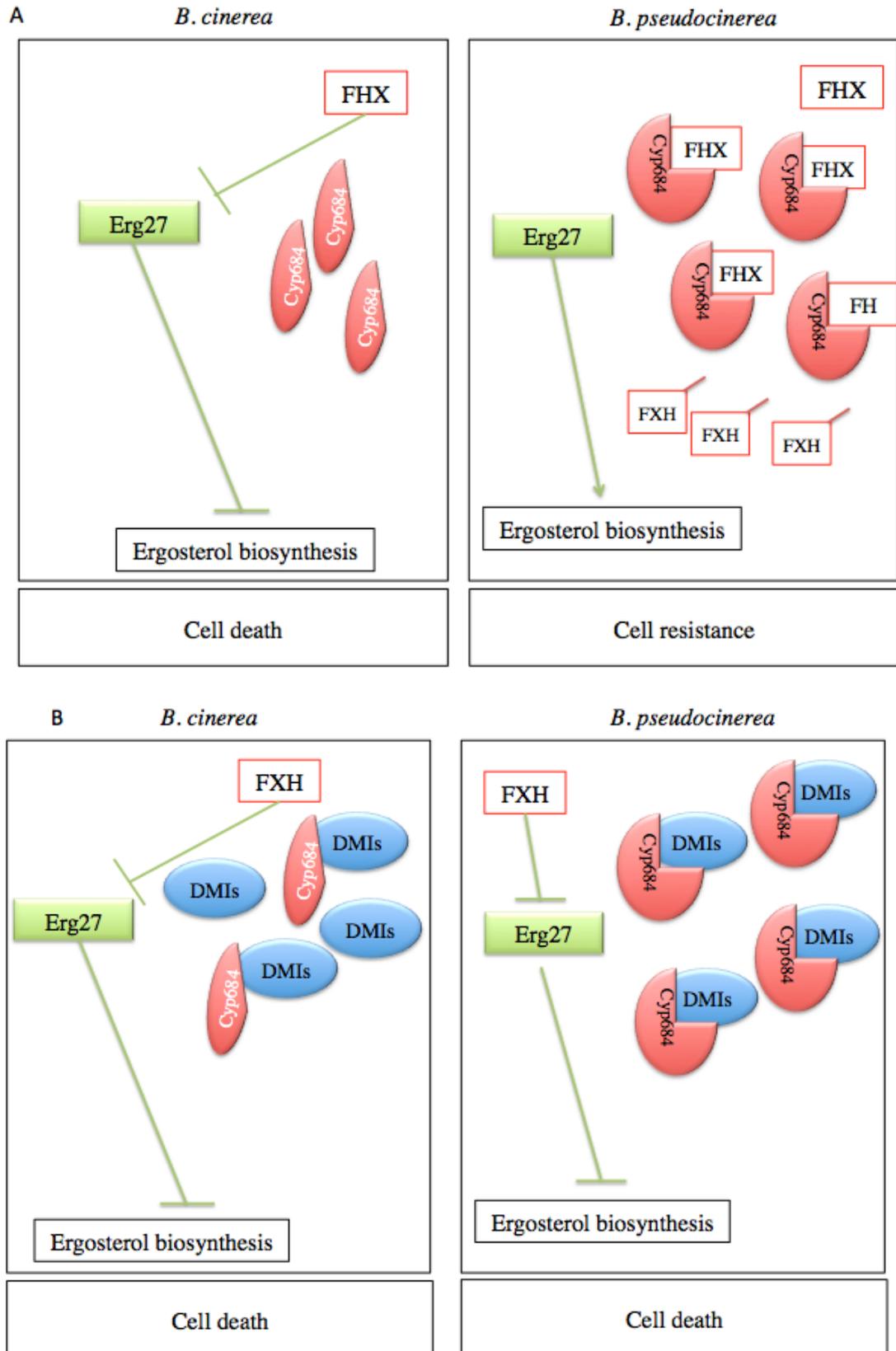


Figure 5: Model explaining Cyp684's role in fenhexamid resistance between the two species *B. cinerea* and *B. pseudocinerea*. (A),(B) Explaining the synergy effect between fenhexamid and DMI. FHX: fenhexamid. DMIs: demethylations inhibitors. Fenhexamid metabolites FHX-

References

- Albertini, C. & P. Leroux, (2004) A *Botrytis cinerea* Putative 3-keto Reductase Gene (ERG27) that is Homologous to the Mammalian 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 7 gene (17 β -HSD7). *Eur J Plant Pathol* **110**: 723-733.
- Albertini, C., G. Thebaud, E. Fournier & P. Leroux (2002) Eburicol 14 α -demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **106**: 1171-1178.
- Amselem, J., C. A. Cuomo, J. A. L. van Kan, M. Viaud, E. P. Benito, A. Couloux, P. M. Coutinho, R. P. de Vries, P. S. Dyer, S. Fillinger, E. Fournier, L. Gout, M. Hahn, L. Kohn, N. Lapalu, K. M. Plummer, J.-M. Pradier, E. Quévillon, A. Sharon, A. Simon, A. ten Have, B. Tudzynski, P. Tudzynski, P. Wincker, M. Andrew, V. r. Anthouard, R. E. Beever, R. Beffa, I. Benoit, O. Bouzid, B. Brault, Z. Chen, M. Choquer, J. Collémare, P. Cotton, E. G. Danchin, C. Da Silva, A. Gautier, C. Giraud, T. Giraud, C. Gonzalez, S. Grossetete, U. Güldener, B. Henrissat, B. J. Howlett, C. Kodira, M. Kretschmer, A. Lappartient, M. Leroch, C. Levis, E. Mauceli, C. Neuvéglise, B. Oeser, M. Pearson, J. Poulain, N. Poussereau, H. Quesneville, C. Rasclé, J. Schumacher, B. Ségurens, A. Sexton, E. Silva, C. Sirven, D. M. Soanes, N. J. Talbot, M. Templeton, C. Yandava, O. Yarden, Q. Zeng, J. A. Rollins, M.-H. Lebrun & M. Dickman, (2011) Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* **7**: e1002230.
- Attwood, T. K., P. Bradley, D. R. Flower, N. M. A. Gaulton, A. L. Mitchell, G. Moulton, A. Nordle, K. Paine, P. Taylor, A. Uddin & C. Zygouri3, (2003) PRINTS and its automatic supplement, prePRINTS. *Nucleic Acids Res* **31**: 400-402.
- Billard, A., (2011) Fenhexamid: Mode d'action et resistance chez le complexe d'espèce *Botrytis* spp., responsable de la pourriture grise de la vigne. In. Paris: Université Paris XI, pp. 173-176.
- Debieu, D., J. Bach, M. Hugon, C. Malosse & P. Leroux, (2001) The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science* **57**: 1060-1067.
- Debieu, D., J. Bach, E. Montesinos, S. Fillinger & P. Leroux, (2013) Role of sterol 3-ketoreductase sensitivity in susceptibility to the fungicide fenhexamid in *Botrytis cinerea* and other phytopathogenic fungi. *Pest Management Science* **69**: 642-651.
- Dellaporta, S., J. Wood & J. Hicks, (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**: 19-21.
- Edgar, R. C., (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.
- Felsenstein, J., (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Fillinger, S., P. Leroux, C. Auclair, C. Barreau, C. Al Hajj & D. I. Debieu, (2008) Genetic Analysis of Fenhexamid-Resistant Field Isolates of the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 3933-3940.
- Garfinkel, D., (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys.* **77**: 493-509.
- Giraud, T., G. Refrégier, M. Le Gac, M. d. V. Damien & M. E. Hood, (2008) Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 791-802.

- Gisi, U., H. Binder & E. Rimbach, (1985) Synergistic interactions of fungicides with different modes of action. *Transactions of the British Mycological Society* **85**: 299-306.
- Gotoh, O., (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 83-90.
- Green, M. R. & J. Sambrook, (2012) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Hunter, S., P. Jones, A. Mitchell, R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bateman, T. Bernard, D. Binns, P. Bork, S. Burge, E. de Castro, P. Coggill, M. Corbett, U. Das, L. Daugherty, L. Duquenne, R. D. Finn, M. Fraser, J. Gough, D. Haft, N. Hulo, D. Kahn, E. Kelly, I. Letunic, D. Lonsdale, R. Lopez, M. Madera, J. Maslen, C. McAnulla, J. McDowall, C. McMenamin, H. Mi, P. Mutowo-Muellenet, N. Mulder, D. Natale, C. Orengo, S. Pesseat, M. Punta, A. F. Quinn, C. Rivoire, A. Sangrador-Vegas, J. D. Selengut, C. J. A. Sigrist, M. Scheremetjew, J. Tate, M. Thimmajananathan, P. D. Thomas, C. H. Wu, C. Yeats, S.-Y. Yong, J. Lees, J. Perkins, I. Sillitoe, R. Rentzsch & B. H. Dessailly, (2012) InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Research* **40**: 4725.
- Kalb, V. F., J. C. Loper, C. R. Dey, C. W. Woods & T. R. Sutter, (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **45**: 237-245.
- Kelly, D. E., Nada Kraševc, Jonathan Mullins & D. R. Nelson, (2009) The CYPome (Cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **46**: S53-S61.
- Leroux, P., F. Chapeland, D. Desbrosses & M. Gredt, (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Prot.* **18**: 687-697.
- Leroux, P., R. Fritz, D. Debieu, C. Albertini, C. Lanen, J. Bach, M. Gredt & F. Chapeland, (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58**: 876-888.
- Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch & 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**: 6615-6630.
- Levis, C., D. Fortini & Y. Brygoo, (1997) Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics* **32**: 155-162.
- Lewis, D. F. V., (2001) *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*. New York.
- Liu, W., P. Leroux & S. Fillinger, (2008) The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1062-1074.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Mansuy, D., (1998) CytochromeP450 and model system- great diversity of catalyzed reaction. *Pure & Appl.Chem* **66**: 737-744.

- Mouches, C., (2005) Les lutations responsables de résistances aux insecticides. In: Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. R. CR (ed). Paris, pp. 207-224.
- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus & D. W. Nebert, (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics* **6**: 1-42.
- Paine, M. F., N. Scrutton, A. Munro, A. Gutierrez, G. Roberts & C. R. Wolf, (2005) Electron transfert partners of cytochromes P450.". In: Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. pp. 115-148.
- Rosslenbroich, H.-J. & D. Stuebler, (2000) Botrytis cinerea ,Â history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* **19**: 557-561.
- Stergiopoulos, I., M. M. C. Gielkens, S. D. Goodall, K. Venema & M. A. De Waard, (2002) Molecular cloning and characterisation of three new ATP-binding cassette transporter genes from the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola. *Gene* **289**: 141-149.
- Sugiura, H., K. Hayashi, T. Tanaka, M. Takenaka & Y. Uesugi, (1993) Mutual antagonism between sterol demethylation inhibitors and phosphorothiolate fungicides on Pyricularia oryzae and the implications for their mode of action. *Pesticide Science* **39**: 193-198.
- Suty, A., R. Pontzen & K. Stenzel, (1999) fenhexamid-sensitivity of Botrytis cinerea: Determination of baseline sensitivity and assessment of the risk of resistance *PFLANZENSCHUTZ NACHRICHTEN -BAYER* **52**: 145-147.
- Uesugi, Y. & M. Takenata, (1992) the mechanisms of action of phosphorothiolates fungicides. In: In Proceeding of the 10th International Symposium on Systemic Fungicides and Antifungal Compounds. Stuttgart, pp. 159-164.
- Walker, A.-S., A. I. Gautier, J. Confais, D. Martinho, M. Viaud, P. Le Pécheur, J. Dupont & E. Fournier, (2011) Botrytis pseudocinerea, a New Cryptic Species Causing Gray Mold in French Vineyards in Sympatry with Botrytis cinerea. *Phytopathology* **101**: 1433-1445.
- Walker, A.-S., A. Micoud, F. Rémuson, J. Grosman, M. Gredt & P. Leroux, (2013) French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of Botrytis cinerea (grey mould). *Pest Management Science* **69**: 667-678.
- Warrilow, A., C. Ugochukwu, D. Lamb, D. Kelly & S. Kelly, (2008) Expression and Characterization of CYP51, the Ancient Sterol 14-demethylase Activity for Cytochromes P450 (CYP), in the White-Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium. *Lipids* **43**: 1143-1153.
- Werck-Reichhart, D. & R. Feyereisen, (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* **1**: reviews3003.3001 - reviews3003.3009.
- Yu, J.-H., Z. Hamari, K.-H. Han, J.-A. Seo, Y. Reyes-Domínguez & C. Scazzocchio, (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 973-981.

Résultats supplémentaires

Plusieurs hypothèses restent à vérifier suite au travail décrit dans le manuscrit des pages précédentes. Il s'agit notamment de caractériser le rôle du gène *Bpcyp684* dans la résistance au fenhexamid chez *B. pseudocinerea*. Notre modèle de métabolisation du fenhexamid par BpCyp684, correspond-t-il à la réalité ? Puis, quelle partie du gène *Bpcyp684* confère-t-elle cette résistance ? Est-ce vraiment le polymorphisme naturel de la protéine qui est responsable ?

Plusieurs expériences ont été entreprises pendant cette thèse pour répondre à ces questions.

Développement d'un système d'expression hétérologue chez Saccharomyces cerevisiae

Afin de vérifier, si la protéine BpCyp684 est responsable de la métabolisation du fenhexamid, nous avons développé un système d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* (Sakaki *et al.*, 1990). L'avantage de l'utilisation de la levure est lié à : 1/ son insensibilité au fenhexamid. 2/ au fait qu'elle ne contient qu'un seul cytochrome P450 (Cyp51) par rapport aux 136 P450 suspectées chez *B. cinerea* et probablement aussi chez *B. pseudocinerea* (http://p450.riceblast.snu.ac.kr/species.php?a=intro&spe_id=279740&ref_id=57716). Ceci permettra de démontrer la fonction de mono-oxygénase à P450 pour la protéine BpCyp684, son implication dans la métabolisation du fenhexamid ainsi que l'identification des métabolites.

La souche de *S. cerevisiae* utilisée, W(R), a été modifiée dans le sens où le promoteur naturel du gène de la NADPH-cytochrome P450 réductase (*CPR1*) a été remplacé par le promoteur inductible (*GAL10*) (Urban *et al.*, 1994, Urban *et al.*, 1997). Par ailleurs, elle est auxotrophe pour l'adénine. La souche W(R) est incapable d'exprimer *CPR1* en présence de glucose alors qu'il est surexprimé en présence de galactose.

Chapitre I

L'ADNc *cyp684* de *B. pseudocinerea* a été synthétisé par un prestataire de service (Eurofins MWG) avec une optimisation des codons pour la levure. Il a ensuite été inséré dans le plasmide pYeDP60 digéré par *KpnI* et *EcoRI*. Ce plasmide permet la complémentation de l'auxotrophie pour l'adénine de la souche W(R) par la présence du gène *ADE2*. Il porte également un promoteur fort (*GALI0*) inductible par le galactose et une séquence de terminaison de la phosphoglycérate kinase (*tPKG*) pour la surexpression du gène inséré. La construction obtenue nommée pYeDP60-*Bpcyp684* a été introduite dans la souche W(R) selon la méthode de Gietz (Gietz *et al.*, 1992). Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu SGI sans adénine (20 g l⁻¹ de glucose, 1 g l⁻¹ de bacto-casamino acids (Difco), 6.7 g l⁻¹ yeast nitrogen base, 40 mg l⁻¹ de tryptophane).

Afin de vérifier la surexpression de *Bpcyp684* dans les transformants W(R)-pYeDP60-*Bpcyp684*, nous les avons cultivés dans un milieu liquide SGI avec et sans galactose (2% w/v) pendant 0h, 1h, 2h, 16h respectivement. Les ADNc ont été synthétisés à partir des ARN extraits de ces cultures (Figure S1).

L'expression de *Bpcyp684* a été évaluée par PCR semi-quantitative avec les amorces ORF.B-Cyp684-PL (ATGCTTAATCTCAACAACGTA) et qPR-cyp684-RP (GTAGTGCGTAGCCATTGAAC) pendant 30 cycles. Nous avons utilisé le gène *ACT1* de *S. cerevisiae* comme gène de référence. L'on observe une induction de l'expression de *Bpcyp684* 2h après l'ajout de galactose (Figure S1). Le système correspond ainsi à nos besoins de surexpression de *Bpcyp684* pour des études futures de biochimie. Après vérification de la production de BpCyp684 par SDS-PAGE et par mesure du spectre d'absorption (on attend un pic à 450 nm), nous chercherons à déterminer si BcCyp684 est capable de métaboliser le fenhexamid et d'identifier les métabolites du fenhexamid. Ultérieurement, ce système permettra aussi de rechercher les substrats naturels de BcCyp684.

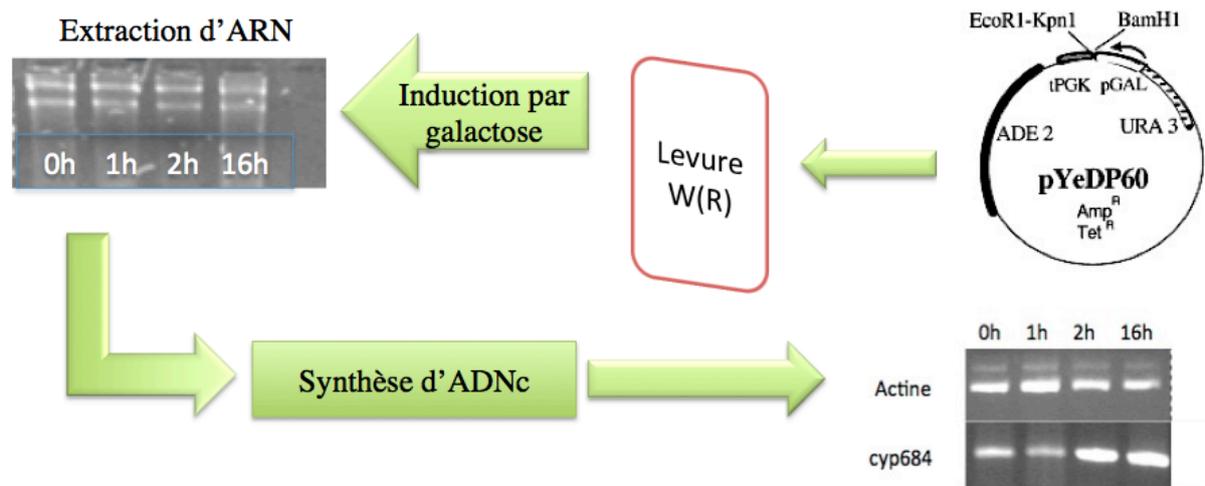


Figure S1 : Démarche expérimentale d'expression hétérologue de *Bpcyp684* chez *S. cerevisiae* ainsi que la vérification de sa surexpression.

Constructions de gènes cyp684 hybrides.

Dans l'objectif de vérifier l'implication de la séquence peptidique de BpCyp684 dans la résistance au fenhexamid, nous avons essayé de construire des gènes chimères entre les isogènes de *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* pour compléter le mutant $\Delta cyp684$. Pour cela, plusieurs approches ont été adoptées. Tout d'abord, nous avons essayé la recombinaison homologue dans la levure (Yu *et al.*, 2004, Schumacher, 2012, Colot *et al.*, 2006). Cette technique consiste à amplifier les trois fragments (promoteur, ORF, UTR3') séparément à partir de l'ADN génomique des deux souches B05.10 (*B. cinerea*) et 900 (*B. pseudocinerea*). Les amplicons sont en partie chevauchants ce qui permettra d'obtenir le produit de leur fusion lors de la transformation dans la levure. De la même manière, les amorces externes contiennent des parties complémentaires au vecteur utilisé pour le clonage pNDN-OGG digérée par les enzymes *BglIII* et *SpeI*. Le plasmide pNDN-OGG contient des marqueurs de sélection pour *E. coli* (Amp^R), *S. cerevisiae* (*URA3*) et pour *B. cinerea* (*NAT* conférant la résistance à la nourseothricine) ainsi que les deux régions flanquantes du gène du nitrate réductase *bcniaD5'* et *3'*. Ces dernières permettront d'introduire les gènes chimères à un locus

Chapitre I

précis, celui de la nitrate réductase. Malheureusement, j'ai rencontré plusieurs problèmes techniques comme l'obtention de bandes aspécifiques lors de l'amplification des différents fragment ou encore des faux positifs.

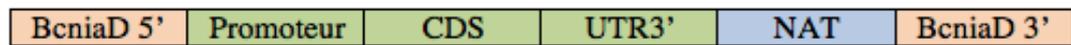
Compte-tenu de ces difficultés, j'ai adopté la stratégie de PCR fusion décrite par Yu *et al.*, 2004 et un clonage intermédiaire: la première étape consiste à amplifier les trois fragments (promoteur, ORF, UTR3') avec des amorces contenant des extensions chevauchantes. Les amplicons contiennent donc des zones de recouvrement pour créer un amplicon de fusion dans une PCR intermédiaire de 15 cycles sans amorces. Finalement, le produit final est amplifié par PCR avec des amorces situées à chaque extrémité.

Les huit produits finaux obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR®4-TOPO à l'aide du kit TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen TA Cloning kit). Les différentes constructions sont amplifiées par des amorces externes contenant les sites de restriction *AvrII* et *NotI* afin de les cloner dans le vecteur pNDN-OGG (Schumacher, 2012), digéré par les deux enzymes *AvrII* et *NotI*, pour obtenir les constructions pNDN-OGG-*cyp684* ayant les caractéristiques citées ci-dessus.

En fin de compte j'ai obtenu sept constructions, celles numérotées 3, 5, 6, 7 et 8 dans la Figure S2. Faute de temps, je n'ai pas pu réaliser les trois constructions manquantes.

Après vérification par séquençage, les huit constructions seront introduites dans un des mutants 900 Δ *cyp684* afin de mesurer l'impact sur le niveau de résistance au fenhexamid. L'on pourrait également étudier le profil d'expression des gènes chimériques *cyp684* afin d'évaluer si les niveaux d'expression sont corrélés aux niveaux de résistance et quelle partie du gène les régulent.

1/ Construction contrôle *B. cinerea* :



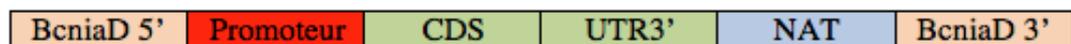
2/ Construction contrôle *B. pseudocinerea* :



3/



4/ C



5/



6/



7/



8/



Figure S2: Schéma explicatif des gènes chimères de *cyp684* consruits pour déterminer le mécanisme de résistance chez *B. pseudocinerea*. *Bcniad* : deux régions flanquants du gène nitrate réductase permettant aux constructions d'être intégrées dans le même locus, *NAT* : gène conférant la résistance nouséothricine permettant la sélection des protoplastes transformés.

Chapitre II

Outil de quantification de l'espèce *B. pseudocinerea* dans les populations naturelles de *Botrytis*

Chapitre II

I. Introduction

La résistance aux pesticides en général et aux fongicides en particulier présente une vraie problématique pour les entreprises phytosanitaires, les agriculteurs et les instances d'homologation. La surveillance des populations fongiques phytopathogènes est nécessaire pour évaluer le risque de résistance pour toute nouvelle molécule antifongique. Une telle surveillance nécessite le développement de méthodes biologiques qui permettent de suivre la variabilité de la sensibilité à un fongicide donné dans les populations fongiques naturelles. Les méthodes biologiques ont l'inconvénient d'être coûteuses et leur mise en œuvre est souvent contraignante et chronophage. De plus, elles ne permettent pas de savoir pourquoi la fréquence des espèces ou de certains phénotypes reste faible malgré la pression de sélection exercée par les fongicides.

Comme la résistance aux fongicides chez les champignons phytopathogènes est souvent liée à une modification de la cible du fongicide due à une mutation ponctuelle, son identification permet le développement de méthodes moléculaires afin de détecter et de quantifier des souches résistantes dans les populations fongiques (Ma & Michailides, 2005). Le principe de ces méthodes moléculaires se base sur la technologie de PCR temps réel. Les marqueurs moléculaires de la résistance (allèles ou gènes spécifiques) peuvent être détectés par PCR soit séparément soit dans des systèmes multiplex. Ces outils d'analyse reposent sur l'utilisation d'amorces et, éventuellement dans le cas de la qPCR, de sondes spécifiques des allèles impliqués dans le mécanisme de résistance. Dans le cas de la qPCR, le suivi, cycle par cycle, de la réaction d'amplification, permet de détecter et de quantifier des mutations spécifiques, des délétions ou des insertions de ces allèles responsables de la résistance. Les résultats sont exprimés en cycle de quantification (Cq) qui correspond aux nombres de cycles de PCR nécessaires pour que la fluorescence émise soit significativement distincte de la fluorescence de base. Les Cq des échantillons étudiés sont comparés aux valeurs de la souche sensible.

Chapitre II

Ainsi, des tests de PCR en temps réel ont été développés pour détecter et quantifier des souches résistantes aux strobilurines (QoI) dans les populations d'*Alternaria* du pistachier ou chez l'oïdium du blé. Ces méthodes sont basées sur la mutation (G143A) identifiée dans le gène cible des strobilurines codant le cytochrome b (Yong *et al.*, 2007, Fraaije *et al.*, 2002).

Pour suivre l'évolution du phénotype Hydr3⁺ chez *B. cinerea*, une méthode de PCR en temps réel allèle spécifique (ASPPAA pour « allele specific probe and primer amplification assay ») a été développée en se basant sur quatre allèles spécifiques (*erg27^{wt}*, *erg27^{F412S}*, *erg27^{F412I}* et *erg27^{F412V}*). La méthode ASPPAA basée sur l'utilisation d'amorces et de sondes spécifiques de chaque allèle permet de détecter et de quantifier les quatre allèles de *erg27* à plus de 1% dans un mélange de conidies dans quatre réactions de qPCR séparées (Billard *et al.*, 2012).

L'espèce *B. pseudocinerea* vit en sympatrie avec l'espèce *B. cinerea*, mais elle est minoritaire dans les populations de pourriture grise avec des proportions variables selon les saisons (Walker *et al.*, 2011). Afin de comprendre pourquoi l'espèce *B. pseudocinerea* ne prend pas plus d'importance sous la pression de sélection du fenhexamid et de mieux connaître sa niche écologique, nous avons développé un test moléculaire permettant, dans un premier temps, de détecter et de quantifier le genre *Botrytis* dans les échantillons de pourriture grise, puis dans un second temps, de détecter et de quantifier uniquement l'espèce *B. pseudocinerea* au sein du genre *Botrytis*. En collaboration avec l'Anses, nous avons développé un marqueur spécifique de *Botrytis* et un marqueur spécifique de *B. pseudocinerea* utilisables en PCR en temps réel. Cette nouvelle méthode, nommée BpASP, sera détaillée dans les paragraphes suivants.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et conditions de cultures

Les espèces utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 1. Toutes les souches ont été cultivées sur milieu malt-agar (2 g l-1 malt agar, 2 g l-1 extrait de levure, 15 g l-1 agar) à 20°C exposé de façon continue à la lumière UV pendant une semaine pour stimuler la sporulation. Les espèces *Penicillium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erysiphe necator*, *Plasmopora viticola*, *Guignardia bidwellii* ainsi que les feuilles de plantes (vigne, poireau, fraise, framboisier) ont été fournies par dans le laboratoire de l'Anses.

Tableau 1 : liste des espèces utilisées dans cette étude.

Espèce	Souche	Origine	Espèce	Souche	Origine
<i>B. pseudocinerea</i>	VD165	Champagne	<i>B. fabae</i>	2230	Tunisie
	VD195	Champagne		2235	Tunisie
	VD256	Champagne		2240	Tunisie
	900	Champagne	<i>B. pellargonii</i>	1998	van Kan collection
	VD296	Champagne	<i>B. calthae</i>	2009	van Kan collection
	VD312	Champagne	<i>Guignardia bidwellii</i>	BR	France
	VD696	Champagne	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	183.13a	France
<i>B. cinerea</i>	B05.10	Allemagne	<i>Penicillium</i>	LSV.P	France
	VD390	Champagne	<i>Erysiphe necator</i>	Odium	France
	VD661	Champagne	<i>Plasmopora viticola</i>	Mildiou	France
	VD681	Champagne			
	VD340°	Champagne			

2. Extraction d'ADN.

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir des souches pures en utilisant le kit d'extraction kit DNeasy Plant (Qiagen). L'ADN a été quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop, Wilmington, USA). Chaque extrait d'ADN a été quantifié indépendamment trois fois. Les préparations d'ADN ont été conservées à 4°C.

Chapitre II

3. Dessin des amorces et des sondes ; conditions de PCR.

Deux couples d'amorces/sondes ont été dessinés pour chaque marqueur avec le logiciel Primer3 Web 4.0.0 (Koressaar & Remm, 2007). La $T^{\circ}m$ des amorces est de 64°C alors que celle des sondes est supérieure de 6°C par rapport aux amorces. Les sondes TaqMan® nommées Botrytis et Bpseudo ont été synthétisées par Eurogentec (Tableau 2). L'amorce MS547-sens et la sonde Bpseudo contiennent des acides nucléiques bloqués (locked nucleic acid LNA), c'est des analogues d'acides nucléiques contenant un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2 et carbone 4 du sucre. Elles confèrent une stabilité lors de l'hybridation.

Chapitre II

Tableau 2 : Séquences des amorces et des sondes utilisées pour détecter et quantifier respectivement le genre *Botrytis* et l'espèce *B. pseudocinerea*. Les bases LNA sont indiquées en rouge.

	Nom	Séquences	Rapporteur/quencher	T°m
<i>Botrytis</i>	G3PDH-sens	AACACCGGTGGACTCGAC		64
	G3PDH-reverse	TGGAGGTCAATGGCAAGAAG		
	Sonde Botrytis	CCCATGGGATGTTGGCTGGGT	6-FAM/BHQ1	70
<i>B. pseudocinerea</i>	MS547-sens	TGGGAGCTTTCCAGAGACATAG		64
	MS547-reverse	CTTATGCTTCCGGGAAATTG		
	Sonde Bpseudo	TTTGCGCCAGAGCTGATACTTCCT	Cy5/BHQ2	70

Chapitre II

Tous les essais de qPCR ont été effectués sur le LightCycler[®] 480 (Roche[®] Diagnostics) et les analyses avec le logiciel LightCycler[®] 480 software. Les réactions de PCR ont été réalisées dans des plaques à 96 puits, chaque plaque étant ensuite couverte d'un film optique adhésif. Tous les mélanges réactionnels ont été préparés dans les volumes finaux de 20 µl, La spécificité des amorces pour le genre *Botrytis* et pour l'espèce *pseudocinerea* a été au préalable vérifiée par qPCR en sybrgreen. Les mélanges réactionnels ont été constitués avec 2µL d'ADN extrait, du tampon LightCycler[®] 480 Syber Green I Master Roche[®] à une concentration finale de 1X et des amorces sens et reverse spécifiques du genre *Botrytis* ou de l'espèce *pseudocinerea* à une concentration final de 0.3 mM. Le programme de PCR est le suivant : 1/ Etape d'activation à 95°C pendant 15 min. 2/ Etape d'amplification répétée 40 fois constitué d'une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, d'une d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes, d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes.. Lorsque la spécificité des amorces a été validée en Sybrgreen. Les qPCR Taqman ont été réalisées avec un milieu réactionnel constitué du FastStart TaqMan Probe Mastrer mix de chez Roche[®] à une concentration de 1X. Plusieurs concentrations d'amorces sens, d'amorces reverse et de sondes (de 0,2µM à 0,4µM) ont été testées pour chacune des qPCR Taqman mises au point. Au final, les concentrations retenues, pour la qPCR spécifique du genre *Botrytis*, sont de 0,2 µM pour la sonde et chacune des amorces (G3PDH-sens et G3PDH-reverse). Pour la qPCR spécifique de l'espèce *pseudocinerea*, les concentrations retenues sont des concentrations de 0,4 µM pour la sonde et pour chacune des amorces (MS547-sens et MS547-reverse). Le cycle de qPCR est constitué d'une activation de la Taq de 95°C pendant 10 min, puis de 40 cycles d'amplification constitués d'une dénaturation de 95°C pendant 15 secondes et d'une hybridation- élongation de 60°C pendant 50 secondes. La fluorescence est mesurée au cours de cette étape hybridation-élongation.

Chapitre II

Pour évaluer la linéarité, l'efficacité et l'optimisation de la PCR en temps réel, nous avons utilisé l'ADN dilué dans l'eau (DNase free) à différentes concentrations : ADN de la souche VD340 de *B. cinerea* à 56 ng μL^{-1} 5,6 ng μL^{-1} 0.56 ng μL^{-1} 0.056 ng μL^{-1} 0.0056 ng μL^{-1} 0.00056 ng μL^{-1} et de la souche VD296 de *B. pseudocinerea* : 35 ng μL^{-1} 3,5 ng μL^{-1} 0.35 ng μL^{-1} 0.035 ng μL^{-1} 0.0035 ng μL^{-1} . La relation $E = (10^{(-1/a)} - 1)$ a permis de calculer l'efficacité des amorces et des sondes, (a) représente la pente de la droite de régression de la courbe étalon dont la précision est jugée par le coefficient R^2 .

Nous avons estimé deux paramètres afin de déterminer la limite minimale de détection ainsi que la limite minimale de quantification de notre méthode. La limite minimale de détection (LOD = limit of detection) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pour laquelle la méthode donne moins de 5% de faux négatifs³ ($\text{LOD} = 3x(S_{xy}/|a|)$). La limite minimale de quantification (LOQ = limit of quantification) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode⁴ ($\text{LOQ} = 10x(S_{xy}/|a|)$), (a) représente la pente, (S_{xy}) : le résiduel ou standard déviation. Les deux paramètres ont été calculés pour les deux gammes décrites ci-dessus.

4. Mélanges d'ADN de *B. cinerea* et *B. pseudocinerea*

Afin de valider la méthode de qPCR allèle spécifique, nous avons réalisé une gamme de mélanges d'ADN de *B. cinerea* et de *B. pseudocinerea* (0% ; 2% ; 5% ; 10% ; 25% ; 50% ; 75% ; 100% d'ADN de *B. pseudocinerea*). En se basant sur l'équation de la courbe de régression $y = ax+b$, (a = la pente de l'équation, x= la concentration d'ADN, y = Cq observé) pour calculer la quantité d'ADN. Ensuite nous avons estimé la corrélation entre la concentration d'ADN théorique et la concentration d'ADN calculée par le coefficient R^2 .

³ La norme expérimentale XP V03-02-2

⁴ La norme expérimentale XP V03-020-2

III. Résultats :

1. Principe de la méthode

La méthode que nous avons développée consiste à détecter et à quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* dans les populations naturelles fongiques de la pourriture grise. Cette méthode se fait en deux étapes : la première étape consiste à détecter et quantifier le genre *Botrytis* dans les échantillons de pourriture grise, la deuxième étape permet de détecter et de quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* dans le genre *Botrytis*. L'approche en deux étapes est nécessaire pour un maximum de précision dans un échantillon naturel comportant également potentiellement d'autres espèces fongiques ainsi que des débris végétaux.

Pour discriminer le genre *Botrytis* et l'espèce *B. pseudocinerea* dans un pool d'ADN, nous avons dessiné deux couples d'amorces/sonde, l'un spécifique du genre *Botrytis* et l'autre de l'espèce *B. pseudocinerea*. Chaque couple d'amorces est fluorescence TaqMan[®] portant un fluorochrome différent (Figure 1). La fluorescence émise sera proportionnelle à la quantité d'amplicon généré qui est en corrélation directe avec la quantité initiale de l'ADN ciblé.. Elle servira au calcul du ratio final d'ADN de *B. pseudocinerea* dans l'échantillon. Les deux réactions de qPCR initialement réalisées indépendamment pourront ultérieurement être programmées dans une réaction multiplex.

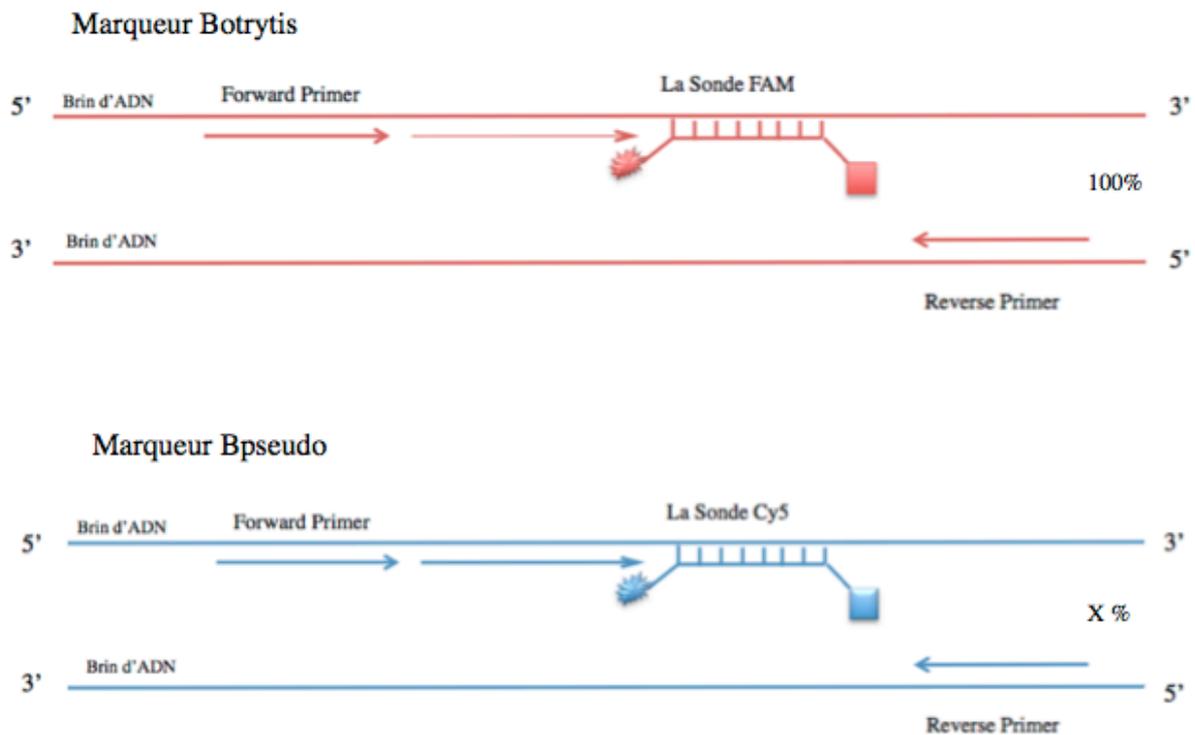


Figure 1 : Schéma de la méthode moléculaire *BpASP* pour quantifier *B. pseudocinerea* dans un échantillon de pourriture grise. Le marqueur «Botrytis» servira à quantifier le genre *Botrytis* dans l'échantillon (=100%) et le marqueur «Bpseudocinerea» pour quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* (X%) au sein du genre *Botrytis*. Les flèches représentent les amorces et les traits représentent les sondes TaqMan®, les astérisques et les carrés indiquent respectivement les fluorochromes et les les quencher.

2. Le choix des marqueurs spécifiques:

Afin de développer un marqueur spécifique du genre *Botrytis* et de l'espèce *B. pseudocinerea*, nous avons aligné les séquences nucléotidiques de différents gènes candidats entre les espèces du genre *Botrytis* et avec d'autres espèces fongiques (Fig. 2 et 3). Les gènes choisis ont été ceux généralement utilisés pour les études phylogéniques disponibles dans Genbank ; ceux de l'ARN hélicase (*ms547*), de la β -tubuline (*β -tub*) et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*g3pdh*), mais aussi celui de la 14 α -déméthylase (*cyp51*). La comparaison de séquences nucléotidiques du gène *g3pdh* des différentes espèces du genre *Botrytis* et d'autres espèces fongiques (*Penicillium ssp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erysiphe necator*, *Plasmopora viticola*, *Guignardia bidwellii*) a révélé la présence de plusieurs SNP (single nucleotide

Chapitre II

polymorphism), insertions et délétions permettant de discriminer le genre *Botrytis ssp* des autres espèces fongiques (Figure 2). Le gène *ms547* a été choisi pour le marqueur spécifique de l'espèce *B. pseudocinerea*. La comparaison des séquences nucléotidiques du gène *ms547* entre les différentes espèces de *Botrytis* (*B. aclada*, *B. calthae*, *B. fabae*, *B. cinerea*, *B. globosa*, *B. pelargonii*, *B. porri*, *B. galanthina*, *B. ficariarum*, *B. squamosa*, *B. croci*, *B. hyacinthi*, *B. polyblastis*, *B. tulipae*, *B. narcissicola*, *B. sphaerosperma*, *B. pseudocinerea*) a montré la présence d'une région riche en SNP permettant de distinguer l'espèce *B. pseudocinerea* des autres espèces *Botrytis ssp* (Figure 3).

Deux couples d'amorces/sondes ont été dessinés pour chaque marqueur. Sondes et amorces ne se chevauchent pas pour éviter de fausses hybridations et des amplifications aspécifiques. L'amorce G3PDH-sens a été dessinée d'une part et d'autre d'une délétion de 3 bp (position 710-713), la sonde Botrytis a été dessinée d'une part et d'autre de deux délétions successives de 32 bp (position 775-806) et 38 bp (position 819-855) respectivement, alors que l'amorce G3PDH-antisens se distingue par plusieurs SNP. Ce couple d'amorce permet d'amplifier un petit fragment de 104 bp.

L'amorce MS547-sens couvre deux SNP (CGG→CAG, TAA→TAG) alors que l'amorce MS547 anti-sens et la sonde Bpseudo couvrent respectivement un seul SNP (TTT→CTG) et (TTC→TCG). Le couple d'amorce MS547 sens et anti-sens amplifiera un petit fragment de 108 bp.

3. Validation des marqueurs Botrytis et Bpseudo

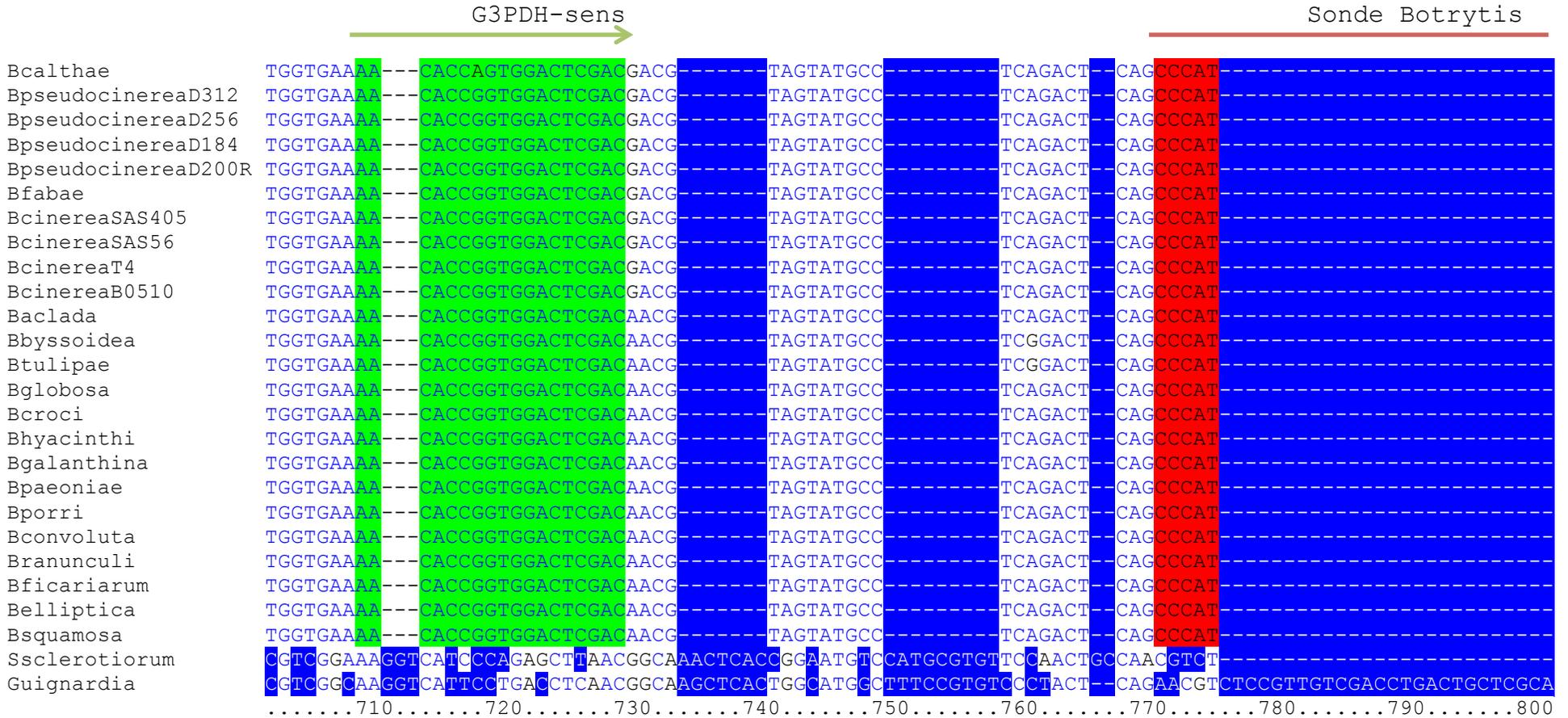
Avant de pouvoir utiliser nos couples d'amorces et primers, nous avons vérifié leur efficacité dans les réactions de PCR en temps réel et ainsi que la corrélation entre fluorescence émise et quantité d'ADN. Ces paramètres d'amplification ont été déterminés sur une gamme de concentration d'ADN de deux souches VD340 (*B. cinerea*) et VD296 (*B. pseudocinerea*) (Figure 4). La pente et l'intercepte indiquent une bonne répétabilité pour différents essais (3

Chapitre II

essais pour la souche VD340 et 2 essais pour la souche VD296 réalisés en triplicats). L'efficacité obtenue pour le couple amorces G3PDH/sonde Botrytis et le couple amorces MS547/sonde Bpseudo est respectivement de 111% et 106% (figure 4). Toutes les valeurs de R^2 sont supérieures à 0,99%. En plus, la faible variabilité d'intercepter suggèrent une bonne corrélation entre les quantités d'ADN et les valeurs Cq (Tableau 3).

Les deux paramètres, limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ), ont été estimés pour chacune des courbes étalons. Les LOD et LOQ pour la courbe standard (Botrytis) sont respectivement de 0,2 pg μL^{-1} et 0,6 pg/ μL^{-1} , alors que pour la courbe standard Bpseudo, la LOD est 0,7 pg μL^{-1} et la LOQ est de 2,6 pg/ μL^{-1} .

Chapitre II



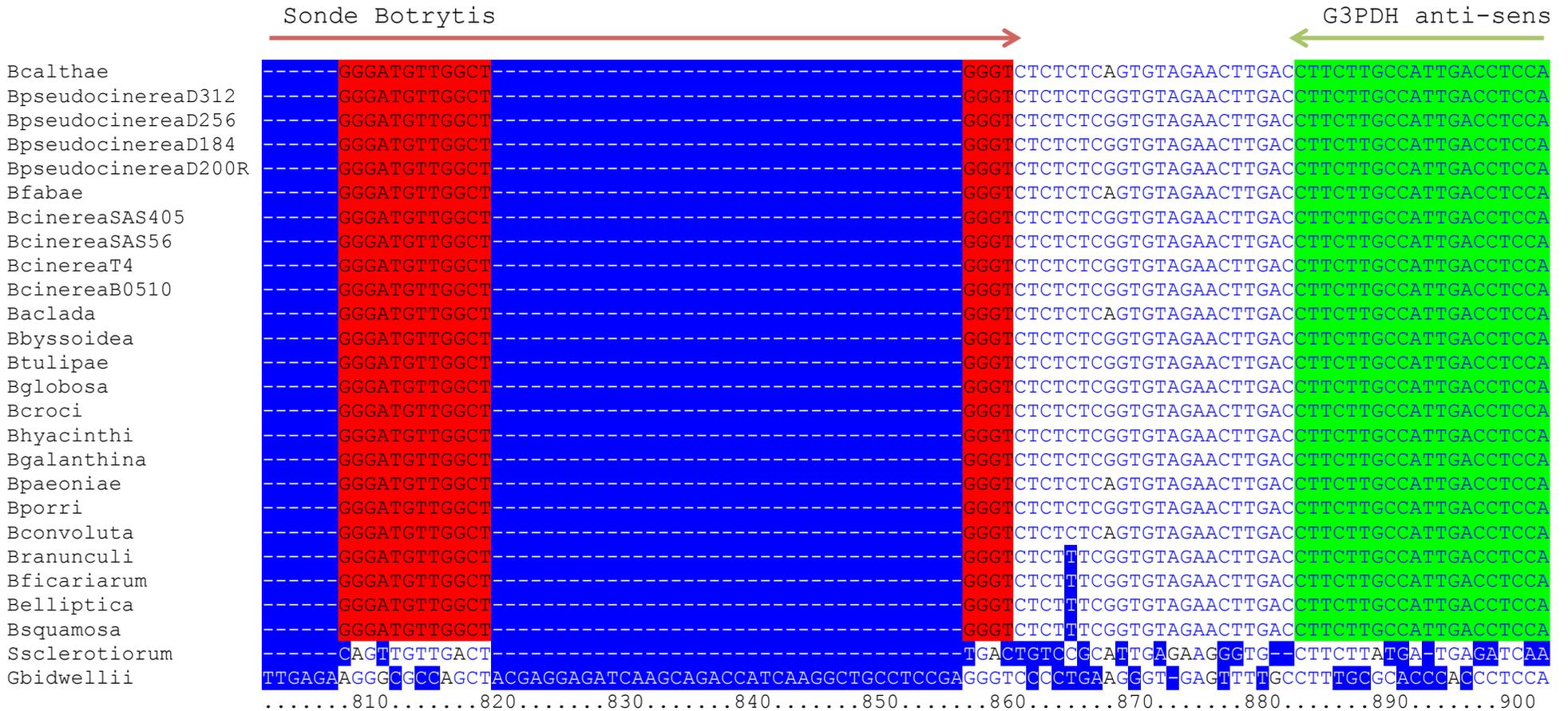
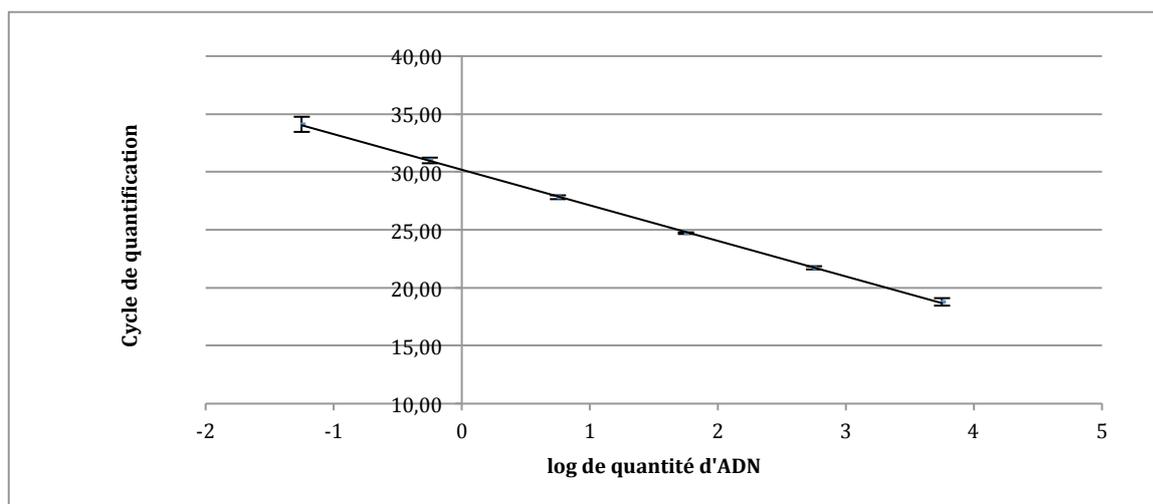


Figure 2 : Localisation des deux amorces G3PDH sens et anti-sens et de la sonde Botrytis sur le gène *g3pdh*. L'alignement des séquences nucléotidiques du gène *g3pdh* chez différentes espèces fongiques (*B. calthae*, *B. pseudocinerea*, *B. cinerea*, *B. aclada*, *B. byssoidea*, *B. tulipae*, *B. globosa*, *B. croci*, *B. hyacinthi*, *B. galanthina*, *B. paeoniae*, *B. porri*, *B. convoluta*, *B. ranunculi*, *B. ficariarum*, *B. elliptica*, *B. squamosa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Guignardia bidwellii*). La position des amorces est soulignée en vert, celle de la sonde en rouge.

A



B

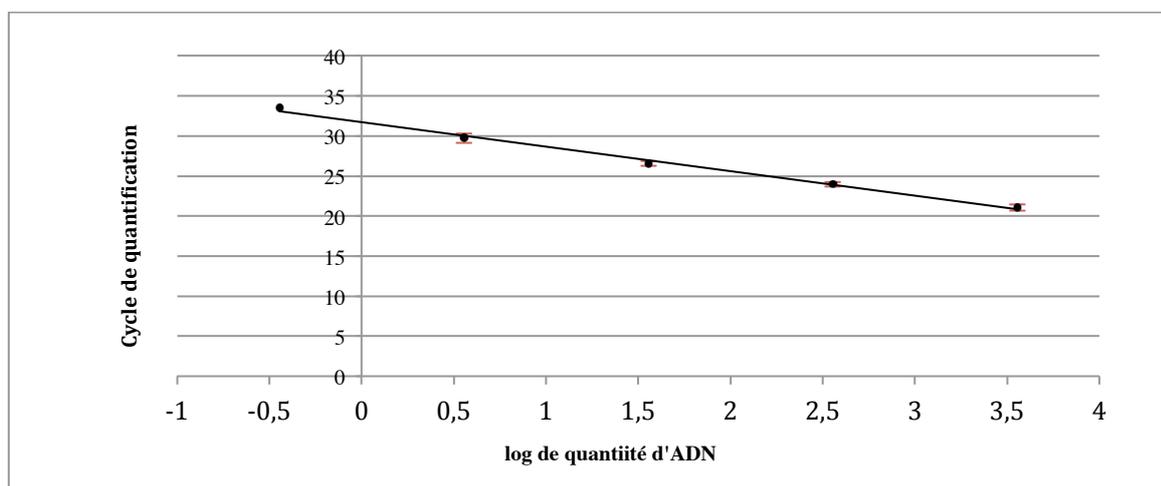


Figure 4 : Courbe étalon pour évaluer les couples d'amorces + sondes g3pdh/Botrytis (A) et ms547/Bpseudo (B). Le Cq est représenté en fonction du logarithme de la quantité d'ADN (n= 3).

Tableau 3 : Paramètres de PCR des couples primers+sondes Botrytis et *B. pseudocinerea* respectivement.

	<i>Botrytis spp</i>	<i>B. pseudocinerea</i>
Pente	-3,0705	-3,1714
Efficacité (%)	111%	106%
R²	>0,99	>0,99
Intercepter	29,49 ± 0,14	31,80 ± 0,32
LOD	0,2 pg µL-1	0,7 pg µL-1
LOQ	0,6 pg/µL-1	2,6 pg/µL-1

Chapitre II

4. Evaluation de la spécificité des deux marqueurs

Afin de tester la spécificité des sondes *Botrytis* et *Bpseudo*, nous avons mesuré la fluorescence émise par les sondes sur les ADN de souches fongiques pures ou de feuilles de plantes. Ces analyses ont montré que :

- Les valeurs obtenues de cycle de quantification (Cq) du marqueur *Botrytis* sont significatives seulement pour le gène *Botrytis*. Elles varient entre 15,9 et 29,9, alors que pour les autres espèces fongiques ainsi que pour les feuilles de plantes, les valeurs de Cq sont soit indétectables soit non significatifs (Cq > 35) (Tableau 4).
- La détection du marqueur *Bpseudo* est significative uniquement chez l'espèce *B. pseudocinerea*. Les valeurs de Cq varient entre 18,1 et 21,6. Les valeurs du Cq sont toutes supérieures à 35 chez les autres espèces du genre *Botrytis*. Pour les autres espèces fongiques aucune fluorescence n'est détectable (Tableau 4).

Ces résultats confirment que le marqueur *Botrytis* permet de détecter spécifiquement le genre *Botrytis* et que le marqueur *B. pseudo* détecte uniquement l'espèce *B. pseudocinerea*.

5. Quantification de *B. pseudocinerea* dans un mélange d'ADN

Afin d'imiter les conditions d'échantillons naturels, nous avons réalisé des mélanges d'ADN d'une souche *B. pseudocinerea* et d'une souche de *B. cinerea* à différentes concentrations (0%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% de *B. pseudocinerea* dans *B. cinerea*). La gamme a servi pour quantifier de l'ADN total du genre *Botrytis* et de l'ADN de *B. pseudocinerea* (Tableau 5).

Les résultats obtenus montrent une bonne corrélation entre le pourcentage théorique et le pourcentage calculé de *B. pseudocinerea* dans un mélange d'ADN (Figure 5). Le R² de la droite de régression entre les valeurs théoriques et calculées est 0,99. Cependant, les écarts entre les deux valeurs ne sont pas négligeables notamment pour les valeurs aux extrémités de

Chapitre II

la courbe (2,9% au lieu de 5% ; 5,5% au lieu de 10% ; 88,7% au lieu de 100%) et mériteraient d'être réduits (Tableau 5).

La nouvelle méthode que nous avons développée permet de quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* dans un pool de l'ADN avec une sensibilité inférieure à 2%.

Chapitre II

Tableau 4 : Analyse successive de la spécificité des deux marqueurs *Botrytis* et *Bpseudo*. Les deux valeurs obtenues représentent les valeurs de Cq, les valeurs entre les parenthèses indiquent les écarts types.

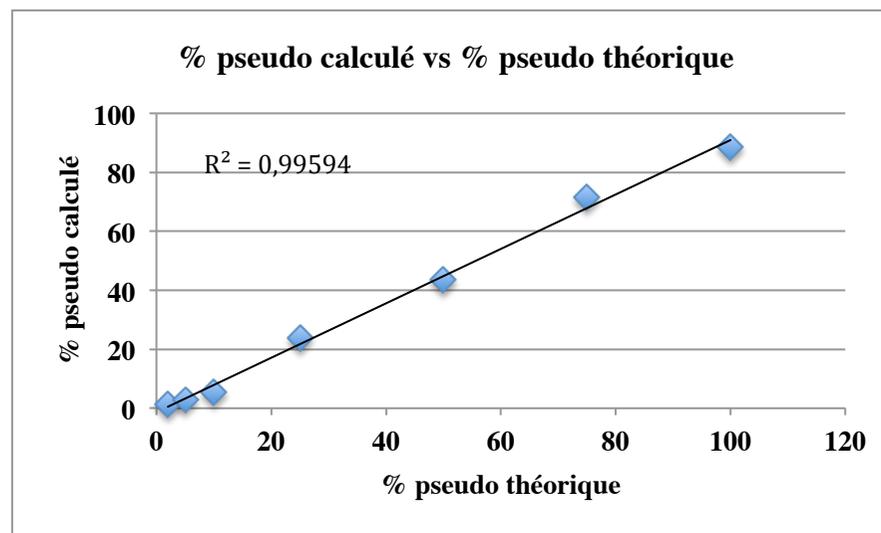
Espèce	Souche	Sonde Borytis		Espèce	Souches	Sonde Bpseudo	
		Botrytis (Cq)	B. pseudocinerea (Cq)			Botrytis (Cq)	B. pseudocinerea (Cq)
<i>B. cinerea</i>	VD661	15,9 (±0,67)	n.a	<i>B. fabae</i>	2230	29,9	n.a
	VD681	18,8 (± 0,01)	n.a		2235	29,4 (± 0,06)	n.a
	VD390	17,7 (± 0,66)	n.a	<i>B. pelargonii</i>	1998	17,2 (± 0,06)	n.a
	B05.10	20,7 (± 0,09)	n.a	B. calthae	1999	*	*
<i>B. pseudocinerea</i>	VD165	18,1 (± 0,10)	18,6 (±0,04)	<i>Guignardia bidwellii</i>	CBS.1111	n.a	n.a
	VD169	18,3 (± 0,14)	19,045 (0,21)	<i>Sclerotinia sclerotinium</i>	186.39	n.a	n.a
	VD256	18,06 (± 0,19)	19,51	<i>Penicillium</i>	LSV	n.a	n.a
	VD296	17,8 (± 0,08)	18,7 (±0,01)	<i>Plasmopora viticola</i>	Mildiou	n.a	n.a
	VD312	17,1 (± 0,12)	18,1 (±0,14)	<i>Erysiphe necator</i>	Odium	n.a	n.a
	VD696	17,5 (± 0,37)	18,2 (0,01)	Feuilles de plantes	Vigne	n.a	n.a
	900	17,1 (± 0,06)	21,6 (±0,57)		Poireaux	n.a	n.a
			Fraisier		n.a	n.a	
				Framboise	n.a	n.a	

n.a : non amplifié. * : souche non pure.

Tableau 5 : Comparaison entre le pourcentage théorique et calculé de *B. pseudocinerea* dans des mélanges d'ADN (n=2).

%pseudo théorique	[ADN] Botrytis	[ADN] pseudo	Cq <i>Botrytis</i>	Cq <i>B. pseudocinerea</i>	[ADN] total calculé	[ADN pseudo] calculé	% pseudo calculé
2	3570	71,4	19,50 (± 0,35)	26,48 (± 0,36)	3577,47	47,50	1,3
5	3570	178,5	19,45 (± 0,33)	25,37 (± 0,55)	3702,69	105,74	2,9
10	3570	357	19,58 (± 0,29)	24,60 (± 0,15)	3368,43	185,84	5,5
25	3570	892,5	19,52 (± 0,31)	22,52 (± 0,11)	3529,71	839,35	23,8
50	3570	1785	19,52 (± 0,29)	21,70 (± 0,29)	3516,08	1526,01	43,4
75	3570	2677,5	19,58 (± 0,31)	21,07 (± 0,24)	3369,52	2407,41	71,4
100	3570	3570	19,56 (± 0,19)	20,75 (± 0,17)	3415,11	3028,01	88,7

Figure 5 : Corrélation entre les valeurs théoriques et calculées de *B. pseudocinerea* dans les mélanges d'ADN déterminés par BpASP.



IV. Discussion :

La méthode que nous avons développée est une méthode de qPCR espèce spécifique permettant de discriminer l'espèce *B. pseudocinerea* dans des populations naturelles fongiques. Contrairement aux méthodes de qPCR spécifiques d'allèles de résistance qui détectent une mutation ponctuelle responsable de la résistance au fongicide, les méthodes spécifiques d'espèces se basent plutôt sur des gènes neutres tels que ceux utilisés pour les études phylogéniques. La présence de plusieurs SNPs, délétions et insertion aux niveaux des gènes permet de discriminer l'espèce étudiée avec des amorces hautement spécifiques (Atkins *et al*, 2004 ; Reischer *et al*, 2004 ; Denman and McSweeney, 2005). En revanche, la difficulté pour développer les méthodes qPCR espèce spécifiques est d'identifier le marqueur discriminant l'espèce en l'absence de séquences génomiques de certaines espèces fongiques ainsi que de trouver le polymorphisme conservé seulement chez l'espèce étudiée sans variation intra-espèce.

1. Mise au point de la technique BpASP

Lors de la mise au point d'une méthode de qPCR espèce spécifique l'étape cruciale est d'obtenir efficacité, spécificité et sensibilité acceptables. Les résultats et les paramètres (E, R², intercepte) de notre test BpASP sont encourageants. De plus ils semblent solides par leur bonne répétabilité. Cependant, ces résultats restent à améliorer. Une bonne efficacité se situe entre 90% et 110%, alors que la valeur obtenue à partir de la courbe étalon *Botrytis* est de 111%. Ceci peut être dû probablement à des erreurs expérimentales (pipetage), car les courbes de fusion n'ont révélées aucune amplification aspécifique. La valeur d'efficacité de la courbe d'étalon Bpseudo est acceptable, elle est de 106%.

En terme de spécificité, les résultats préliminaires confirment que les deux marqueurs choisis permettent de discriminer respectivement le genre *Botrytis* et l'espèce *B. pseudocinerea*. En

Chapitre II

revanche, la grande variabilité des valeurs Cq entre les différentes souches est probablement due à l'utilisation de concentrations d'ADN initiales différentes.

La sensibilité de notre méthode avec un seuil de 2% pour quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* nous semble bonne, mais l'écart entre le pourcentage théorique et calculé dans les mélanges d'ADN de notre test nous paraît encore trop élevé pouvant atteindre 42% aux faibles doses. Cet écart pourrait être lié à des erreurs expérimentales lors de mélange des ADN de *B. pseudocinerea* et *B. cinerea* et nécessite encore plusieurs répétitions.

2. Optimisation de la mise au point.

Afin que la méthode BpASP soit opérationnelle pour détecter et quantifier l'espèce *B. pseudocinerea*. Il faudra donc d'une part, améliorer l'efficacité des amorces G3PDH et de la sonde Botrytis. Ceci nécessite éventuellement préparation de gammes étalons plus précises. Le cas échéant, il conviendrait redessiner les amorces et/ou la sonde. Il faudra également vérifier la spécificité des amorces et des sondes sur des ADN de même qualité à des concentrations égales de plusieurs espèces de *Botrytis* et pas uniquement les espèces proches phylogénétiquement de *B. pseudocinerea*, afin d'optimiser la détection de l'espèce étudiée et de définir un seuil Cq de détection. Par ailleurs, il reste à vérifier la précision de la quantification à partir de nouveaux mélanges d'ADN de *B. pseudocinerea* et de *B. cinerea* (différentes souches de *B. pseudocinerea* et de *B. cinerea* et différentes concentrations) afin d'éliminer l'effet souche et d'améliorer la sensibilité et la précision de la quantification.

Enfin, il nous reste à tester les amorces et les sondes sur un mélange calibré de spores et comparer les résultats avec les tests biologiques pour valider la quantification de l'espèce *B. pseudocinerea* avant de pouvoir l'appliquer sur des échantillons naturels de pourriture grise.

3. Application et utilité de la méthode BpASP

L'espèce *B. pseudocinerea* est naturellement résistante au fenhexamid. Cet anti-botrytis est utilisé à la période de floraison sur vigne et, par conséquence, l'espèce *B. pseudocinerea*

Chapitre II

devrait être sélectionnée par le fenhexamid et être présente à des fréquences importantes dans le vignoble. En revanche, les données populationnelles ont montré que *B. pseudocinerea* représente entre 0 et 15% des populations de la pourriture grise (Walker et al, 2011). Cette faible fréquence reste inexplicable. Notre méthode BpASP permettra de suivre l'évolution de l'espèce *B. pseudocinerea* dans les populations de la pourriture grise et d'évaluer l'effet du fenhexamid sur sa sélection.

Les études basées sur le critère d'espèce écologique suggèrent que l'espèce *B. pseudocinerea* à un mode de vie saprophytique (présence sur les pièces florales mortes) (Walker et al, 2011). L'analyse par BpASP de différents échantillons de pourriture grise selon l'année, la plante hôte, la région et le climat, nous permettra de comprendre la niche écologique de cette espèce, son mode de vie et son épidémiologie. Par ailleurs, cette méthode pourra servir de modèle pour détecter et quantifier le phénotype HydR2 de *B. cinerea* dans ces populations (voir chapitre III).

Chapitre II

Chapitre III

Cartographie du locus responsable du phénotype HydR2

I. Introduction.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le phénotype HydR2 de l'espèce *B. cinerea* est très rare dans les vignobles français. Afin de tester si la résistance des souches HydR2 était liée à la cible, le gène *erg27* a été séquencé et son expression a été testée au laboratoire. Les résultats n'ont montré aucune différence par rapport aux souches *B. cinerea* sensibles (HydS). Ceci exclut l'implication du gène *erg27* dans la résistance des souches HydR2 (Billard, 2011). Des études de synergie entre le fenhexamid et les inhibiteurs de déméthylation (IDMs) ont montré un effet synergique entre ces deux composants chimiques, suggérant un mécanisme similaire à celui de *B. pseudocinerea* et l'implication d'une monooxygénase à cytochrome P450 dans la résistance (Leroux *et al.*, 2002). L'inactivation du gène *bccyp684* chez les isolats HydR2 n'a entraîné aucune différence de sensibilité au fenhexamid (Billard, com. pers) excluant ainsi sa participation au phénotype HydR2. L'implication d'un autre cytochrome P450 dans la résistance des souches HydR2 devrait donc être envisagée. Par ailleurs, contrairement à *B. pseudocinerea*, les isolats HydR2 ne présentent pas de résistance croisée négative à l'édinfenphos (Tableau 1).

Tableau 1: Caractéristiques des souches HydR2 (Leroux et al., 2002)

Caractéristiques des souches HydR2	
Facteur de résistance au fenhexamid :	
• Tube germinatif (élongation)	≈2,0
• Croissance mycélienne	≈50
Réponse <i>in vitro</i> (croissance mycélienne)	
• IDM	Sensible
• Inhibiteurs de la $\Delta 14$ -réductase (fenpropimorph, fenpropidin)	Sensible
• Phosphorothiolates (edifenphos)	Résistant
Fenhexamid + DMIs	synergie

Les souches HydR2 dont la souche 1750 que nous allons utiliser pour nos études, se caractérisent par une pigmentation rose. Ce phénotype est dû à un métabolite secondaire nommée bikavérine. Le cluster de gènes *bik* est responsable de la biosynthèse de la bikavérine. Ce cluster identifié chez *Fusarium fujikuroi* est composé de six gènes *ffbik1* à

ffbik6 (Balan *et al.*, 1970; Schumacher *et al.*, 2013). Ils codent respectivement une polyketide synthase (PKS), une monooxygénase à domaine FAD, une O-méthyltransférase, un répresseur de la transcription dit «NmrA-like», un facteur de transcription à cluster de zinc ($Zn(II)_2Cys_6$) et un transporteur membranaire de type major facilitator superfamily «MFS» (Wiemann *et al.*, 2009). L'homologue du cluster *ffbik* a été identifié chez *B. cinerea* et son séquençage chez les souches de *B. cinerea* roses a montré qu'il est similaire à celui de *F. fujikuroi*, alors qu'il est incomplet chez les souches grises. Les études conduites par (Schumacher *et al.*, 2013) ont montré l'absence du gène *bik1* et la présence de plusieurs mutations et délétions dans les deux gènes *bcbik2* et *bcbik3* chez les souches grises (B05.10). La biosynthèse de la bikavérine sensible nécessite un cluster *bik* complet et fonctionnel (Figure 1).

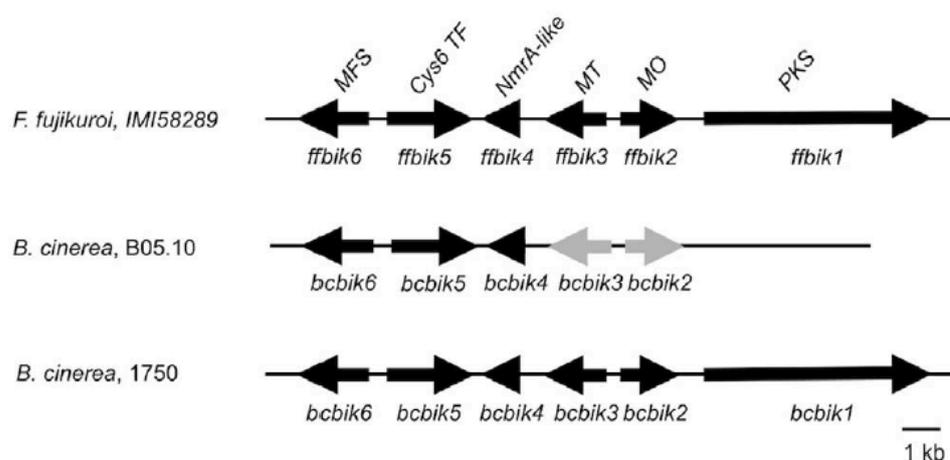


Figure 1 : Schéma représentative du cluster *bik* chez *F. fujikuroi*, et chez des souches grise et roses de *B. cinerea* respectivement. MFS : transporteur de type Major facilitator Superfamily, Cyp6 TF : facteur de transcription en $Zn(II)_2Cys_6$, NmrA-like : protéine de type NmrA-like, MT : O-méthyltransférase, MO : monooxygénase à domaine FAD et PKS : polyketide synthase. Les deux gènes *bcbik2* et *bcbik3* de B05.10 présentant des mutations et délétions sont indiqués en gris (Schumacher *et al.*, 2013).

L'étude de la distribution du cluster *bik* chez d'autres espèces de *Botrytis* a montré la présence du gène *bcbik6* chez plusieurs souches de *B. cinerea*, *B. pseudocinerea* et *B. pelargonii* du clade I et chez *B. tulipae* du clade II. En revanche, le gène *bcbik1* est présent uniquement chez les souches roses de *B. cinerea*. Ceci suggère que l'ancêtre commun du clade I et clade II a acquis le cluster *bik* par transfert horizontal à partir de *Fusarium ssp.*

Chapitre III

Par ailleurs, les analyses phylogénétiques ont montré que toutes les souches grises de *B. cinerea* ont perdu le gène *bcbik1* qui code l'enzyme clé de la biosynthèse.

Chez *F. fujikuroi* un complexe protéique nommé VELVET est impliqué dans la régulation du cluster *bik* (Wiemann *et al.*, 2009). Ce complexe est constitué de plusieurs protéines dont VeA et VelB. Chez *A. nidulans*, il a été montré que ce complexe se forme dans le cytosol, puis qu'il est exporté dans le noyau afin de contrôler le métabolisme secondaire et le développement sexuel du champignon (Bayram & Braus, 2012). L'exposition à la lumière provoque l'accumulation de ce complexe dans le cytosol, alors que dans l'obscurité le complexe VeA-VelB s'accumule dans le noyau pour induire le développement sexuel.

La protéine VeA contient le domaine conservé 'velvet' dans sa région N-terminal ainsi que plusieurs motifs conservés : un signal de localisation nucléaire (NLS), un signal d'export nucléaire (NES) et un domaine de dégradation protéiques enrichi en résidus P, E, S et T d'où le nom domaine PEST (Figure 2).

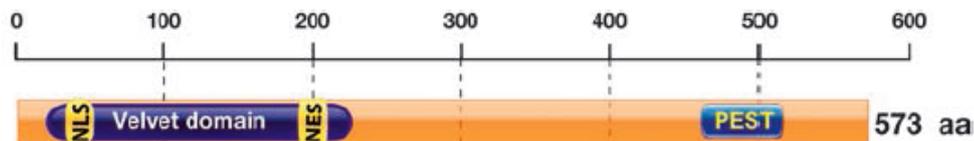


Figure 2 : Schéma indicatif des domaines conservés de la protéine VeA d'*A. nidulans*: Le domaine velvet est situé dans la région N-terminal (23-230aa), deux motifs sont situés dans domaine velvet, NES : nuclear export signal et NLS : nuclear localization signal. Le domaine PEST est localisé dans la région C-terminal (Bayram & Braus, 2012).

Récemment, un gène homologue de *veA* a été identifié chez *B. cinerea* (*bcvell*). Il est impliqué dans plusieurs processus tels que la production des sclérotes et le contrôle de l'expression du cluster *bik* (Schumacher *et al.*, 2012).

Afin de déterminer le mécanisme de résistance chez les souches Hydr2 et d'identifier le gène ou l'allèle *hydr2*, nous avons choisi l'approche du clonage positionnel. Cette stratégie consiste à identifier la région génomique portant l'allèle recherché, en l'occurrence celui

Chapitre III

conférant le phénotype HydR2, par le génotypage des descendants d'un croisement entre des parents ayant des phénotypes opposés : HydR2 et HydS.

Le génotypage se fait à l'aide de marqueurs polymorphes neutres, du type microsatellites, qui peut ensuite être affiné par le dessin de marqueurs spécifiques au croisement.

C'est pour cela, qu'un croisement entre la souche de référence sensible SAS405 (HydS) et la souche résistante 1750 (HydR2) a été réalisé et leur descendance analysée.

II. Matériels et méthodes

1. Milieux de cultures et condition de croissance.

Les milieux de cultures utilisés sont : malt-agar (2 g l⁻¹ malt agar, 2 g l⁻¹ extrait de levure, 15 g l⁻¹ agar) pour les tests de production de sclérotés et milieu sisler (10 g l⁻¹ glucose, 2 g l⁻¹ K₂HPO₄, 2 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ 7H₂O, 2 g l⁻¹ extrait de levure) pour le test de sensibilité au fenhexamid.

L'ensemencement des souches se fait à partir des spores ou d'implants mycéliens d'environ 0,5 cm de diamètre. Le temps d'incubation idéal pour obtenir des spores est une semaine sous la lumière blanche dans une chambre d'incubation à 20°C. Il est possible d'incuber les souches sous la lumière UV afin de stimuler la sporulation.

Le croisement sexuel entre les souches *B. cinerea* 1750 et SAS405 s'effectue selon la méthode de (Faretra *et al.*, 1988). Les souches parentales sont cultivées à 17°C sur milieu ML à l'obscurité pendant deux semaines et ensuite incubées pendant un mois à 4°C pour induire la formation des micro-conidies et de sclérotés. On mélange 3 à 6 sclérotés avec 1 ml de suspension de micro-conidies. Le mélange est incubé à 10°C à une photopériode de 16 h par jour jusqu'à développement d'apothécies. Celles-ci sont disséquées pour isoler les ascospores qui seront cultivés sur un milieu sisler.

Chapitre III

2. Analyses phénotypiques des descendants.

- Formation des sclérotés

Il s'agit de repiquer les souches à tester sur milieu ML, les incubés à 20°C à l'obscurité pendant une semaine ensuite à 4°C pendant un mois à l'obscurité pour induire la formation des sclérotés.

- Test de sensibilité au fenhexamid.

Les souches à tester seront d'abord ensemencées par repiquage sur milieu sisler et incubées à l'obscurité à 20°C pendant trois jours afin d'obtenir un mycélium jeune pour effectuer le test de sensibilité au fenhexamid. Elles sont ensuite repiquées en duplicata sur quatre concentrations de fenhexamid qui sont 0 mg l⁻¹, 0,5 mg l⁻¹, 2,5 mg l⁻¹ et 5 mg l⁻¹. Le témoin correspond au point 0 mg l⁻¹. Après repiquage, les individus sont incubés à 20°C à l'abri de la lumière pour empêcher la sporulation. On mesure la croissance radiale au cours de troisième jour et quatrième jour. Les souches sensibles ne poussent plus à partir de 0,5 mg l⁻¹ alors que les souches résistantes poussent sur toutes les concentrations. En parallèle on observe la pigmentation du mycélium sur la boîte témoin 0.

3. Analyses génotypiques des descendants.

Au cours de ce travail, deux méthodes d'extractions d'ADN ont été utilisées : l'extraction d'ADNg par kit *MO BIO Laboratories* ; *INC* et l'extraction par robot Qiagen 3000 (Dneasy Plant ...) selon les instructions des fournisseurs.

Le temps d'extraction d'ADNg avec le kit *MO BIO Laboratories* est relativement court, environ une heure mais le volume final de produit reste limité, 50µl. La concentration en ADNg est entre 100ng µl⁻¹ et 300ng µl⁻¹.

Chapitre III

- Extraction d'ADNg par Biorobot 3000.

Avec cette méthode d'extraction robotisée, (Qiagen 3000), un minimum de 96 extractions peuvent être fait au même temps. Les solutions utilisées pour l'extraction lequel sont celles du kit Dneasy Plant (Qiagen). Le temps d'extraction est d'environ trois heures et les volumes finaux sont variables. Le manipulateur décide du volume final. Par contre les concentrations finales restent faibles, entre $5\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ et $100\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.

- Tests PCR pour identifier le cluster bik et le type sexuel.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec l'enzyme Titanium Taq polymérase (Clontech) utilisée à $0,15 \mu\text{l}$ pour $15 \mu\text{l}$ de réaction. Le tampon de réaction est celui fourni avec l'enzyme à une concentration finale de 1X. Les différentes amorces utilisées citées dans le tableau 2 ont été utilisées à une concentration finale de $0,2 \text{ mM}$ et les dNTPs à une concentration finale de 2 mM . Après une première étape à 95°C pendant 1 minute pour inactiver l'anticorps bloquant la Taq polymérase, 25 à 35 cycles d'amplifications sont réalisés. Chaque cycle comprend 15 secondes à 95°C (dénaturation), 10 secondes au T_m (température d'hybridation de l'amorcehybridation) et 1 minute par kb à amplifier à 68°C (amplification).

Chapitre III

Tableau 2 : liste des amorces utilisées :

Nom d'amorce	Séquence 5' → 3'	utilisation
<i>Mat-F</i>	AGCTTCTGTTGGTGCGAAGT	Distinction du type sexuel
<i>Mat1-1-R</i>	GGGCGACTTTTTCAGTCTTC	
<i>Mat1-2-R</i>	ATGTGGGCTGTTGCAGGTTT	
<i>Bik-F1</i>	GGTAGCGACTAGAGCCGTTG	Absence du gène <i>bcbik1</i> .
<i>Bik-R14</i>	AGGACGCCGAGACACTAAGA	
<i>Bik1-F6</i>	GTTTCGACAGACGAGCTGAAA	Présence du gène <i>bcbik1</i> .
<i>Bik1-R6</i>	TCGATCTTTGGTCAGGCTCT	
<i>Bc51-F</i>	ATGCACGCACAAATTCACAT	Microsatellites polymorphes
<i>Bc51-R</i>	TGAGATTGAGATTTATAAACC	
<i>Bc53-F</i>	GGCTTTTCCTTGGGTTTCTC	
<i>Bc53-R</i>	CATCTCCTCTCTGCAGCACA	
<i>Bc71-F</i>	TACGCCGATTCCTCAAATTC	
<i>Bc71-R</i>	TGTTTGAAGAGGGAGGGGAGA	
<i>Bc161-F</i>	GTCCGGGCTTTAAAATCACA	
<i>Bc161-R</i>	TTTTCATTTCCATGGCCAAT	

III. Résultats.

Le croisement entre la souche parentale 1750 de type sexuel *mat1-1*, incapable de produire des sclérotés, de phénotype rose et résistant au fenhexamid d'une part, et la souche parentale SAS405 de type sexuel *mat1-2*, capable de produire des sclérotés, de phénotype gris et sensible au fenhexamid d'autre part a donné naissance à 74 descendants (Figure 3). Nous les avons analysé par des tests phénotypiques et génotypiques afin d'établir s'ils ont hérité des caractères phénotypiques et génotypiques des deux parents en d'autres mots, s'il y a eu recombinaison génétique.

Concernant le phénotype des descendants, nous avons analysé les caractères différents entre les souches parentales : la sensibilité au fenhexamid, la production de sclérotés, ainsi que la pigmentation du mycélium (gris ou rose) (Figure 3).

Par PCR, nous avons vérifié le type sexuel des individus et la présence du cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la bikavérine, avant l'étude de ségrégation de marqueurs microsatellites (Tableau 2).

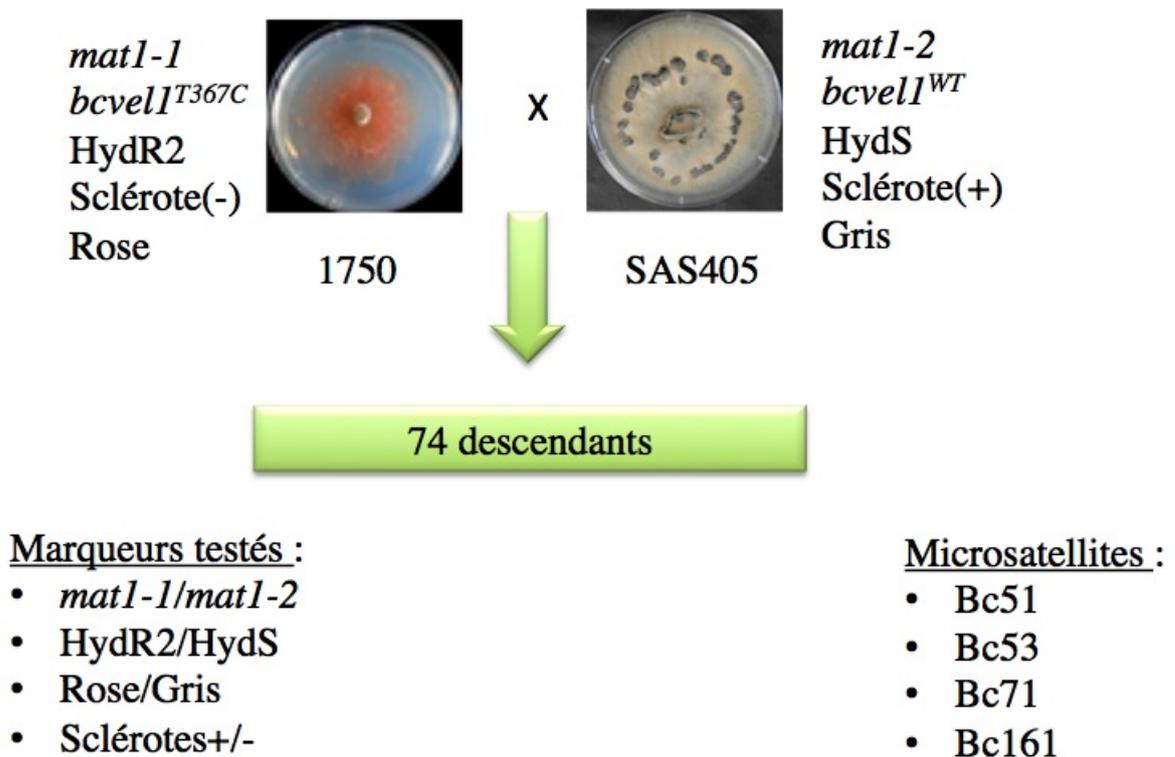


Figure 3 : Schéma de l'analyse du croisement entre les souches 1750 et SAS405. La souche 1750 porte les génotypes : *mat1-1*, *bcvel1^{T367C}* et le phénotype : *HydR2*, Sclérotés (-) et rose. La souche SAS405 porte les génotypes *mat1-2*, *bcvel1^{WT}* et le phénotype *HydS*, Sclérotés (-) et gris.

Chapitre III

1. Y-a-t-il eu recombinaison sexuelle ?

Le premier test a été de discriminer les souches roses des souches grises. Sur les 74 individus, 26 individus ont le phénotype rose alors que 48 individus sont de coloration grise (Tableau 3). Le deuxième test phénotypique celui de formation de sclérotes a révélé que sur les 74 descendants, 28 sont capables de produire des sclérotes (Tableau 3).

Le test de sensibilité au fenhexamid a pour but de distinguer les HydR2 des HydS. Les descendants du croisement ainsi que les parents ont été étudiés sur fenhexamid comme détaillé dans matériel et méthodes. Parmi les 74 individus, 49 sont résistants au fenhexamid (HydR2). Les 25 autres sont sensibles au fenhexamid (HydS) (Tableau 3). Par ailleurs, nous avons déterminé le type sexuel des descendants par PCR.

Certains individus roses et HydR2 sont capables de produire des sclérotes (Figure 4). Ces résultats confirment qu'il y a eu recombinaison. En effet, s'il n'y avait pas eu recombinaison, seulement les individus gris auraient la capacité de produire des sclérotes du fait qu'ils héritent ce caractère de la souche parentale gris, SAS405. En plus, la répartition du type sexuel, mat1-1 et mat1-2 chez les individus roses et les individus gris confirme la recombinaison sexuelle même si la répartition n'est pas de 50 : 50 (Tableau 3). 27 individus sont de type sexuel mat1-2 (rose/gris) comme la souche SAS405 et 47 descendants portent le type sexuel mat1-1 (gris/rose) (Tableau 3).

Selon les résultats obtenus, nous avons remarqué que tous les descendants roses sont résistants et tous les descendants gris sont sensibles au fenhexamid à l'exception d'un individu qui est gris et résistant au fenhexamid. L'on peut donc conclure que ces deux derniers marqueurs ont un faible taux de recombinaison suggérant un lien physique.

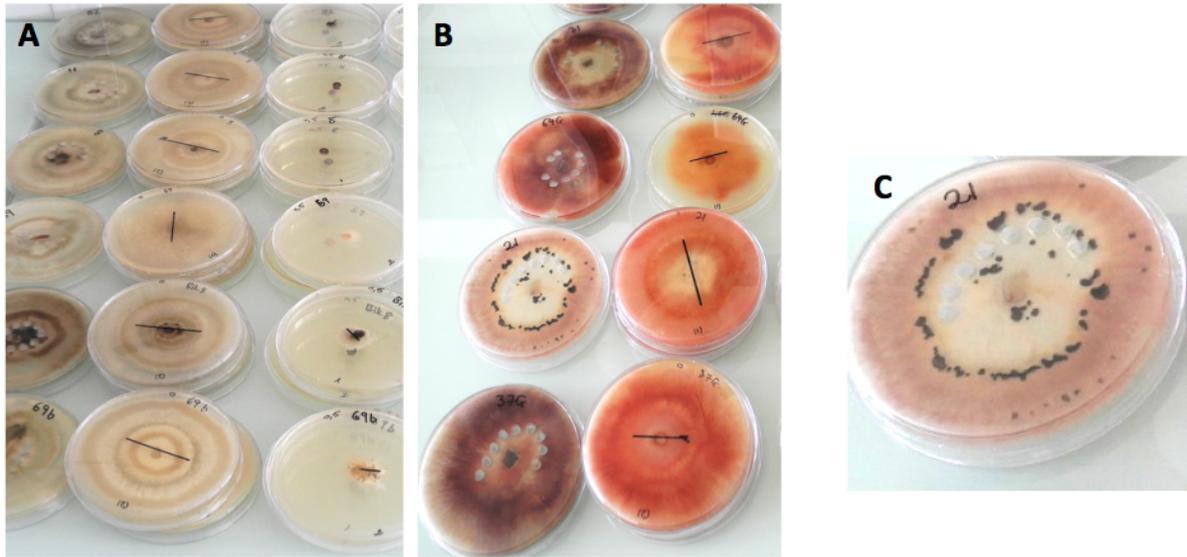


Figure 4 : Comparaison phénotypique des descendants. A) descendants gris, B) descendants roses. C) descendant rose produisant des sclérotés.

Chapitre III

Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des descendants du croisement entre SAS405 et 1750.

Souche/ Descendants	Pigmentation	Cluster <i>bik</i>	Phénotype au fenhexamid	Production de sclérotés	Type sexuel
SAS405	Gris	-	HydS	+	mat1-2
1750	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
39G	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
7G	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
44G	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
22G	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
23G	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
14G	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
1R	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
20G	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
56R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
31	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
64G	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
21	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
37G	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
36G	Rose	+	HydR2	-	mat1-2
33A	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
15G	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
77G	Rose	+	HydR2	-	mat1-2
19C	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
22R	Rose	+	HydR2	+	mat1-1
57A	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
24G	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
26G	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
63	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
74	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
56G	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
7R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
27R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
67	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
72	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
40B	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
3	Rose	+	HydR2	-	mat1-1

Chapitre III

Souche/ Descendants	Pigmentation	Cluster <i>bik</i>	Phénotype au fenhexamid	Production de sclérotés	Type sexuel
SAS405	Gris	-	HydS	+	mat1-2
1750	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
10	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
23RB	Rose	+	HydR2	-	mat1-2
19R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
15R	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
20R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
58	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
78	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
24R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
14R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
68	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
17	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
37R	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
57G	Rose	+	HydR2	+	mat1-2
77XR	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
60	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
38	Rose	+	HydR2	-	mat1-1
52	Gris	-	HydR2	-	mat1-2
71	Gris	-	HydS	+	mat1-1
46G	Gris	-	HydS	-	mat1-2
54B	Gris	-	HydS	-	mat1-2
35	Gris	-	HydS	+	mat1-2
28	Gris	-	HydS	+	mat1-2
76	Gris	-	HydS	+	mat1-1
48	Gris	-	HydS	-	mat1-2
84B	Gris	-	HydS	-	mat1-1
13	Gris	-	HydS	-	mat1-2
70	Gris	-	HydS	-	mat1-2
34	Gris	-	HydS	-	mat1-2
42	Gris	-	HydS	-	mat1-1
11	Gris	-	HydS	+	mat1-1
59	Gris	-	HydS	-	mat1-2

Souche/ Descendants	Pigmentation	Cluster <i>bik</i>	Phénotype au fenhexamid	Production de sclérotés	Type sexuel
SAS405	Gris	-	HydS	+	mat1-2
1750	Rose	+	HydR	-	mat1-1
Bik8	Gris	-	HydS	-	mat1-1
69B	Gris	-	HydS	-	mat1-1
75	Gris	-	HydS	+	mat1-2
12	Gris	-	HydS	-	mat1-2
45G	Gris	-	HydS	+	mat1-2
9A	Gris	-	HydS	+	mat1-2
46	Gris	-	HydS	-	mat1-2
73	Gris	-	HydS	+	mat1-2
80	Gris	-	HydS	-	mat1-2
Bik9	Gris	-	HydS	+	mat1-1
85	Gris	-	HydS	+	mat1-1
4	Gris	-	HydS	+	mat1-1

2. Lien entre coloration rose et présence du cluster *bik* chez les descendants.

Les réactions de PCR décrites dans matériels et méthodes permettent de discriminer le cluster *bik* complet du cluster *bik* incomplet. Deux couples d'amorces ont été utilisés, le premier couple F6/R6 est dessiné sur le gène *bcbik1* alors que le deuxième couple d'amorce F1/R14 est dessiné sur la partie dégénérée du cluster *bik* alors que chez les souches grises. Les résultats ont révélé que les individus roses donnent un amplicon avec le couple F6/R6 et présentent donc le gène *bcbik1* les individus gris donnent un amplicon avec le couple F1/R14 reflétant le cluster dégénéré. Ceci corrèle avec les résultats de pigmentation de mycélium. Par conséquence, la production de bikavérine nécessite un cluster *bik* complet (Figure 5).

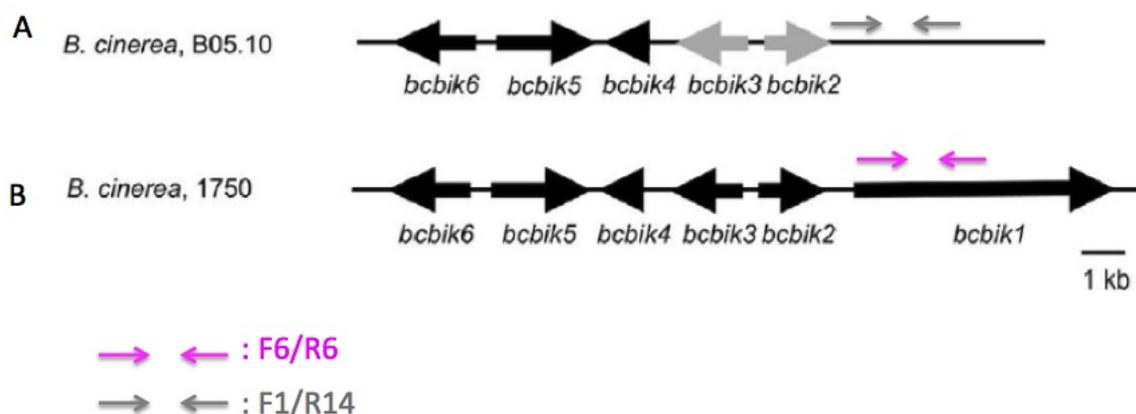


Figure 5 : A) Cluster *bik* dégénéré chez *B. cinerea* de phénotype gris. Le couple d'amorces F1/R14 indiqué en gris est dessiné sur la partie dégénéré du cluster *bik*. B) Cluster *bik* complet chez *B. cinerea* de phénotype rose. Le couple d'amorces F6/R6 indiqué en rose est dessiné sur le gène *bcbik1*.

3. Identification des marqueurs microsatellites co-ségrégant avec le phénotype HydR2.

Afin de localiser la région chromosomique qui contient l'allèle *hydr2*, nous avons utilisé les marqueurs microsatellites dessinés sur la séquence génomique (Amselem et al., 2011). Ce sont des séquences d'ADN formées par des répétitions continues de motifs composés de 2 à 5 nucléotides. 301 couples d'amorces déterminées ont été testés sur les souches parentales (Figure 6, Tableau 4), afin de déterminer les marqueurs polymorphes entre les parents. Parmi

Chapitre III

ces couples d'amorces, 83 ont donné des produits de tailles différentes entre les parents. Ces marqueurs microsatellites polymorphes vont servir à trouver ceux co-ségréant avec le phénotype HydR2 parmi les descendants (Tableau 5).

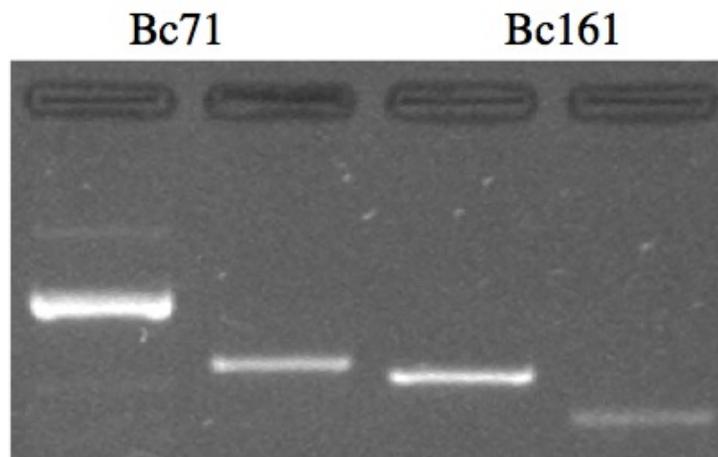


Figure 6 : Exemple de deux marqueurs microsatellites polymorphes entre les souches 1750 et SAS405. Les marqueurs testés sont Bc7 et Bc161. Après PCR, les amplicons ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 4%.

Tableau 4 : Caractéristiques des microsatellites entre les souches 1750 et SAS405

Numéro de couple d'amorces	Les microsatellites polymorphes	Numéro de couple d'amorces	Les microsatellites polymorphes	Numéro de couple d'amorces	Les microsatellites polymorphes
BC11	NP	BC70	NP	BC129	P
BC12	NP	BC71	P	BC130	NP
BC13	NP	BC72	NP	BC131	ND
BC14	NP	BC73	P	BC132	P
BC15	P	BC74	NP	BC133	ND
BC16	P	BC75	NP	BC134	NP
BC17	P	BC76	ND	BC135	NP
BC18	P	BC77	NP	BC136	P
BC19	P	BC78	NP	BC137	NP
BC20	P	BC79	P	BC138	ND
BC21	NP	BC80	ND	BC139	NP
BC22	P	BC81	P	BC140	P
BC23	NP	BC82	ND	BC141	NP
BC24	NP	BC83	NP	BC142	NP
BC25	ND	BC84	NP	BC143	P
BC26	NP	BC85	NP	BC144	NP
BC27	P	BC86	NP	BC145	P
BC28	P	BC87	NP	BC146	NP
BC29	NP	BC88	P	BC147	P
BC30	P	BC89	P	BC148	ND
BC31	NP	BC90	P	BC149	P
BC32	NP	BC91	NP	BC150	NP
BC33	ND	BC92	ND	BC151	NP
BC34	NP	BC93	NP	BC152	ND
BC35	NP	BC94	NP	BC153	NP
BC36	NP	BC95	P	BC154	NP
BC37	NP	BC96	NP	BC155	ND
BC38	NP	BC97	ND	BC156	NP
BC39	NP	BC98	P	BC157	NP
BC40	NP	BC99	ND	BC158	P
BC41	P	BC100	NP	BC159	NP
BC42	NP	BC101	ND	BC160	ND
BC43	NP	BC102	P	BC161	P
BC44	P	BC103	NP	BC162	NP
BC45	NP	BC104	NP	BC163	NP
BC46	NP	BC105	NP	BC164	NP
BC47	P	BC106	NP	BC165	NP
BC48	P	BC107	P	BC166	P
BC49	NP	BC108	NP	BC167	P
BC50	NP	BC109	ND	BC168	NP
BC51	P	BC110	NP	BC169	ND
BC52	ND	BC111	NP	BC170	P
BC53	P	BC112	NP	BC171	NP
BC54	NP	BC113	NP	BC172	P
BC55	P	BC114	NP	BC173	ND
BC56	P	BC115	NP	BC174	NP
BC57	NP	BC116	NP	BC175	NP
BC58	P	BC117	NP	BC176	NP
BC59	ND	BC118	P	BC177	P
BC60	NP	BC119	ND	BC178	NP
BC61	NP	BC120	ND	BC179	ND
BC62	P	BC121	ND	BC180	ND
BC63	NP	BC122	ND	BC181	ND
BC64	NP	BC123	NP	BC182	ND
BC65	ND	BC124	NP	BC183	ND
BC66	NP	BC125	ND	BC184	NP
BC67	P	BC126	NP	BC185	NP
BC68	ND	BC127	P	BC186	P
BC69	ND	BC128	NP	BC187	P

Chapitre III

Numéro de couple d'amorces	Les microsatellites polymorphes	Numéro de couple d'amorces	Les microsatellites polymorphes
BC188	NP	BC248	NP
BC189	NP	BC249	NP
BC190	NP	BC250	P
BC191	P	BC251	P
BC192	ND	BC252	P
BC193	ND	BC253	NP
BC194	ND	BC254	P
BC195	NP	BC255	NP
BC196	NP	BC256	NP
BC197	ND	BC257	NP
BC198	NP	BC258	ND
BC199	NP	BC259	ND
BC200	P	BC260	ND
BC201	NP	BC261	NP
BC202	NP	BC262	ND
BC203	NP	BC263	ND
BC204	NP	BC264	ND
BC205	NP	BC265	ND
BC206	NP	BC266	ND
BC207	NP	BC267	P
BC208	NP	BC268	ND
BC209	NP	BC269	NP
BC210	NP	BC270	P
BC211	NP	BC271	P
BC212	P	BC272	P
BC213	NP	BC273	P
BC214	P	BC274	P
BC215	ND	BC275	NP
BC216	P	BC276	P
BC217	P	BC277	P
BC218	P	BC278	P
BC219	NP	BC279	P
BC220	NP	BC280	NP
BC221	NP	BC281	NP
BC222	P	BC282	P
BC223	NP	BC283	NP
BC224	NP	BC284	ND
BC225	NP	BC285	NP
BC226	NP	BC286	ND
BC227	P	BC287	P
BC228	P	BC288	NP
BC229	ND	BC289	NP
BC230	ND	BC290	P
BC231	P	BC291	P
BC232	NP	BC292	NP
BC233	NP	BC293	P
BC234	ND	BC294	P
BC235	P	BC295	P
BC236	P	BC296	NP
BC237	P	BC297	NP
BC238	NP	BC298	NP
BC239	P	BC299	NP
BC240	NP	BC300	NP
BC241	ND	BC301	NP
BC242	NP		
BC243	ND		
BC244	NP		
BC245	ND		
BC246	P		
BC247	NP		

P : Polymorphes
 NP : Non polymorphes
 ND : Non déterminé

Chapitre III

Tableau 5 : Génotype des descendants (1750 X SAS405) avec les microsatellites Bc53,71, 51, 161.

Les descendants	Phénotypes	Bc53	Bc71	Bc51	Bc161	Les descendants	Phénotypes	Bc53	Bc71	Bc51	Bc161
1750	HydR2	1750	1750	1750	1750	1750	HydR2	1750	1750	1750	1750
SAS405	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
39G	HydR2	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405	37R	HydR2	1750	1750	1750	1750
7G	HydR2	1750	1750	1750	1750	57G	HydR2	1750	SAS405	ND	1750
44G	HydR2	1750	1750	SAS405	1750	77XR	HydR2	ND	1750	1750	1750
22G	HydR2	1750	SAS405	1750	1750	60	HydR2	1750	1750	1750	1750
23G	HydR2	1750	SAS405	SAS405	1750	38	HydR2	1750	1750	1750	1750
14G	HydR2	1750	SAS405	1750	1750	52	HydR2	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
1R	HydR2	1750	SAS405	1750	1750	71	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
20G	HydR2	1750	1750	1750	1750	46G	HydS	SAS405	SAS405	ND	SAS405
56R	HydR2	1750	1750	1750	1750	54B	HydS	SAS405	ND	ND	SAS405
31	HydR2	1750	1750	1750	1750	35	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
64G	HydR2	1750	SAS405	1750	ND	28	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
21	HydR2	1750	SAS405	1750	1750	76	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
37G	HydR2	1750	1750	1750	1750	48	HydS	1750	ND	ND	SAS405
36G	HydR2	1750	1750	1750	1750	84B	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
33A	HydR2	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405	13	HydS	SAS405	ND	ND	SAS405
15G	HydR2	1750	SAS405	ND	ND	70	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
77G	HydR2	1750	1750	1750	1750	70	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
22R	HydR2	1750	SAS405	1750	1750	34	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
57A	HydR2	1750	SAS405	1750	ND	42	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
24G	HydR2	1750	1750	1750	1750	11	HydS	ND	SAS405	SAS405	SAS405
26G	HydR2	1750	1750	1750	ND	59	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
63	HydR2	1750	1750	1750	1750	Bik8	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
74	HydR2	1750	1750	1750	1750	69B	HydS	SAS405	SAS405	1750	SAS405
56G	HydR2	1750	1750	1750	1750	75	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
7R	HydR2	1750	1750	1750	ND	12	HydS	SAS405	SAS405	ND	SAS405
27R	HydR2	1750	1750	1750	1750	45G	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
67	HydR2	1750	1750	1750	1750	9A	HydS	SAS405	SAS405	1750	SAS405
72	HydR2	1750	1750	1750	1750	46	HydS	SAS405	SAS405	ND	SAS405
40B	HydR2	1750	1750	1750	1750	73	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
3	HydR2	1750	1750	1750	1750	80	HydS	SAS405	SAS405	ND	SAS405
10	HydR2	1750	1750	1750	1750	Bik9	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
23RB	HydR2	SAS405	SAS405	1750	ND	85	HydS	SAS405	SAS405	SAS405	SAS405
19R	HydR2	SAS405	1750	1750	ND	4	HydS	SAS405	SAS405	1750	SAS405
15R	HydR2	1750	SAS405	1750	ND						
20R	HydR2	1750	1750	1750	1750						
58	HydR2	1750	1750	1750	1750						
78	HydR2	1750	1750	1750	1750						
24R	HydR2	1750	1750	1750	ND						
14R	HydR2	1750	SAS405	1750	1750						
17	HydR2	1750	1750	1750	1750						

ND : Non déterminé

Chapitre II

L'analyse de ces quatre microsatellites testés sur la totalité des individus a révélé que les génotypes parentaux ne sont pas répartis de façons équilibrées (50 : 50) entre les descendants (Tableau 5). La plupart des individus résistants (HydR2) portent le génotype du parent 1750 pour les quatre marqueurs. A titre d'exemple, pour le marqueur Bc51, sur l'ensemble des individus HydR2, 91% ont hérité le génotype de la souche parentale 1750 alors que seulement 9% sont porteurs du génotype SAS405. Chez les individus HydS, 86% des individus sont du génotype SAS405 et 14% sont identiques à la souche parentale 1750 (Tableau 6).

Les quatre marqueurs utilisés (Bc51, Bc53, Bc71 et Bc161) sont localisés respectivement sur différents supercontigs (9,1, 2 et 4) du génome de la souche *B. cinerea* T4. Ils n'ont donc à priori aucun lien physique.

Tableau 6 : Pourcentage des descendants recombinants et parentaux.

Phénotype Génotype	HydR2		HydS	
	SAS405	1750	SAS405	1750
Bc51	9%	91%	86%	14%
Bc53	7%	93%	96%	4%
Bc71	45%	55%	100%	0%
Bc161	0%	100%	100%	0%

Chez les descendants, la distribution des quatre microsatellites choisis aléatoirement montre que le nombre des individus recombinants est très faible. Nous avons remarqué que seul le marqueur Bc71 est réparti d'une façon équilibrée chez les descendants HydR2 alors que chez les descendants HydS cette répartition est absente. Le fort niveau de distorsion et la ségrégation non mendélienne des microsatellites ne permettent pas de clonage positionnel ainsi que le faible nombre des descendants obtenus ne permet en aucun cas des analyses statistiques. C'est pour cela, nous avons arrêté le génotype par des microsatellites.

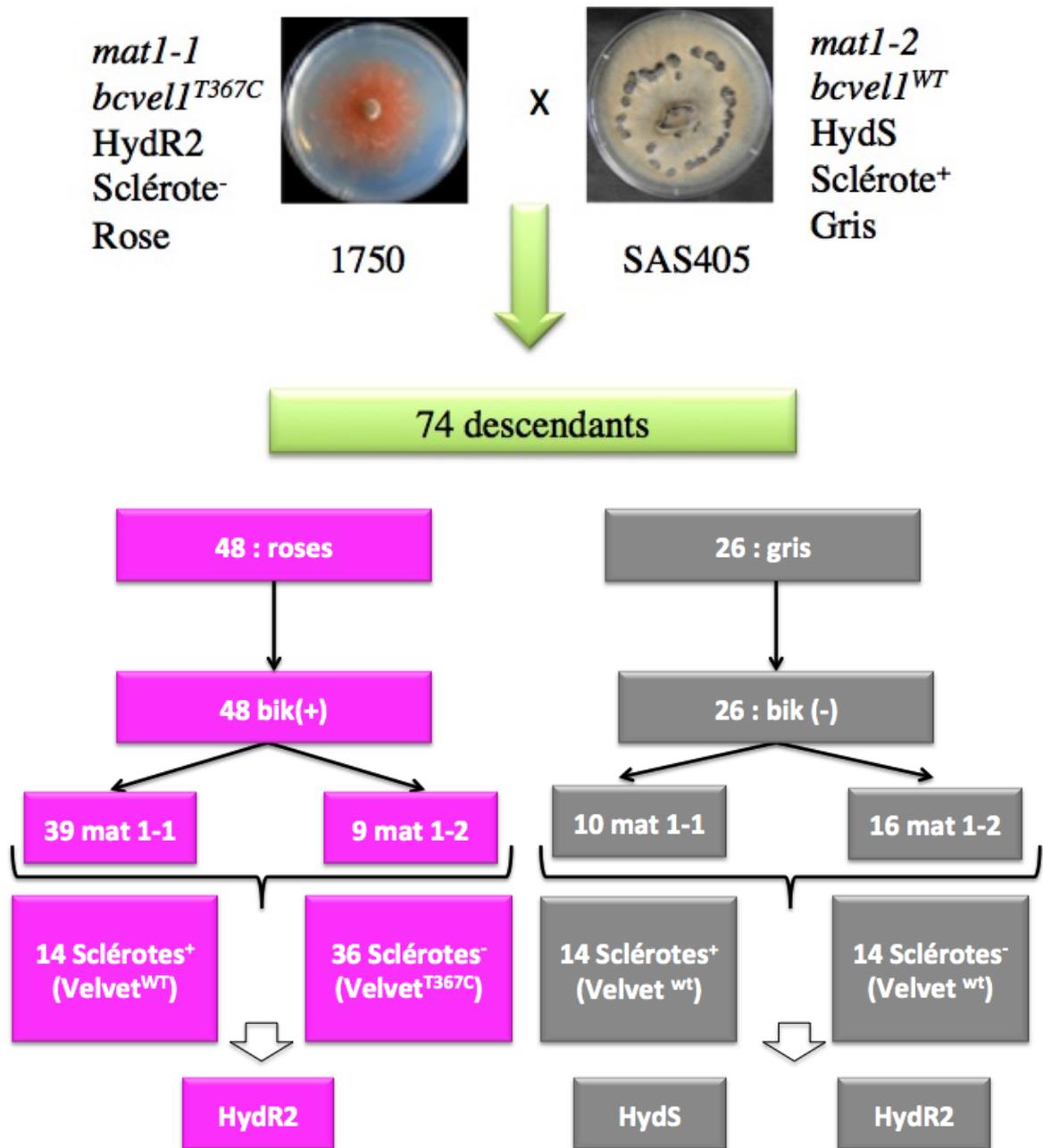


Figure 7 : Bilan d'analyse des descendants issu du croisement les souches 1750 et SAS405

Chapitre III

II. Discussion :

1. Le phénotype HydR2 co-ségrége avec la coloration rose.

L'analyse des deux caractères, type sexuel et production de sclérotas a montré que 46% des descendants sont identiques à la souche parentale 1750, 18% comme le parent SAS405 et 36% sont des individus recombinants répartis de la façon suivante 18% sont de type sexuel mat1-2 et sclérotas⁻ et 18% sont mat1-1 et sclérotas⁺. Par ailleurs, le caractère/phénotype de production des sclérotas ségrége de façon équilibrée (50 : 50) parmi les descendants gris et dans un ratio 30 : 70 parmi les descendants roses (Tableau 7). Ceci montre qu'il y a eu recombinaison lors du croisement.

Tableau 7 : Répartition des caractères production de sclérotas, en fonction du type sexuel et de la pigmentation. En vert les individus portant génotype et phénotype parentaux et en rouge les individus recombinants.

		Sclérotas ⁻	Sclérotas ⁺
100%	mat1-1	46%	18%
	Mat1-2	18%	18%
100%	Rose	45%	18%
	Gris	17%	20%

En revanche, l'analyse des deux autres caractères, pigmentation du mycélium et sensibilité au fenhexamid, a révélé que 65% des individus sont comme le parent 1750, 34% sont identiques à la souche parentale SAS405. Seul un individu (1%) est recombinant, HydR2 et gris; aucun individu rose et n'est sensible (Tableau 8).

Tableau 8 : Répartition des deux caractères pigmentation de mycélium et sensibilité au fenhexamid. En vert, les individus parentaux et en rouge les individus recombinant.

	HydR2	HydS
Rose	65%	0%
Gris	1%	34%

Un seul individu (n°= 52) est gris et résistant (voir Tableau 5). Les quatre marqueurs sont identiques à la souche parentale SAS405 alors qu'il a hérité l'allèle velvet^{C367T} de la souche 1750 (phénotype sclérotas⁻). Nous pouvons donc conclure que le lien phénotypique entre le phénotype HydR2 et le cluster *bik* est plus fort que celui entre les autres marqueurs

Chapitre III

phénotypique testés. Le gène ou l'allèle *hydR2* est probablement localisé à proximité du cluster *bik* sans que ce dernier ne soit nécessaire au phénotype HydR2.

2. Est-ce que le croisement 1750 X SAS405 est particulier ?

La répartition des quatre microsatellites choisis au hasard, selon la sensibilité des individus au fenhexamid révèle un fort déséquilibre dans la distribution de ces marqueurs ; c'est-à-dire la plupart des descendants sont identiques à l'un des parents. Quelques individus sont des recombinants et ceci n'est valable que pour les marqueurs Bc53, Bc51 et Bc71 chez les HydR2. Ce résultat met en question le croisement entre les deux souches 1750 et SAS405. Y a-t-il eu vraiment recombinaison sexuelle lors de ce croisement ?

Le mauvais degré de recombinaison peut être dû à la faible fertilité du croisement au vu du faible nombre des descendants. De plus, nous n'avons obtenu qu'une seule apothécie mature avec peu d'asques après plusieurs essais de croisement entre différentes souches HydR2 et HydS. Par ailleurs, l'isolement des ascospores étalées « en vrac » a pu induire un biais dans la sélection des descendants en éliminant les individus à faible croissance. L'isolement ordonné des ascospores, asque par asque, aurait probablement permis d'obtenir 50% d'individus gris contre 33% à l'état actuel. Il aurait pu donner lieu à 50% d'individus roses produisant des sclérotés contre 29% actuellement, alors que la ségrégation de ce phénotype est de 50 : 50 dans la descendance grise. Compte tenu de ces limitations nous pouvons conclure que la recombinaison sexuelle a eu lieu, mais de façon incomplète pour des raisons inconnues et, par conséquent, nous ne pouvons pas utiliser l'approche de clonage positionnel pour localiser le gène ou l'allèle responsable du phénotype HydR2.

3. Le complexe protéique velvet régule le phénotype HydR2

Le complexe velvet est un régulateur global de plusieurs processus cellulaires tels que la production de sclérotés, la virulence et le développement asexué ou la synthèse de métabolites secondaires. Il est composé de plusieurs protéines comme *bcvel1*.

L'inactivation du gène *bcvel1* chez la souche 1750 provoque la perte de la résistance au fenhexamid et la production de la bikavérine (Schumacher et al., 2013). Ceci suggère que le complexe velvet régule positivement l'expression du gène *hydR2* et la production de la bikavérine (Figure 6).

La comparaison des séquences protéiques chez les souches B05.10, T4 et 1750 a montré que la protéine BcVel1 est tronquée chez les deux souches T4 et 1750 (Schumacher et al., 2012 ; 2013). La taille respective des trois protéines BcVE1^{B05.10}, BcVel1^{T4} et BcVel¹⁷⁵⁰ est de 575 aa, 184 aa et 100 aa. Chez la souche T4 la synthèse de la protéine tronquée est due à la présence d'un codon stop dans domaine velvet, alors que chez la souche 1750 la présence d'un SNP dans le gène *bcvel1*¹⁷⁵⁰ engendre un codon stop provoquant la synthèse d'une protéine tronquée encore plus courte.

Ceci montre que la première partie de la protéine BcVel1¹⁷⁵⁰ est suffisante pour contrôler la régulation du cluster *bik*, alors que la partie manquante est nécessaire pour la production des sclérotés (Figure 8). D'ailleurs les 100 premiers résidus du domaine velvet de BcVel1 sont suffisants et nécessaire pour réguler le gène *hydR2*. Schumacher et al, 2012 ont montré que la forme tronquée de BcVel1^{T4} était cytoplasmique et non nucléaire. La régulation d'*hydR2* ne s'opère donc probablement pas au niveau transcriptionnel.

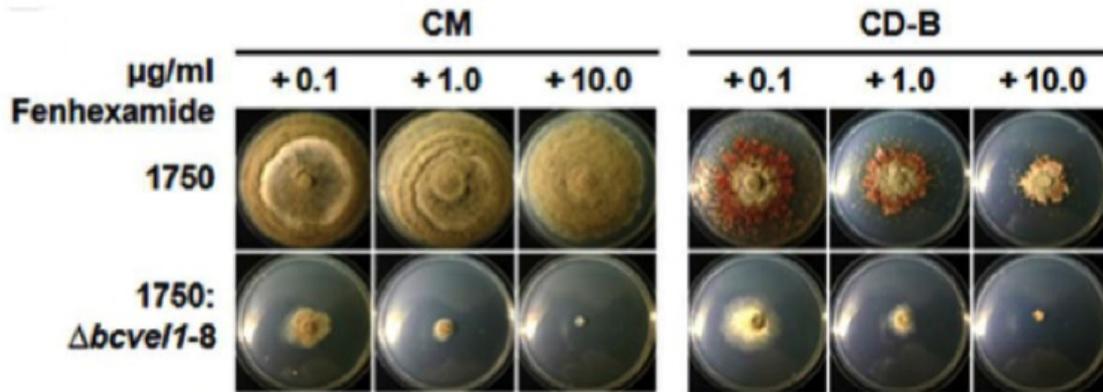


Figure 8 : Comparaison phénotypique de la souche 1750 et du mutant 1750: *Δbcv1-8* cultivées sur différents milieux (Milieu complet, CM. Milieu induisant la synthèse de la bikavérine, CD-B) en présence de différentes concentrations de fenhexamid.

4. Qu'est-ce qui est *hydr2* et comment l'identifier ?

Comme il a été suggéré que le mécanisme de *HydR2* implique un cytochrome P450, nous recherchons donc plutôt un cytochrome P450 actif spécifique chez *HydR2*.

Par ailleurs, le gène *bcv11* régule positivement le gène *hydr2* ainsi que le cluster *bik*. Nous proposons alors : 1/ L'unique descendant gris et *HydR2* est en faveur d'un lien génétique proche mais pas absolue entre le gène *hydr2* et le cluster *bik*. Le gène *cyp* candidat pourrait être recherché dans le voisinage du cluster *bik*. Pour cela, nous avons utilisé la base de données génomique au Broad Institut (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis-cinerea>). Un gène B0510_4976 a été identifié codant un cytochrome à P450.

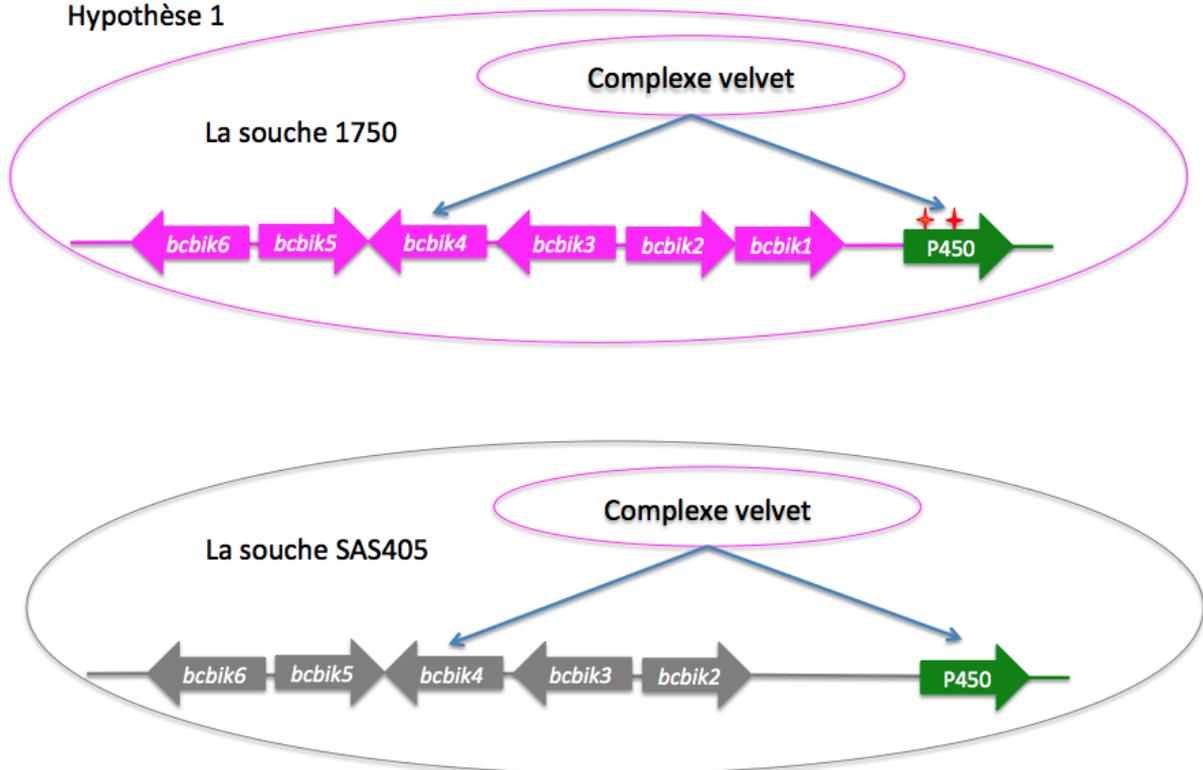
2/ La deuxième hypothèse suggère la présence d'un facteur de transcription contrôlant l'expression d'un cytochrome P450 responsable du phénotype *HydR2*. Ce facteur de transcription serait localisé à proximité du cluster *bik*. 3/ Le gène *cyp* et/ou le facteur de transcription régulant l'expression du gène candidat sont spécifiques des souches *HydR2* localisé à proximité du cluster *bik* (figure 9).

Afin de tester ces hypothèses, et d'identifier le gène candidat *hydr2* nous proposons les approches suivantes :

Chapitre III

- Comparer l'expression et la séquence du gène candidat B0510_4976 chez les souches HydR2 et HydS, puis réaliser une analyse fonctionnelle du gène B0510_4976 s'il y a des différences de séquences nucléiques entre les souches HydS et les souches HydR2, permettra de tester son implication dans le phénotype HydR2.
- Pour rechercher des gènes P450 et/ou le facteur de transcription sous contrôle de *bcvell*, nous pourrions réaliser une étude transcriptomique comparative des deux souches 1750 et 1750 : Δ *bcvell*.
- Dans le cas où le gène à P450 ou le facteur de transcription était spécifique des souches HydR2, nous devrions réaliser un séquençage de *novo* de la souche 1750 plus un assemblage du génome.

Hypothèse 1



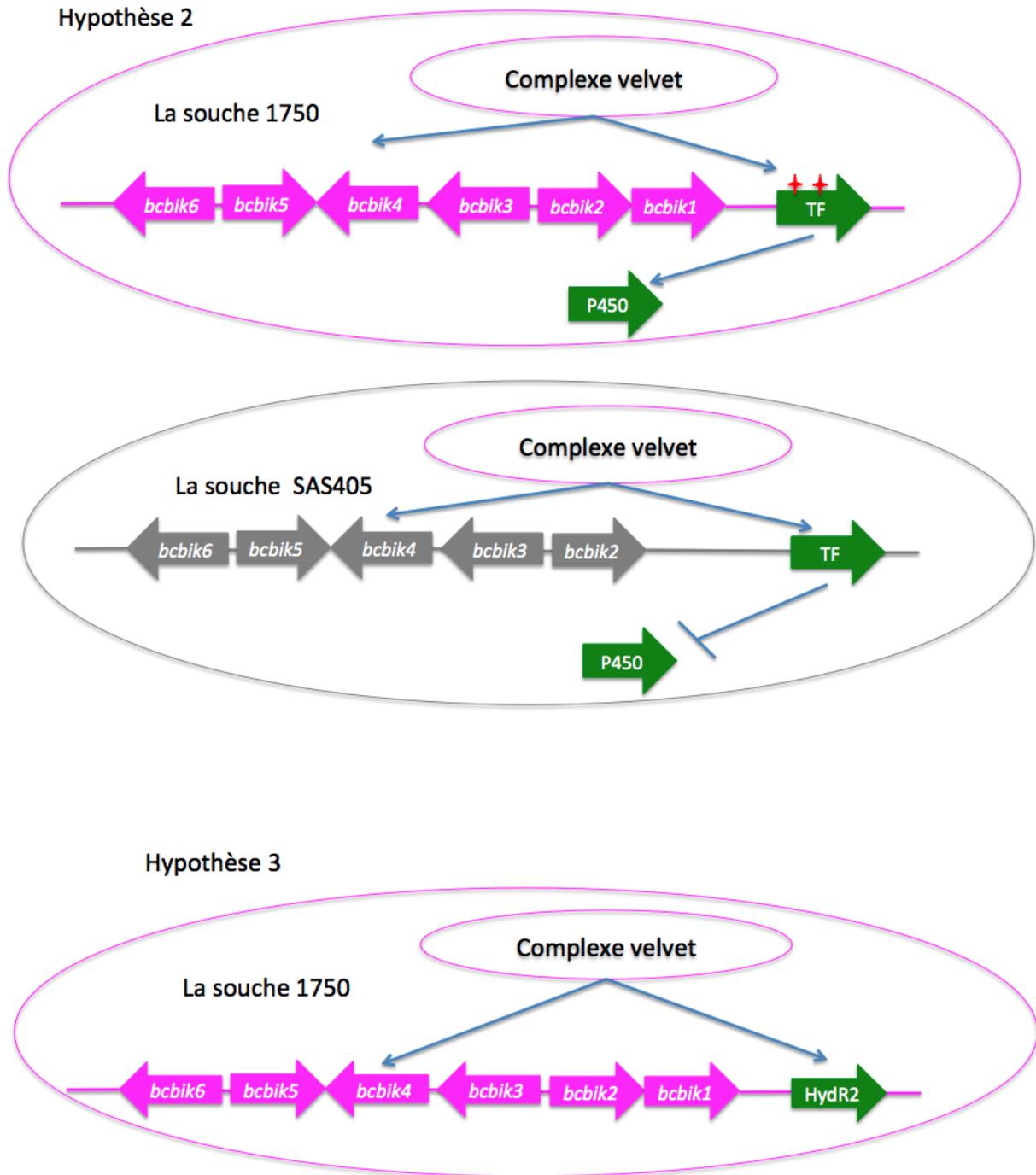


Figure 9 : schéma explicatif des trois hypothèses expliquant le phénotype HydR2. La 1^{ère} hypothèse se base sur le fait que le gène responsable de phénotype HydR2 est le gène *B05.10_4976* codant une monoxygénase cytochrome P450, celui-ci est localisé à proximité du cluster *bik* et il est sous le contrôle du complexe Velvet. La 2^{ème} hypothèse favorise la présence d'un facteur de transcription à proximité d'un cluster *bik*, ce facteur contrôlerait un gène codant une monoxygénase cytochrome P450 responsable du phénotype. La 3^{ème} hypothèse suggère que le gène responsable du phénotype HydR2 et/ou le facteur de transcription est spécifique des souches HydR2. Les étoiles représentent les différences entre le P450 et le facteur de transcription de *B. cinerea* et *B. pseudocinerea*. La flèche verte représente soit le gène p450 ou le facteur de transcription (FT).

5. Considération pratiques, 'la rareté des souches HydR2 :

Les souches HydR2 sont très rares dans les populations de la pourriture grise. Elles se caractérisent par une résistance modérée au fenhexamid. Par conséquent, elles ne sont pas ou peu sélectionnées par le fongicide ce qui expliquerait la rareté des souches HydR2 dans les populations de la pourriture grise. Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, la recombinaison sexuelle semble limitée entre les souches HydR2 et les souches HydS. Sur plusieurs croisements tentés, une seule apothécie mature et fertile a été obtenue. Ceci suggère «un frein» potentiel à la recombinaison sexuelle entre les souches HydR2 et HydS. Comment expliquer ce frein potentiel?

Le mauvais degré de recombinaison pourrait correspondre à une faible compatibilité entre les deux souches parentales. L'on peut éventuellement suspecter que les souches HydR2 sont en cours de spéciation et qu'une barrière inter-espèce s'installe en empêchant la recombinaison sexuelle.

La rareté des souches HydR2 peut également être liée à une niche écologiques spéciale, c'est-à-dire, elles auraient besoin des plantes hôtes spécifiques (la plupart des souches ont été collectées sur concombre) ou/et des saisons spéciales...

Pour vérifier cela, il conviendrait de développer un test qPCR allèle spécifique, basé sur les différences des séquences géniques caractéristiques des souches HydR2. Ceci permettrait de détecter et de quantifier les souches HydR2 dans les populations de la pourriture grise selon les années, les plantes hôtes et les saisons afin de comprendre leur épidémiologique.

,

Discussion générale

Discussion générale

Au début de cette thèse, nous nous interrogeons sur les mécanismes de résistance au fenhexamid des phénotypes résistants détectés à faible, voire très faible fréquence dans le complexe d'espèces *B. cinerea*/*B. pseudocinerea*. Le travail décrit dans les chapitres précédents montre que

- la résistance naturelle de l'espèce de *B. pseudocinerea* est liée au gène *cyp684* codant une monooxygénase à cytochrome P450.
- la résistance acquise de *B. cinerea* conférant le phénotype HydR2 est liée à un gène proche du cluster *bik*, responsable de la biosynthèse de la bikavérine.

Un mécanisme rare responsable de la résistance au fenhexamid chez l'espèce *B. pseudocinerea*.

Contrairement à la plupart des isolats HydR chez l'espèce *B. cinerea*, la résistance au fenhexamid chez *B. pseudocinerea* n'est pas liée au gène *erg27* codant la cible du fongicide, mais elle est portée par le gène *cyp684* présent également chez *B. cinerea*.

La comparaison des séquences nucléotidiques du gène *cyp684* chez *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* ainsi que l'expression génique entre les deux espèces a montré

- des niveaux d'induction élevés par le fenhexamid chez l'espèce *B. pseudocinerea* par rapport à l'espèce *B. cinerea* ;
- la présence d'une délétion de 25 pb dans la région promotrice, une insertion de 24 pb dans la région UTR3' et cinq acides aminés différents dans la séquence protéiques chez *B. pseudocinerea*.

L'étude et la comparaison des homologues de *cyp684* chez d'autres espèces du genre *Botrytis*, ainsi que leurs niveaux de résistance au fenhexamid ont montré que la délétion et l'insertion ne contribuent pas à la résistance au fenhexamid. Uniquement les acides aminés polymorphes communs à toutes les espèces pourraient expliquer la résistance au fenhexamid. Ce polymorphisme pourrait provoquer un changement de la configuration de la protéine Cyp684

Discussion générale

chez *B. pseudocinerea* et, par conséquent, le fenhexamid aurait plus d'affinité vis-à-vis de cette protéine à cytochrome P450.

Nos constructions de gènes *cyp684* chimériques (voir chapitre I) permettront de valider cette hypothèse mais aussi d'évaluer à quel point l'induction de l'expression de *cyp684* observée chez les deux souches de *B. pseudocinerea* est impliquée dans la résistance et quel élément (polymorphismes des 5' et/ou 3' UTR ou autre) est responsable de cette surexpression. Autrement dit, la résistance naturelle au fenhexamid chez *B. pseudocinerea* nécessite-elle la surexpression de *cyp684* et/ou le polymorphisme des cinq acides aminés ?

La fonction enzymatique de Cyp684

Les résultats de Bayer CropScience suggèrent une métabolisation du fenhexamid par les souches de *B. pseudocinerea* testées (Suty *et al*, 1999). L'étude de la métabolisation du fenhexamid par *B. cinerea* et *B. pseudocinerea* réalisée au laboratoire a révélé, dans la phase organique du filtrat de culture extrait par le dichlorométhane (même procédé que Suty *et al*, 1999), la présence de quatre métabolites dérivés du fenhexamid avec des abondances différentes entre les deux espèces. Les identifications réalisées par GC-MS et LC-MS ont montré qu'il s'agit d'isomères du fenhexamid hydroxylés sur le groupement cyclohexane (Debieu *et al*, non publié). Par contre, ce type d'étude réalisée avec les mutants 900 Δ *cyp684* a révélé la présence de ces mêmes isomères. Nous pouvons donc conclure que ces quatre métabolites ne résultent pas de la réaction enzymatique de Cyp684 et n'expliquent pas la résistance. Pour expliquer ce résultat, nous proposons deux hypothèses :

1. Ces quatre métabolites seraient générés par une autre protéine à cytochrome P450 que Cyp684. La protéine Cyp684, génèrerait des métabolites plus polaires non miscibles à la phase organique de l'extrait du filtrat de culture. Les études de

Discussion générale

métabolisation du fenhexamid au niveau de la phase aqueuse de l'extrait du filtrat de culture et du mycélium sont en cours.

2. La protéine Cyp684 ne métabolise pas le fenhexamid mais il le piège et le rend inaccessible à l'enzyme Erg27.

Chez les plantes et les mammifères, le métabolisme du fenhexamid conduit à l'hydroxylation du fenhexamid sur le groupement cyclohexane et/ou à une glycosylation sur le groupement aromatique, ou une réaction de conjugaison par une GST (Anderson et al., 1999). Le fenhexamid glycosylé ou estérifié serait stocké dans la vacuole et ensuite expulsé à l'extérieur de la cellule.

En ce qui concerne la métabolisation du fenhexamid chez *B. pseudocinerea*, nous avons construit une souche de *S. cerevisiae* exprimant *Bpcyp684*, un outil simplifié pour détecter et caractériser les métabolites du fenhexamid issus de la réaction enzymatique de Cyp684. Cette même souche permettra également de tester si BpCyp684 active l'édifenphos en le métabolisant par clivage d'une des deux liaisons phosphore-soufre (Uesugi, 2001), car *B. pseudocinerea* montre une résistance croisée négative entre le fenhexamid et l'édifenphos (Leroux et al, 2002), résistance croisée négative perdue dans les mutants $900\Delta cyp684$ (Billard, 2011).

La recherche d'homologue de Cyp684 chez *M. oryzae*, naturellement sensible à l'édifenphos et résistant au fenhexamid, a révélé la présence d'une monooxygénase à cytochrome P450 avec une identité de 53%. L'étude génétique et biochimique de celle-ci serait intéressante afin de déterminer si elle est impliquée dans l'activation de l'édifenphos et si elle confère la résistance au fenhexamid.

Ces résultats suggèrent que l'enzyme Cyp684 a probablement un double rôle, l'inactivation du fenhexamid et l'activation de l'édifenphos dont la réaction enzymatique reste à préciser.

Discussion générale

Ceci permettra d'étudier non seulement les fonctions enzymatiques de la métabolisation du fenhexamid et de l'édifenphos par ces deux protéines homologues, mais ultérieurement aussi d'analyser leur distribution au sein du règne fongique.

La résistance au fenhexamid chez d'autres espèces fongiques implique-t-elle Erg27 ou Cyp684?

Le fenhexamid a un spectre d'action restreint (*Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*). Debieu et al (2013) ont montré une forte résistance au fenhexamid chez l'espèce *N. haematococca* phylogénétiquement éloigné du genre *Botrytis* et *Sclerotinia*. Les études biochimiques chez *N. haematococca* ont révélé que l'enzyme Erg27 (3-cétoréductase) à une activité similaire à celle de l'espèce sensible *B. cinerea*, mais se distingue par une très faible inhibition de son activité par le fenhexamid. Ces résultats suggèrent que la résistance au fenhexamid observée chez *N. haematococca* est due à la faible affinité entre le fenhexamid et son enzyme.

D'ailleurs, l'analyse phylogénétique des protéines Erg27 chez les espèces *B. cinerea*, *B. pseudocinerea*, *Nectria haematococca*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia borealis*, *Magnaporthe oryzae* et *Blumeria graminis* suggère que l'ancêtre commun du genre *Sclerotinia* et *Botrytis* a connu une évolution indépendante du gène *erg27* par rapport aux autres genres fongiques, ce qui pourrait expliquer leur sensibilité au fenhexamid (Figure 1).

Discussion générale

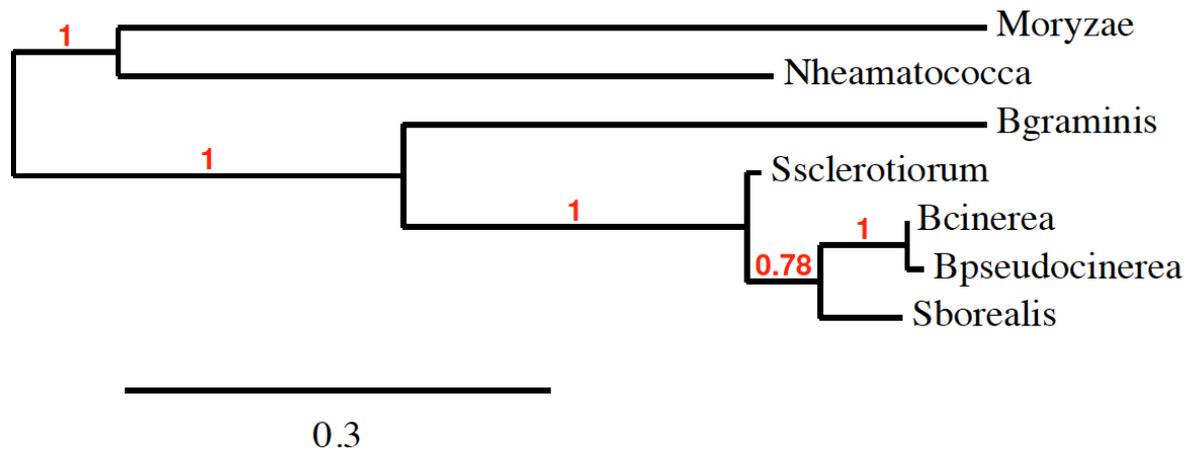


Figure 1 : Analyse phylogénétique des protéines Erg27 de *B. cinerea*, *B. pseudocinerea*, *Nectria haematococca*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia borealis*, *Magnaporthe oryzae* et *Blumeria graminis*. L'alignement a été réalisé avec l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004) et l'arbre a été généré par PHYLIP (Felsenstein, 1989).

Comme pour *N. haematococca*, les analyses enzymatiques sur la 3-cétoréductase de *B. pseudocinerea* indiquent une affinité réduite du fenhexamid pour cette enzyme (Debieu *et al.*, 2013). Ce résultat est contradictoire avec nos analyses génétiques décrites dans le chapitre I de cette thèse, démontrant que le polymorphisme du gène *erg27* n'est pas impliqué dans la résistance.

Seules certaines espèces du genre *Botrytis* (*B. pseudocinerea*, *B. calthae*) sont résistantes au fenhexamid probablement grâce au polymorphisme du gène *cyp684*. Ce gène est par ailleurs absent chez *S. sclerotiorum* sensible au fenhexamid.

Il est donc difficile de déterminer quelle protéine confère la résistance au fenhexamid dans les différentes espèces fongiques, Erg27 ou Cyp684, sans travailler sur les protéines isolées. L'une des solutions pourrait être l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* en tant que système d'expression hétérologue. La complémentation d'un mutant de levure *erg27* avec l'orthologue fongique à étudier permettra de préciser les niveaux d'inhibition de ces enzymes par le fenhexamid et d'en déduire les affinités respectives (Layer *et al.*, 2013), en

Discussion générale

s'affranchissant de toute métabolisation possible. En fonction des résultats obtenus, l'étude des protéines Cyp684 s'imposera ou non.

Les champignons dégradent les xénobiotiques.

Les champignons sont connus par leurs capacités de bioremédiation et de dégradation de polluants. *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*, agent de la pourriture du bois, sont capables de dégrader des polluants organiques tels les chloro-organiques, les hydrocarbures aromatiques cycliques et les dérivés de benzènes impliquant des monooxygénases à P450 (Doddapaneni et Yadav, 2004 ; Paszczynski et Crawford, 2000). En revanche, l'implication des P450 dans la résistance aux fongicides est peu ou pas connue. Actuellement, la résistance naturelle au fenhexamid chez *B. pseudocinerea* et la résistance acquise à l'edifenphos chez *M. oryzae* impliquant un P450 restent des cas uniques, alors que chez les insectes et les adventices, le mécanisme de résistance majeur aux pesticides implique leur dégradation par des monooxygénases à cytochrome P450 (Haubruge & Amichot, 1998). Cette différence entre les P450 des champignons et celles des insectes et des plantes vis-à-vis des pesticides, réside-t-elle dans la composition chimique des fongicides ? Ou alors, les P450 des plantes et des insectes se caractérisent-ils par une forte activité catalytique conférant des niveaux de résistance suffisants pour être sélectionnés ? On peut aussi se poser la question des rôles biologiques de ces P450 peut-être que leurs activités « normales » sont requises pour la survie (ou la fitness optimale) du champignon phytopathogène, alors que ce ne serait pas le cas chez les insectes ou adventices.

HydR2 une autre résistance au fenhexamid.

En ce qui concerne le phénotype HydR2 de l'espèce *B. cinerea*, nous n'avons pas déterminé le gène responsable de ce phénotype, mais plutôt un lien physique entre le gène/l'allèle *hydR2*

Discussion générale

et le cluster *bik*, responsable de la biosynthèse du métabolite secondaire bikavérine. Alors que ni *erg27* ni *cyp684* ne sont impliqués dans cette résistance (A. Billard, comm. pers.) des études montrant une synergie entre le fenhexamid et les IDM suggéraient l'implication d'une monooxygénase à cytochrome P450 (Leroux et al, 2002). Selon nos analyses génétiques nous proposons donc que le gène responsable de la résistance, localisé à proximité du cluster *bik*, code un cytochrome P450 ou un facteur de transcription nécessaire à son expression.

Lors de notre génotypage, nous avons observé l'absence de ségrégation mendélienne parmi les descendants issus du croisement entre la souche Hydr2 (1750) et la souche HydS (SAS405) rendant ainsi impossible le clonage positionnel du gène/allèle *hydr2*. Ce faible taux de recombinaison en plus du faible taux de fructification (une seule apothécie mature sur plusieurs tentatives de croisement), peut suggérer un frein à la reproduction sexuelle entre les deux souches, éventuellement dû à l'installation d'un isolement reproducteur. Si ceci s'avérait être vrai, cela suggérerait une espèce en cours de spéciation.

Uniquement les genres *Fusarium* et *Botrytis* possèdent un cluster *bik*). Les études phylogénétiques réalisées par Campbell et al (2012 ; 2013) ainsi que la distribution du cluster *bik* chez les autres espèces *Botrytis* du clade I et du clade II suggère que l'ancêtre commun des clades I et II a acquis le cluster *bik* par transfert horizontal à partir d'une espèce de *Fusarium*. La plupart des espèces du genre *Botrytis* ont perdu le gène *bcik1* à part quelques souches de *B. cinerea* résistantes au fenhexamid (Schumacher et al, 2012). Cela nous conduit à proposer que le gène/l'allèle *hydr2* aurait été transféré avec le cluster *bik*. Afin de vérifier cette hypothèse, nous envisageons de séquencer la région génomique large contenant le cluster *bik* chez les souches Hydr2 et les souches HydS.

Discussion générale

Impact des deux phénotypes Hydr1 et Hydr2 sur l'efficacité du fenhexamid.

Suite à plus de 10 ans de traitement au fenhexamid, on pourrait s'attendre à une sélection des deux phénotypes Hydr1 (*B. pseudocinerea*) et Hydr2 (*B. cinerea*) par le fenhexamid dans les populations de pourriture grise. Or, cela ne semble pas être le cas (Walker et al, 2011; Walker et al, 2013).

Nous avons évoqué dans les chapitres I et II que *B. pseudocinerea* semble habiter une niche écologique particulière (une préférence vis-à-vis d'autres plantes ou d'autres organes ou une préférence géographique liée au climat) (Walker et al, 2013).

Afin d'identifier la niche écologique et de comprendre l'épidémiologie, l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de pourriture grise est envisageable par notre outil moléculaire BpASP. Cet outil permettra de détecter et de quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* dans les populations de *Botrytis*, selon la saison, la région géographique et les plantes hôtes.

En ce qui concerne le phénotype Hydr2, une démarche moléculaire similaire pourrait être envisagée une fois le gène/l'allèle *hydr2* responsable de la résistance au fenhexamid identifié.

L'outil moléculaire nous permettra de préciser la fréquence du phénotype Hydr2 dans les différentes populations de *Botrytis* et d'évaluer si les souches Hydr2 ont une préférence écologique différente (à l'heure actuelle, elles ont été détectées uniquement sur concombre). Si nous arrivons à isoler assez de souches Hydr2, des études complémentaires pourront être conduites pour vérifier si elles sont en cours de spéciation.

Finalement, ces analyses nous diront si *B. pseudocinerea* (Hydr1) et *B. cinerea* Hydr2 représentent un 'danger' épidémique pour certaines cultures et certaines récoltes ; puis enfin, si le fenhexamid a un impact sur leur sélection.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alberoni, G., M. Collina, C. Lanen, P. Leroux & A. Brunelli, (2010) Field strains of *Stemphylium vesicarium* with a resistance to dicarboximide fungicides correlated with changes in a two-component histidine kinase. *Eur J Plant Pathol* **128**: 171-184.
- Albertini, C. & P. Leroux, (2004) A *Botrytis cinerea* Putative 3-keto Reductase Gene (ERG27) that is Homologous to the Mammalian 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 7 gene (17 β -HSD7). *Eur J Plant Pathol* **110**: 723-733.
- Alonso, M. A. & J. Millán, (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *Journal of Cell Science* **114**: 3957-3965.
- Amselem, J., C. A. Cuomo, J. A. L. van Kan, M. Viaud, E. P. Benito, A. Couloux, P. M. Coutinho, R. P. de Vries, P. S. Dyer, S. Fillinger, E. Fournier, L. Gout, M. Hahn, L. Kohn, N. Lapalu, K. M. Plummer, J.-M. Pradier, E. Quévillon, A. Sharon, A. Simon, A. ten Have, B. Tudzynski, P. Tudzynski, P. Wincker, M. Andrew, V. r. Anthouard, R. E. Beever, R. Beffa, I. Benoit, O. Bouzid, B. Brault, Z. Chen, M. Choquer, J. r. Collémare, P. Cotton, E. G. Danchin, C. Da Silva, A. I. Gautier, C. Giraud, T. Giraud, C. Gonzalez, S. Grossetete, U. Güldener, B. Henrissat, B. J. Howlett, C. Kodira, M. Kretschmer, A. Lappartient, M. Leroch, C. Levis, E. Mauceli, C. c. Neuvéglise, B. Oeser, M. Pearson, J. Poulain, N. Poussereau, H. Quesneville, C. Rasclé, J. Schumacher, B. a. Ségurens, A. Sexton, E. Silva, C. Sirven, D. M. Soanes, N. J. Talbot, M. Templeton, C. Yandava, O. Yarden, Q. Zeng, J. A. Rollins, M.-H. Lebrun & M. Dickman, (2011) Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* **7**: e1002230.
- Anderson, C., B. Brumhard, K. Ditzgen & H. Reiner, (1999) Metabolism of fenhexamid (KBR 2738) in plants, animals, and the environment *PFLANZENSCHUTZ NACHRICHTEN -BAYER* **52**: 227-251.
- Avenot, H. F. & T. J. Michailides, (2010) Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* **29**: 643-651.
- Baarlen, P., L. Legendre & J. L. Kan, (2004) Plant Defence Compounds Against *Botrytis* Infection. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen (eds). Springer Netherlands, pp. 143-161.
- Bard, M., D. A. Bruner, C. A. Pierson, N. D. Lees, B. Biermann, L. Frye, C. Koegel & R. Barbuch (1996) Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 186-190.
- Bardas, G. A., C. K. Myresiotis & G. S. Karaoglanidis, (2008) Stability and Fitness of Anilopyrimidine-Resistant Strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**: 443-450.
- Baudry, K., E. Swain, A. Rahier, M. Germann, A. Batta, S. Rondet, S. Mandala, K. Henry, G. S. Tint, T. Edlind, M. Kurtz & J. T. Nickels, (2001) The Effect of the *erg26-1* Mutation on the Regulation of Lipid Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 12702-12711.
- Bautista-Bañosa, S., A. Hernández-Lauzardo, N. , M. Velázquez-del Vallea, G., M. Hernández-Lápeza, E. Ait Barkab, E. Bosquez-Molinac & C. L. Wilson, (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* **25**: 108-118.
- Beever, R. & P. Weeds, (2007) Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen (eds). Springer Netherlands, pp. 29-52.

Références bibliographiques

- Billard, A., (2011) Fenhexamid: Mode d'action et resistance chez le complexe d'espèce *Botrytis* spp., responsable de la pourriture grise de la vigne. In. Paris: Université Paris XI, pp. 173-176.
- Billard, A., S. Fillinger, P. Leroux, H. Lachaise, R. Beffa & D. Debieu, (2012) Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science* **68**: 684-691.
- Blum, M., M. Waldner & U. Gisi, (2010) A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 499-510.
- Brito, N., J. Espino & C. Gonzalez, (2006) The endo-beta-1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 25 - 32.
- Bull, C. T., M. L. Wadsworth, K. N. Sorensen, J. Y. Takemoto, R. K. Austin & J. L. Smilanick, (1998) Syringomycin E Produced by Biological Control Agents Controls Green Mold on Lemons. *Biological Control* **12**: 89-95.
- Bunster, L., N. J. Fokkema & B. Schippers, (1989) Effect of Surface-Active *Pseudomonas* spp. on Leaf Wettability. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1340-1345.
- Burden, R. S., D. T. Cooke & J. A. Hargreaves, (1990) Review—mechanism of action of herbicidal and fungicidal compounds on cell membranes. *Pesticide Science* **30**: 125-140.
- Campbell, M. A., M. Staats, J. A. L. van Kan, A. Rokas & J. C. Slot, (2013) Repeated loss of an anciently horizontally transferred gene cluster in *Botrytis*. *Mycologia* **105**: 1126-1134.
- Campbell, M. A., A. Rokas & J. C. Slot, (2012) Horizontal Transfer and Death of a Fungal Secondary Metabolic Gene Cluster. *Genome Biology and Evolution* **4**: 289-293.
- Carlen, C., R. Faby, R. Karjalainen, J. J. Pommier & R. Steffek, (2004) CONTROL OF AIR BORNE DISEASE IN STRAWBERRIES WITH NATURAL AND SYNTHETIC ELICITORS. *Act Horticulturae* **649**: 237-240.
- Catlett, N. L., O. C. Yoder & B. G. Turgeon, (2003) Whole-Genome Analysis of Two-Component Signal Transduction Genes in Fungal Pathogens. *Eukaryotic Cell* **2**: 1151-1161.
- Chambon, C., V. Ladeveze, M. Servouse, L. Blanchard, C. Javelof, B. Vladescu & F. Karst, (1991) Sterol pathway in yeast. Identification and properties of mutant strains defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase. *Lipids* **26**: 633-636.
- Cilindre, C., A. J. Castro, C. Clément, P. Jeandet & R. Marchal, (2007) Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chemistry* **103**: 139-149.
- Clark, C. A. & J. W. Lorbeer, (1977) Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathology* **67**: 212-218.
- Clemons, G. P. & H. D. Sisler, (1971) Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1**: 32-43.
- Cole, L., F. M. Dewey & C. R. Hawes, (1996) Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* **100**: 277-286.
- Colmenares, A. J., J. Aleu, R. Durán-Patrón, I. G. Collado & R. Hernández-Galán, (2002) The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea*. *J Chem Ecol* **28**: 997-1005.

Références bibliographiques

- Corey, E. J., S. P. Matsuda & B. Bartel, (1994) Molecular cloning, characterization, and overexpression of ERG7, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding lanosterol synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2211-2215.
- Coyne, J. A. & H. Allen Orr, (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **353**: 287-305.
- Cutler, H. G., J. M. Jacyno, J. S. Harwood, D. Dulik, P. D. Goodrich & R. G. Roberts, (1993) BOTCINOLIDE - A BIOLOGICALLY-ACTIVE NATURAL PRODUCT FROM BOTRYTIS-CINEREA. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **57**: 1980-1982.
- Cutler, H. G., S. R. Parker, S. A. Ross, F. G. Crumley & P. R. Schreiner, (1996) Homobotcinolide: A Biologically Active Natural Homolog of Botcinolide from *Botrytis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**: 656-658.
- Daugaard, H., L. Sørensen, B. Løschenkohl & B. Løschenkohl, (2003) Effect of plant spacing, nitrogen fertilisation, post-harvest defoliation and finger harrowing in the control of *Botrytis cinerea* pers. in strawberry. *European Journal of Horticultural Science* **68**: 77-82.
- Davidou, M. F. J. R. L., (2011) Actualisation des connaissances sur la pourriture grise In, pp.
- Davidse, L. C., (1973) Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **3**: 317-325.
- Davidse, L. C., O. C. M. Gerritsma, J. Ideler, K. Pie & G. C. M. Velthuis, (1988) Antifungal modes of action of metalaxyl, cyprofuram, benalaxyl and oxadixyl in phenylamide-sensitive and phenylamide-resistant strains of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* and *Phytophthora infestans*. *Crop protection*. **7**: 347-355.
- Debieu, D., J. Bach, M. Hugon, C. Malosse & P. Leroux, (2001) The hydroxylanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science* **57**: 1060-1067.
- Debieu, D., J. Bach, E. Montesinos, S. Fillinger & P. Leroux, (2013) Role of sterol 3-ketoreductase sensitivity in susceptibility to the fungicide fenhexamid in *Botrytis cinerea* and other phytopathogenic fungi. *Pest Management Science* **69**: 642-651.
- Decognet, V., Ravetti F., C. Martin & a. Nicot., (2010) Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agronomy for Sustainable Development* **30**: 465 - 472.
- Doddapaneni, H. & J. Yadav, (2004) Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes *pc-1* (CYP63A1) and *pc-2* (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 559-565.
- Doehlemann, G., P. Berndt & M. Hahn, (2006) Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* **59**: 821-835.
- Doss, R. P., S. W. Potter, G. A. Chastagner & J. K. Christian, (1993) Adhesion of Nongerminated *Botrytis cinerea* Conidia to Several Substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1786-1791.
- Doss, R. P., S. W. Potter, A. H. Soeldner, J. K. Christian & L. E. Fukunaga, (1995) Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 260-265.

Références bibliographiques

- Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarasin & C. Wilson, (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* **52**: 137-145.
- Dutton, M. V. & C. S. Evans, (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* **42**: 881-895.
- Elad, Y., (1988) Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Prot.* **7**: 361-366.
- Elad, Y., (1996) Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *Eur J Plant Pathol* **102**: 719-732.
- Elad, Y., (1997) Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Prot.* **16**: 635-642.
- Elad, Y. & A. Stewart, (2004) Microbial Control of *Botrytis* spp. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen (eds). Springer Netherlands, pp. 223-241.
- Elad, Y. & H. Volpin, (1993) Reduced Development of Grey Mould (*Botrytis cinerea*) in Bean and Tomato Plants by Calcium Nutrition. *Journal of Phytopathology* **139**: 146-156.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen, (2004) *Botrytis: biology, pathology and control*.
- Elmer, P. A. G. & T. Reglinski, (2006) Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**: 155-177.
- Epton, H. & D. Richmond, (1980) *Formation, structure and germination of conidia*. Coley-Smith JR, Verhoeff and Jarvis WR (eds) *The biology of Botrytis*. Academic Press, London.
- Fraaije, B. A., J. A. Butters, J. M. Coelho, D. R. Jones & D. W. Hollomon, (2002) Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant pathology*. **51**: 45-54.
- Faretra, F., E. Antonacci & S. Pollastro, (1988) Sexual Behaviour and Mating System of *Botryotinia fuckeliana*, Teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* **134**: 2543-2550.
- Fillinger, S., S. Ajouz, P. C. Nicot, P. Leroux & M. Bardin, (2012) Functional and Structural Comparison of Pyrrolnitrin- and Iprodione-Induced Modifications in the Class III Histidine-Kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* **7**: e42520.
- Fillinger, S., P. Leroux, C. Auclair, C. Barreau, C. Al Hajj & D. I. Debieu, (2008) Genetic Analysis of Fenhexamid-Resistant Field Isolates of the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 3933-3940.
- Forman, H. J., M. Maiorino & F. Ursini, (2010) Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry* **49**: 835-842.
- Fournier, E. & T. Giraud, (2008) Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 122-132.
- Fournier, E., T. Giraud, C. Albertini & Y. Brygoo, (2005) Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* **97**: 1251-1267.
- Fournier, E., T. Giraud, A. Loiseau, D. Vautrin, A. Estoup, M. Solignac, J. M. Cornuet & Y. Brygoo, (2002) Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* **2**: 253-255.

Références bibliographiques

- Fritz, R., C. Lanen, F. Chapeland-Leclerc & P. Leroux, (2003) Effect of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine α -lyase of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**: 54-65.
- Gachotte, D., C. A. Pierson, N. D. Lees, R. Barbuch, C. Koegel & M. Bard, (1997) A yeast sterol auxotroph (*erg25*) is rescued by addition of azole antifungals and reduced levels of heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 11173-11178.
- Garcia-Arenal, F. & E. M. Sagasta, (1980) Scanning Electron Microscopy of *Botrytis cinerea* Penetration of Bean (*Phaseolus vulgaris*) Hypocotyls. *Journal of Phytopathology* **99**: 37-42.
- Gijzen, M. & T. Nürnberger, (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**: 1800-1807.
- Gilbert, S. R., H. J. Cools, B. A. Fraaije, A. M. Bailey & J. A. Lucas, (2009) Impact of proquinazid on appressorial development of the barley powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **94**: 127-132.
- Gioti, A., A. Simon, P. Le Pécheur, C. Giraud, J. M. Pradier, M. Viaud & C. Levis, (2006) Expression Profiling of *Botrytis cinerea* Genes Identifies Three Patterns of Up-regulation in Planta and an FKBP12 Protein Affecting Pathogenicity. *Journal of Molecular Biology* **358**: 372-386.
- Giraud, T., D. Fortini, C. Levis, C. Lamarque, P. Leroux, K. LoBuglio & Y. Brygoo, (1999) Two Sibling Species of the *Botrytis cinerea* Complex, *transposa* and *vacuata*, Are Found in Sympatry on Numerous Host Plants. *Phytopathology* **89**: 967-973.
- Giraud, T., G. Refrégier, M. Le Gac, M. d. V. Damien & M. E. Hood, (2008) Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 791-802.
- Gourgues, M., A. Brunet-Simon, M. H. Lebrun & C. Levis, (2004) The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* **51**: 619-629.
- Hac-Wydro, K., P. Wydro, A. Jagoda & J. Kapusta, (2007) The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **150**: 22-34.
- Have, A. t., W. Mulder, J. Visser & J. A. L. van Kan, (1998) The Endopolygalacturonase Gene *Bcpg1* Is Required for Full Virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1009-1016.
- Haubruge, É. & M. Amichot, (1998) Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **2**: 161-174.
- Hennebert, G., (1963) Les *Botrytis* des All. *Landbouwhogeschool Opzoekingsstn* **28**: 851-876.
- Hennebert, G., (1973) *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* **7**: 183-204.
- Hennig, W., (1966) *Phylogeny systematics*. University of Illinois Press, Illinois.
- Hollomon, D. W. & K. Chamberlain, (1981) Hydroxypyrimidine fungicides inhibit adenosine deaminase in barley powdery mildew. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **16**: 158-169.
- Howard, R. J., J. A. Garland & W. L. Seaman, (1994) Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada. *The Canadian Phytopathological Society and the Entomological Society of Canada*: 590.
- Huang, J., T.-F. Hsieh, G. A. Chastagner & T. Hsiang, (2001) Clonal and sexual propagation in *Botrytis elliptica*. *Mycological Research* **105**: 833-842.

Références bibliographiques

- Jahnke, L. & H. P. Klein, (1983) Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **155**: 488-492.
- Jamalizadeh, M., H. R. Etebarian, H. Aminian & A. Alizadeh, (2011) A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin* **41**: 65-71.
- Jarvis, W. R., (1977) *Botryotinia and botrytis species: taxonomy physiology and pathogenicity*, p. 195. Monograph, Research Branch Canada Department of Agriculture Otta.
- Jeandet, P., M. Adrian, A. C. Breuil, M. Sbaghi, S. Debord, R. Bessis, L. A. Weston & R. Harmon, (2000) CHEMICAL INDUCTION OF PHYTOALEXIN SYNTHESIS IN GRAPEVINES: APPLICATION TO THE CONTROL OF GREY MOULD IN THE VINEYARD. *ISHS Acta Horticulturae* **528**: 591-596.
- Jennings, S. M., Y. H. Tsay, T. M. Fisch & G. W. Robinson, (1991) Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 6038-6042.
- Johnston, D. J. & B. Williamson, (1992) Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **96**: 343-349.
- Kars, I., G. H. Krooshof, L. Wagemakers, R. Joosten, J. A. E. Benen & J. A. L. Van Kan, (2005a) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal* **43**: 213-225.
- Kars, I., M. McCalman, L. Wagemakers & J. Van Kan, (2005b) Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. *Mol Plant Pathol* **6**: 641 - 652.
- Kim, Y. K. & C. L. Xiao, (2010) Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in Populations of *Botrytis cinerea* from Stored Apples in Washington State. *Plant Dis.* **94**: 604-612.
- Klarzynski, O., B. Plesse, J.-M. Joubert, J.-C. Yvin, M. Kopp, B. Kloareg & B. Fritig, (2000) Linear α -1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. *Plant Physiology* **124**: 1027-1038.
- Klimpel, A., C. S. Gronover, B. Williamson, J. A. Stewart & B. Tudzynski, (2002) The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* **3**: 439-450.
- Kohn, L. M., (2005) Mechanisms of Fungal Speciation. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 279-308.
- Kondrashov, A. S. & M. V. Mina, (1986) Sympatric speciation: when is it possible? *Biological Journal of the Linnean Society* **27**: 201-223.
- Kretschmer, M. & M. Hahn, (2008) Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **115**: 214-219.
- Kulkarni, R., M. Thon, H. Pan & R. Dean, (2005) Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biology* **6**: R24.
- Ky, I., B. Lorrain, M. Jourdes, G. Pasquier, M. Fermaud, L. GÉNY, P. Rey, B. Doneche & P. L. Teissedre, (2012) Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **18**: 215-226.

Références bibliographiques

- Layer, J., B. Barnes, Y. Yamasaki, R. Barbuch, L. Li, S. Taramino, G. Balliano & M. Bard, (2013) Characterization of a mutation that results in independence of oxidosqualene cyclase (Erg7) activity from the downstream 3-ketoreductase (Erg27) in the yeast ergosterol biosynthetic pathway. *Biochim Biophys Acta* **1831**: 361-369.
- Leroch, M., C. Plesken, R. W. S. Weber, F. Kauff, G. Scalliet & M. Hahn, (2013) Gray Mold Populations in German Strawberry Fields Are Resistant to Multiple Fungicides and Dominated by a Novel Clade Closely Related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 159-167.
- Leroux, P., (1996) Recent Developments in the Mode of Action of Fungicides. *Pesticide Science* **47**: 191-197.
- Leroux, P., (2003) Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies* **326**: 9-21.
- Leroux, P., F. Chapeland, D. Desbrosses & M. Gredt, (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Prot.* **18**: 687-697.
- Leroux, P., R. Fritz, D. Debieu, C. Albertini, C. Lanen, J. Bach, M. Gredt & F. Chapeland, (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58**: 876-888.
- Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch & 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**: 6615-6630.
- Leroux, P. & A.-S. Walker, (2013) Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. *Eur J Plant Pathol* **135**: 683-693.
- Lima, G., De Curtis, C. F., P. R., S., & V. De Cicco, (1998) Additives and natural products against post harvest pathogens compatibility with antagonistic yeasts. *Plant Pathology* **80**: 259.
- Liu, W., P. Leroux & S. Fillinger, (2008) The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1062-1074.
- Liu, W., M.-C. Soulié, C. Perrino & S. Fillinger, (2011) The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 377-387.
- Ma, Z. & T. J. Michailides, (2004) Characterization of iprodione-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **80**: 75-84
- Maguy, A., T. E. Hebert & S. Nattel, (2006) Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovascular Research* **69**: 798-807.
- Mansfield, (1980) The biology of *Botrytis*. In: The biology of *Botrytis*. R. C.-. Smith, K. Verhoeff & W. R. Jarvis (eds). London, pp.
- Masaya, S., Masao FUKUTOMI & S. AKAI, (1970) Effects of Temperature on the Conidium Germination and Appressorium Formation of *Botrytis cinerea* Pers. *Japanese Journal of Phytopathology* **36**: 234-236.

Références bibliographiques

- Mayden, R. L., (1997) A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: Species: the units of biodiversity. M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (eds). London, pp.
- Mayr, E., (1963) *Animal species and evolution*.
- Melin, P., I. Sundh, S. Håkansson & J. Schnürer, (2007) Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects. *Biotechnol Lett* **29**: 1147-1154.
- Mouches, C., (2005) Les lutations responsables de résistances aux insecticides. In: Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. R. CR (ed). Paris, pp. 207-224.
- Movahedi, S. & J. B. Heale, (1990) The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**: 303-324.
- Muñoz, G. n., P. Hinrichsen, Y. Brygoo & T. Giraud, (2002) Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* **106**: 594-601.
- Nicot, P. C. & Baille,, (1996) Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes. *Aerial plant surface micr obiology*: 169-189.
- Nicot, P. C., M. Mermier, B. E. Vaissiere & J. Lagier, (1996) Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. *Plant Dis.* **80**: 555-558.
- Nigro, F., L. Schena, A. Ligorio, I. Pentimone, A. Ippolito & M. G. Salerno, (2006) Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. *Postharvest Biology and Technology* **42**: 142-149.
- Noda, J., N. Brito & C. Gonzalez, (2010) The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology* **10**: 38.
- Noor, M. A. F. & J. L. Feder, (2006) Speciation genetics: evolving approaches. *Nat Rev Genet* **7**: 851-861.
- Opalski, K. S., S. Tresch, K.-H. Kogel, K. Grossmann, H. Köhle & R. Hüchelhoven, (2006) Metrafenone: studies on the mode of action of a novel cereal powdery mildew fungicide. *Pest Management Science* **62**: 393-401.
- Pasrija,R, Prasad.T & Prasad.R, (2005) Membrane raft lipid constituents affect drug susceptibilities of *Candida albicans*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 1219-1223.
- Peter H, R., R. F. Evert & E. Susan E, (2003) *Biologie Végétale*. de Boeck.
- Philippe Lherminer, M. S., (2000) L'espèce: définition d'auteurs. *Sciences de la vie*: 153-165.
- Pinedo, C., C.-M. Wang, J.-M. Pradier, B. Dalmais, M. Choquer, P. Le Pécheur, G. Morgant, I. G. Collado, D. E. Cane & M. Viaud, (2008) Sesquiterpene Synthase from the Botrydial Biosynthetic Gene Cluster of the Phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chemical Biology* **3**: 791-801.
- Queiroz, D. K., (2007) Species Concepts and Species Delimitation. *SYSTEMATIC BIOLOGY* **56**: 879-886.
- Qutob, D., B. Kemmerling, F. d. r. Brunner, I. Kufner, S. Engelhardt, A. A. Gust, B. Luberacki, H. U. Seitz, D. Stahl, T. Rauhut, E. Glawischnig, G. Schween, B. Lacombe, N. Watanabe, E. Lam, R. Schlichting, D. Scheel, K. Nau, G. Dodt, D. Hubert, M. Gijzen

Références bibliographiques

- & T. Nürnberger, (2006) Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *The Plant Cell Online* **18**: 3721-3744.
- Rahier, A., M. Bergdoll, G. v. Génot, F. Bouvier & B. Camara, (2009) Homology Modeling and Site-Directed Mutagenesis Reveal Catalytic Key Amino Acids of 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/C4-Decarboxylase from Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**: 1872-1886.
- Reignault, P., C. Kunz, N. Delage, E. Moreau, R. Vedel, W. Hamada, G. Bompeix & M. Boccara, (2000) Host- and symptom-specific pectinase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **104**: 421-428.
- Reignault, P., O. Valette-Collet & M. Boccara, (2008) The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *Eur J Plant Pathol* **120**: 1-11.
- Reis, H., S. Pfiffi & M. Hahn, (2005) Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **6**: 257-267.
- Rolke, Y., S. Liu, T. Quidde, B. Williamson, A. Schouten, K.-M. Weltring, V. Siewers, K. B. Tenberge, B. Tudzynski & P. Tudzynski, (2004) Functional analysis of H2O2-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* **5**: 17-27.
- Rui, O. & M. Hahn, (2007) The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Molecular Plant Pathology* **8**: 173-184.
- Samadi, S. & A. Barberousse, (2006) The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society* **89**: 509-521.
- Schulze Gronover, C. S., D. Kasulke, P. Tudzynski & B. Tudzynski, (2001) *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1293.
- Schumacher, J., L. Kokkelink, C. Huesmann, D. Jimenez-Teja, I. G. Collado, R. Barakat, P. Tudzynski & B. Tudzynski, (2008) The cAMP-Dependent Signaling Pathway and Its Role in Conidial Germination, Growth, and Virulence of the Gray Mold *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1443-1459.
- Segmüller, N., U. Ellendorf, B. Tudzynski & P. Tudzynski, (2007) BcSAK1, a Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase, Is Involved in Vegetative Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic Cell* **6**: 211-221.
- Seiya Saito, Seiichi Furuya, T. Takayanagi & S. Suzuki, (2010) Phenotypic Analyses of Fenhexamid Resistant *Botrytis cinerea* Mutants. In: *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects*. O. Carisse (ed). inTech, pp.
- Siegmund, U., J. Heller, J. A. L. van Kann & P. Tudzynski, (2013) The NADPH Oxidase Complexes in *Botrytis cinerea* : Evidence for a Close Association with the ER and the Tetraspanin Pls1. *PLoS ONE* **8**: e55879.
- Siewers, V., M. Viaud, D. Jimenez-Teja, I. G. Collado, C. S. Gronover, J.-M. Pradier, B. Tudzynski & P. Tudzynski, (2005) Functional Analysis of the Cytochrome P450 Monooxygenase Gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* Indicates That Botrydial Is a Strain-Specific Virulence Factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 602-612.
- Soichi Tanaka, Sou Kiguchi, Fukumatsu Iwahashi, Michele Pizzi, Yves Senechal & Ryo Ishikawa, (2013) General characteristics of fenpyrazamine, a novel fungicidal compound for controlling gray mold. In: XVI International Botrytis symposium. Locorotondo (Italy), pp. 44.

Références bibliographiques

- Soulié, M. C., A. Piffeteau, M. Choquer, M. Boccara & A. Vidal-Cros, (2003) Disruption of Botrytis cinerea class I chitin synthase gene Bcchs1 results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genetics and Biology* **40**: 38-46.
- Staats, M., P. Van Baarlen, A. Schouten & J. A. L. Van Kan, (2007) Functional analysis of NLP genes from Botrytis elliptica. *Molecular Plant Pathology* **8**: 209-214.
- Staats, M., P. van Baarlen & J. A. L. van Kan, (2005) Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus Botrytis and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 333-346.
- Sturley, S. L., (2000) Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1529**: 155-163.
- Suty, A., R. Pontzen & K. Stenzel, (1999) fenhexamid-sensitivity of Botrytis cinerea: Determination of baseline sensitivity and assessment of the risk of resistance *PFLANZENSCHUTZ NACHRICHTEN -BAYER* **52**: 145-147.
- Suzuki, F., J. Yamaguchi, A. Koba, T. Nakajima & M. Arai, (2010) Changes in Fungicide Resistance Frequency and Population Structure of Pyricularia oryzae after Discontinuance of MBI-D Fungicides. *Plant Dis.* **94**: 329-334.
- Tamura, O., (2000) Resistance development of grey mould on beans towards fluazinam and relevant countermeasures. In: 10th symposium of research committee of fungicide resistance. T. P. Society_of_Japon (ed). Okayama, Japon, pp.
- Taylor, J. W., E. Turner, J. P. Townsend, J. R. Dettman & D. Jacobson, (2006) Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**: 1947-1963.
- Tenberge, K., (2004) Morphology and Cellular Organisation in Botrytis Interactions with Plants. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen (eds). Springer Netherlands, pp. 67-84.
- Thomas, C. S., J. J. Marois & J. T. English, (1988) THE EFFECTS OF WIND-SPEED, TEMPERATURE, AND RELATIVE-HUMIDITY ON DEVELOPMENT OF AERIAL MYCELIUM AND CONIDIA OF BOTRYTIS-CINEREA ON GRAPE. *Phytopathology* **78**: 260-265.
- Toquin, V., F. Barja, C. Sirven, S. Gamet, M.-P. Latorse, J.-L. Zundel, F. Schmitt & R. Beffa, (2007) A new mode of action for fluopicolide: modification of the cellular localization of a spectrin-like protein. *PFLANZENSCHUTZ NACHRICHTEN -BAYER* **59**: 171-184.
- Tosi, B., A. Donini, C. Romagnoli & A. Bruni, (1996) Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents. *Phytotherapy Research* **10**: 335-336.
- Valette-Collet, O., A. s. Cimerman, P. Reignault, C. Levis & M. Boccara, (2003) Disruption of Botrytis cinerea Pectin Methylesterase Gene Bcpme1 Reduces Virulence on Several Host Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 360-367.
- Van Der Vlugt-Bergmans, C. J. B., B. F. Brandwagt, J. W. Vant't Klooster, C. A. M. Wagemakers & J. A. L. Van Kan, (1993) Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in Botrytis cinerea. *Mycological Research* **97**: 1193-1200.
- van Kan, J. A. L., J. W. van 't Klooster, C. A. M. Wagemakers, D. C. T. Dees & C. J. B. van der Vlugt-Bergmans, (1997) Cutinase A of Botrytis cinerea is Expressed, but not Essential, During Penetration of Gerbera and Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 30-38.
- Van Valen, L., (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* **25**: 253-229.

Références bibliographiques

- Veloukas, T. & G. S. Karaoglanidis, (2012) Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Management Science* **68**: 858-864.
- Viaud, M., A. Brunet-Simon, Y. Brygoo, J.-M. Pradier & C. Levis, (2003) Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology* **50**: 1451-1465.
- Viaud, M., S. Fillinger, W. Liu, J. S. Polepalli, P. Le Pécheur, A. R. Kunduru, P. Leroux & L. Legendre, (2006) A Class III Histidine Kinase Acts as a Novel Virulence Factor in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1042-1050.
- Walker, A.-S., A. I. Gautier, J. Confais, D. Martinho, M. Viaud, P. Le Pécheur, J. Dupont & E. Fournier, (2011) *Botrytis pseudocinerea*, a New Cryptic Species Causing Gray Mold in French Vineyards in Sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **101**: 1433-1445.
- Walker, A.-S., A. Micoud, F. Rémuson, J. Grosman, M. Gredt & P. Leroux, (2013) French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science* **69**: 667-678.
- Wang CM, Hopson R, Lin X & C. DE, (2009) Biosynthesis of the sesquiterpene botrydial in *Botrytis cinerea*. Mechanism and stereochemistry of the enzymatic formation of presilphiperfolan-8 β -ol. . *Journal of the American Chemical Society* **131**: 8360-8361.
- Weete, J. D., M. Abril & M. Blackwell, (2010) Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. *PLoS ONE* **5**: e10899.
- Wheeler, I. E., D. W. Hollomon, G. Gustafson, J. C. Mitchell, C. Longhurst, Z. Zhang & S. J. Gurr, (2003) Quinoxifen perturbs signal transduction in barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*). *Molecular Plant Pathology* **4**: 177-186.
- Williamson, B., G. H. Duncan, J. G. Harrison, L. A. Harding, Y. Elad & G. Zimand, (1995) Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**: 1303-1310.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski & J. Van Kan, (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* **8**: 561 - 580.
- Yamaguchi, I. & M. Fujimura, (2005) Recent Topics on Action Mechanisms of Fungicides. *Journal of Pesticide Science* **30**: 67-74.
- Yarden, O. & T. Katan, (1993) Mutations leading to substitutions at Amino Acids 198 and 200 of Beta-Tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**: 1478-1483.
- Yasuhiko, U., (2001) FUNGAL CHOLINE BIOSYNTHESIS – A TARGET FOR CONTROLLING RICE BLAST. *Pesticide Outlook February*.
- Yeagle, P. L., (1990) Frontiers of membrane research: lipid-protein complexes in membranes; membrane fusion. *Progress in clinical and biological research* **343**: 15-28.
- Yong, L., M. Zhonghua, R. Heraclio C., M. Dave P. & M. Themis J., (2007) Using real-time PCR to survey frequency of azoxystrobin-resistant allele G143A in *Alternaria* populations from almond and pistachio orchards in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **88**: 328-336.
- Yoshida, Y., Y. Aoyama, H. Takano & T. Kato, (1986) Stereo-selective interaction of enantiomers of diniconazole, a fungicide, with purified P-45014DM from yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **137**: 513-519.

Références bibliographiques

- Yunis, H., Y. Elad & Y. Mahrer, (1990) EFFECTS OF AIR-TEMPERATURE, RELATIVE-HUMIDITY AND CANOPY WETNESS ON GRAY MOLD OF CUCUMBERS IN UNHEATED GREENHOUSES. *Phytoparasitica* **18**: 203-215.
- Zhang, J., M.-D. Wu, G.-Q. Li, L. Yang, L. Yu, D.-H. Jiang, H.-C. Huang & W.-Y. Zhuang, (2010a) *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia* **102**: 1114-1126.
- Zhang, J., L. Zhang, G. Q. Li, D. H. Jiang, W. Y. Zhuang & H. C. Huang, (2010b) *Botrytis sinoallii*, a new species from *Allium* vegetables in China. *Mycoscience* **51**: 421-431.
- Zhao, H., Y. K. Kim, L. Huang & C. L. Xiao, (2010) Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology* **56**: 12-18.
- Zheng, L., M. Campbell, J. Murphy, S. Lam & J.-R. Xu, (2000) The BMP1 Gene Is Essential for Pathogenicity in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 724-732.

ANNEXE

**Publication « Schumacher et *al.*, 2013 »
reprenant des résultats du chapitre III**

Résumé

La pourriture grise est une maladie qui affecte de nombreuses cultures dont la vigne. Elle est provoquée par un complexe de deux espèces fongiques, l'espèce majoritaire *Botrytis cinerea* et l'espèce minoritaire *Botrytis pseudocinerea*. Les deux espèces se distinguent par leur sensibilité à certains fongicides notamment au fenhexamid, inhibiteur de la 3-cétoréductase des stérols. Ce fongicide a un spectre d'action restreint aux espèces phylogénétiquement proches du genre *Botrytis* (*Sclerotinia* et *Monilinia fructicola*). Son utilisation a conduit à la sélection de souches résistantes parmi lesquelles on distingue trois phénotypes : le phénotype HydR1 correspond à l'espèce *B. pseudocinerea* naturellement résistante ; les phénotypes HydR2 et HydR3 correspondent à l'espèce *B. cinerea* ayant acquis la résistance suite à l'introduction du fongicide. L'objet de cette thèse est l'étude des phénotypes HydR1 et HydR2 présents à de faibles, voire très faibles fréquences dans des populations de pourriture grise.

Chez *B. pseudocinerea* (HydR1), nous avons identifié une monooxygénase à cytochrome P450 nommée Cyp684 responsable de la résistance au fenhexamid. Le gène *cyp684* montre des polymorphismes (structure et séquence nucléotidique) entre les espèces ainsi qu'une induction par le fenhexamid chez *B. pseudocinerea*. La comparaison de la séquence du gène *cyp684* chez plusieurs espèces de *Botrytis* et de leurs niveaux de résistance au fenhexamid indique que les acides aminés polymorphes de la protéine Cyp684 sont responsables de la résistance au fenhexamid chez *B. pseudocinerea*. Le rôle connu des monooxygénase à cytochrome P450 dans la métabolisation des xénobiotiques et la synergie entre le fenhexamid et des inhibiteurs de monooxygénases à P450 suggèrent que Cyp684 soit impliqué dans la métabolisation du fenhexamid. Concernant le phénotype HydR2 de *B. cinerea*, le mécanisme de résistance reste à identifier. Les souches HydR2 se distinguent par leur phénotype rose dû à un métabolite secondaire nommé bikavérine. Le génotypage réalisé sur les descendantes d'un croisement entre une souche HydR2 et une souche sensible a mis en évidence un lien physique entre le gène ou l'allèle *hydr2* et le cluster bikavérine. Afin d'identifier la niche écologique et de comprendre l'épidémiologie de *B. pseudocinerea*, nous avons développé une méthode de qPCR espèce spécifique, nommée « *B. pseudocinerea* allele specific PCR » (BpASP). Cet outil permettra de détecter et de quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* dans les populations de *Botrytis*, selon la saison, la région géographique et les plantes hôtes.

Abstract

Grey mold is a fungal disease affecting many crops including grapevine. It is generated by a species complex of two fungal species, the major one, *Botrytis cinerea*, and the minor species, *Botrytis pseudocinerea*. Both species differ by their sensitivity to several fungicides, in particular to fenhexamid, a potent inhibitor of sterol 3-ketoreductase. This fungicide has a narrow spectrum of activity limited to species closely related to the genus *Botrytis* (e.g., *Sclerotinia* and *Monilinia fructicola*). Fenhexamid applications have led to the selection of resistant strains with three different phenotypes: the HydR1 phenotype corresponds to the naturally resistant species *B. pseudocinerea*; HydR2 and HydR3 phenotypes correspond to *B. cinerea* strains that acquired resistance after the introduction of fenhexamid. The topic of this thesis is the study of the phenotypes HydR1 and HydR2 present at low or even very low frequencies in grey mold populations.

We identified a cytochrome P450 monooxygenase named Cyp684 responsible for resistance to fenhexamid in *B. pseudocinerea* (HydR1). The *cyp684* gene differs between both species in its gene structure, nucleotide sequence (polymorphisms) and expression. The comparison of *cyp684* sequences among different *Botrytis* species and their resistance levels to fenhexamid indicate the polymorphic amino acids of the Cyp684 protein to be responsible for fenhexamid resistance in *B. pseudocinerea*. The known involvement of cytochrome P450s in xenobiotic metabolism and synergy between fenhexamid and P450-inhibitors suggest that Cyp684 could be involved in fenhexamid metabolism. Concerning the *B. cinerea* HydR2 phenotype, the resistance mechanism remains to be identified. HydR2 strains have a specific purple pigmentation due to the secondary metabolite bikaverin. Genotyping of progeny derived from a cross between a HydR2 and a sensitive strain revealed a physical link between the *hydr2* gene or allele and the gene cluster involved in bikaverin biosynthesis. In order to identify the ecological niche of *B. pseudocinerea* and its epidemiological behavior we developed a species-specific qPCR method named "*B. pseudocinerea* allele specific PCR" (BpASP). This tool will allow detecting and quantifying the species *B. pseudocinerea* in natural *Botrytis* populations, collected according to season, geographic origin or plant hosts.

A Functional Bikaverin Biosynthesis Gene Cluster in Rare Strains of *Botrytis cinerea* Is Positively Controlled by VELVET

Julia Schumacher¹, Angélique Gautier², Guillaume Morgant², Lena Studt^{1,3}, Paul-Henri Ducrot⁴, Pascal Le Pêcheur², Saad Azeddine², Sabine Fillinger², Pierre Leroux², Bettina Tudzynski^{1*}, Muriel Viaud^{2*}

1 Institute for Biology and Biotechnology of Plants, Westfälische Wilhelms-University, Münster, Germany, **2** INRA, UR BIOGER-CPP, Thiverval-Grignon, France, **3** Institute of Food Chemistry, Westfälische Wilhelms-University, Münster, Germany, **4** INRA, IJPB, Versailles, France

Abstract

The gene cluster responsible for the biosynthesis of the red polyketidic pigment bikaverin has only been characterized in *Fusarium* spp. so far. Recently, a highly homologous but incomplete and nonfunctional bikaverin cluster has been found in the genome of the unrelated phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. In this study, we provided evidence that rare *B. cinerea* strains such as 1750 have a complete and functional cluster comprising the six genes orthologous to *Fusarium fujikuroi* *ffbik1-ffbik6* and do produce bikaverin. Phylogenetic analysis confirmed that the whole cluster was acquired from *Fusarium* through a horizontal gene transfer (HGT). In the bikaverin-nonproducing strain B05.10, the genes encoding bikaverin biosynthesis enzymes are nonfunctional due to deleterious mutations (*bcbik2-3*) or missing (*bcbik1*) but interestingly, the genes encoding the regulatory proteins BcBIK4 and BcBIK5 do not harbor deleterious mutations which suggests that they may still be functional. Heterologous complementation of the *F. fujikuroi* Δ *ffbik4* mutant confirmed that *bcbik4* of strain B05.10 is indeed fully functional. Deletion of *bcvel1* in the pink strain 1750 resulted in loss of bikaverin and overproduction of melanin indicating that the VELVET protein BcVEL1 regulates the biosynthesis of the two pigments in an opposite manner. Although strain 1750 itself expresses a truncated BcVEL1 protein (100 instead of 575 aa) that is nonfunctional with regard to sclerotia formation, virulence and oxalic acid formation, it is sufficient to regulate pigment biosynthesis (bikaverin and melanin) and fenhexamid Hydr2 type of resistance. Finally, a genetic cross between strain 1750 and a bikaverin-nonproducing strain sensitive to fenhexamid revealed that the functional bikaverin cluster is genetically linked to the Hydr2 locus.

Citation: Schumacher J, Gautier A, Morgant G, Studt L, Ducrot P-H, et al. (2013) A Functional Bikaverin Biosynthesis Gene Cluster in Rare Strains of *Botrytis cinerea* Is Positively Controlled by VELVET. PLoS ONE 8(1): e53729. doi:10.1371/journal.pone.0053729

Editor: Sung-Hwan Yun, Soonchunhyang University, Republic of Korea

Received: August 30, 2012; **Accepted:** December 4, 2012; **Published:** January 7, 2013

Copyright: © 2013 Schumacher et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bettina.tudzynski@uni-muenster.de (BT); viaud@versailles.inra.fr (MV)

Introduction

Fungi are an important source of natural bioactive compounds such as antibiotics that may be beneficial for medicine or such as mycotoxins that are problematic in agriculture [1]. The native role of most of these secondary metabolites remains unclear but they may contribute to the fitness of the fungus notably to the protection against biotic and abiotic stresses [2–3]. Recent sequencing projects have revealed that fungal genomes may contain up to forty gene clusters for secondary metabolism [4,5]. Classically, each of these clusters contains the necessary set of genes encoding all enzymes required for the biosynthesis of one compound or multiple structurally closely related compounds. The enzyme responsible for the committed biosynthetic step, often referred to as the “key” enzyme, could be a polyketide synthase (PKS), a non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), a hybrid PKS/NRPS, a dimethylallyltryptophan synthase (DMATS), or a terpene synthase. In many cases, the clusters also contain genes encoding specific transcription factors and transporters exporting the metabolites. Clustering of genes involved in the production of one metabolite may provide an evolutionary advantage during

horizontal gene transfer (HGT) since it allows the transmission of an entire pathway [6] and the co-regulation of cluster genes by epigenetic regulation mechanisms [7–8]. Recently, HGT of several clustered genes has been proven to occur between distantly related fungi [9–10] or even from bacteria to ascomycetes [11].

The red pigment bikaverin was first isolated from *Gibberella* (*Fusarium*) *fujikuroi* [12]. As for many secondary metabolites, its production seems to be restricted to closely related species of *Fusarium* [13]: *F. fujikuroi* [14], *F. oxysporum* [15], *F. verticillioides* [16] and *F. proliferatum* [17] while distantly related *Fusarium* species like *F. graminearum* produce another red pigment, aurofusarin [18].

Recently, we identified and characterized the bikaverin biosynthesis gene cluster in *F. fujikuroi* [14]. In addition to the PKS-encoding gene *ffbik1* (for *Fusarium fujikuroi* bikaverin 1, former *ffpks4*; [19]), it contains five genes encoding two biosynthetic enzymes (*ffbik2*, *ffbik3*), two regulators (*ffbik4*, *ffbik5*), and one transporter (*ffbik6*). The expression of the *ffbik* genes is negatively regulated by high amounts of nitrogen, alkaline pH and by the FVEL1 protein, a component of the VELVET complex which was recently described as a global regulator of secondary metabolism and differentiation in fungi [8,14]. In the unrelated

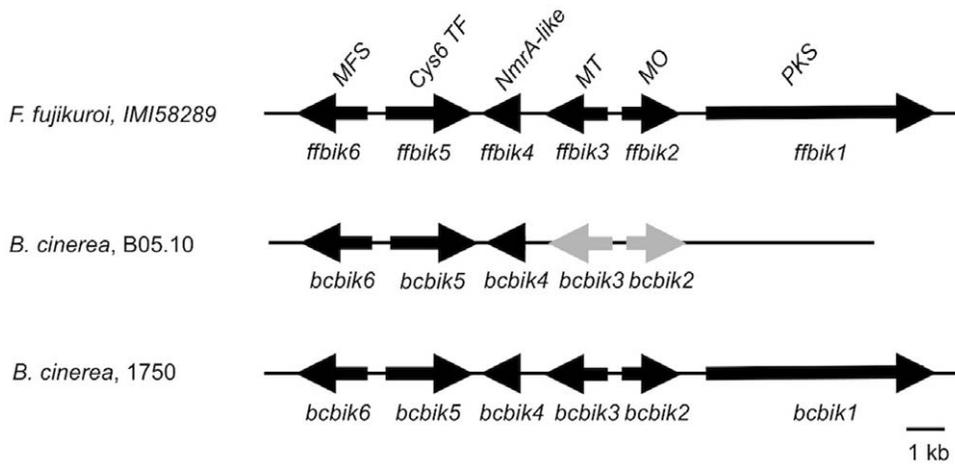


Figure 1. Schematic view of the bikaverin gene clusters in *F. fujikuroi* [14], and in gray (B05.10) and pink (1750) *B. cinerea* strains. Complete clusters include a PKS-encoding gene (*bik1*), a putative FAD-dependent monooxygenase (*bik2*), an O-methyltransferase (*bik3*), a putative NmrA-like transcriptional regulator (*bik4*), a Zn(II)₂Cys₆ fungal type transcription factor (*bik5*) and an MFS-type transporter (*bik6*). doi:10.1371/journal.pone.0053729.g001

fungus *Botrytis cinerea*, known as the gray mold agent, rare strains also produce a red pigment giving a pink coloration to the mycelium [20–22]. During monitoring of fungicide resistance, we found two of these pink-pigmented strains additionally being resistant to the fungicide fenhexamid [23]. Recently, the genomes of two gray *B. cinerea* strains, B05.10 and T4, were sequenced, revealing more than forty potential secondary metabolite gene clusters [24] [5]. Interestingly, a nonfunctional bikaverin gene cluster missing the PKS-encoding gene *bik1* was identified [25].

The aim of this study was therefore to verify whether the red pigment produced by *B. cinerea* was bikaverin and to characterize the corresponding biosynthesis genes. We report that the pink *B. cinerea* strains contain the complete functional cluster similar to the one described in *F. fujikuroi*. The results presented highlight the importance of horizontal gene transfer between distantly related fungi for the evolution of fungal secondary metabolism and reveal previously unknown features of the VELVET protein in the regulation of pigment biosynthesis.

Results

Only few *Botrytis cinerea* strains possess a complete and functional bikaverin gene cluster

The bikaverin biosynthesis cluster has only been characterized in *Fusarium fujikuroi* so far [14]. As shown in Figure 1, this cluster contains three biosynthetic genes, *ffvik1*, *ffvik2* and *ffvik3*, encoding a PKS, a putative FAD-dependent monooxygenase and an O-methyltransferase, respectively. In addition, it includes two genes encoding transcriptional regulators, a putative NmrA-like protein (FbBIK4) and a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor (FbBIK5), as well as one gene encoding a MFS (major facilitator superfamily)-type transporter (FbBIK6). Recently, an incomplete bikaverin gene cluster, containing the putative orthologues of *ffvik2* to *ffvik6*, was identified in the genomes of the sequenced *B. cinerea* strains B05.10 and T4 [25]. Genes *bcbik2* to *bcbik6* are organized similarly to those in *F. fujikuroi* (Fig. 1), however, an orthologue of *ffvik1* encoding the key enzyme is absent from both sequenced genomes. In addition,

Table 1. *Botrytis cinerea* strains used in this study.

Strain and origin	Red Pigment	Fenhe-xamid	Colony diameter on MA, 3 dpi (mm)	Conidia-tion	Sclerotia formation	Lesion diameter on bean, 5 dpi (mm)
B05.10, grape (Germany)	–	S	50.8+/-3.7	+	+	30.8+/-4.7
T4, tomato (France)	–	S	44.8+/-5.8	+	–	18.0+/-6.2
SAS56, grape (Italy)	–	S	52.2+/-6.6	+	+	27.8+/-5.2
SAS405, grape (Italy)	–	S	55.8+/-5.5	+	+	28.9+/-3.7
1750, cucumber (Japan)	+	Hyd R2	45.3+/-8.1	+	–	10.9+/-5.0
1787, strawberry (Japan)	+	Hyd R2	48.7+/-7.6	+	+	32.2+/-4.1
SEP159, tomato (France)	+	S	54.8+/-6.7	+	+	30.3+/-4.8
TM517, almond (USA)	+	S	56.2+/-7.7	+/-	+	No lesion
TM66B02, pistachio (USA)	+	S	53.9+/-6.8	+	+	32.2+/-4.1
TM2884, rose (USA)	+	S	53.5+/-5.6	+	+	32.2+/-4.1
TM2413, grape (NC, USA)	+	S	38.8+/-8.3	+/-	–	No lesion

Fitness characteristics were measured as indicated in Material in Methods. doi:10.1371/journal.pone.0053729.t001

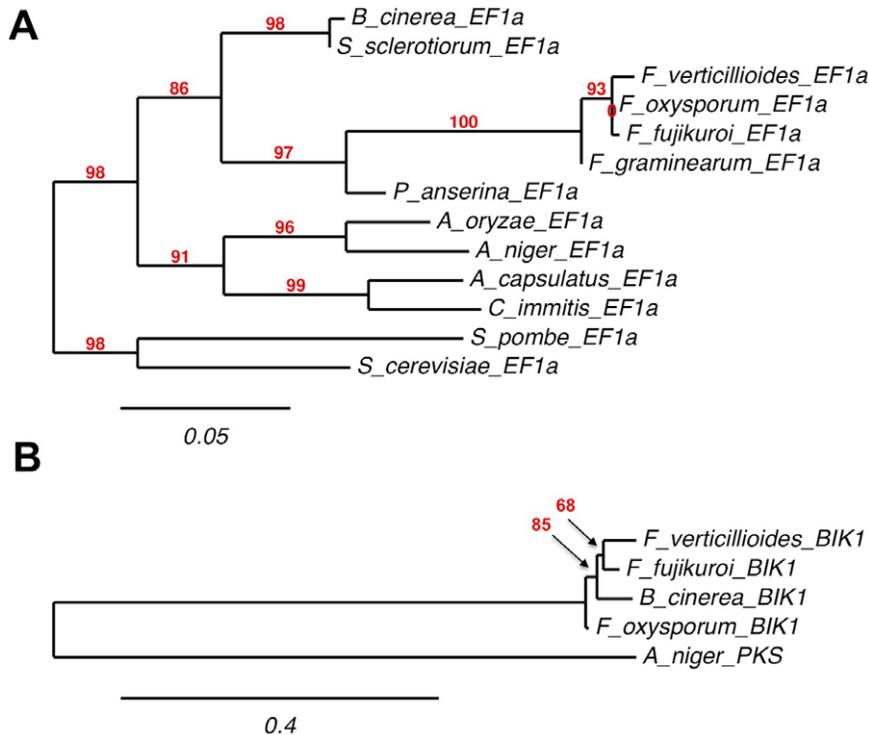


Figure 2. Comparative phylogenies of the conserved elongation factor EF1 α and the BIK1. Maximum likelihood phylogenies from alignments of the protein sequences were estimated using the PhyML program with the substitution model WAG and a number of bootstraps of 100 [52] (<http://www.phylogeny.fr>). A. Phylogeny of EF1 α represents the evolution of fungal species. Selected proteins are from *Botrytis cinerea* (BROAD: BC1G_09492.1), *Sclerotinia sclerotiorum* (GenBank: EDO03042.1), *Fusarium verticillioides* (BROAD: FVEG_02381.3), *Fusarium oxysporum* (GenBank: EGU83230.1), *Fusarium fujikuroi* (B. Tudzynski, unpublished data), *Fusarium graminearum* (BROAD: FGSG_08811.3), *Podospora anserina* (NCBI: XP_001907437.1), *Aspergillus oryzae* (GenBank: BAA76296.1), *Aspergillus niger* (NCBI: XP_001398942.1), *Ajellomyces capsulatus* (GenBank: AAB17119.1), *Coccidioides immitis* (GenBank: AAK54650.1), *Schizosaccharomyces pombe* (NCBI: NP_594440.1), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: AAA34585.1). B. Phylogeny of BIK1 indicates a non-vertical inheritance. Selected proteins are from the pink *B. cinerea* strain 1750 (EMBL: HE802550), *F. fujikuroi* (GenBank: CAB92399.1), *F. oxysporum* (BROAD: FOXG_04757), and *F. verticillioides* (BROAD: FVEG_03379). The PKS sequence from *A. niger* (JGI: ANG51499) was used to root the tree. doi:10.1371/journal.pone.0053729.g002

many stop mutations and small deletions were identified in *bcbik2* and *bcbik3* when compared to *ffbik2* and *ffbik3* suggesting that they represent pseudogenes [25]. Among B05.10 *bcbik* genes, only *bcbik6* encoding a MFS transporter showed evidence of expression in previous microarray analysis [5]. Taken together, these previously published data suggest that the two sequenced *B. cinerea* strains contain an incomplete and inactive bikaverin gene cluster.

This gene cluster was further investigated in *B. cinerea* strains producing a red pigment. In addition to strains 1750 and 1787 previously reported [23], five other pink strains were collected from different countries and host plants (Table 1). The bikaverin gene cluster was sequenced in three pink strains (1750, 1787 and SEP159) by using primers based on the B05.10 sequence (See Material and methods and Table S1). Sequencing revealed that the organization of *bcbik2* to *bcbik5* is similar to that found in the gray strains (Fig. 1). Because of an AT-rich region (60%) that are present in both gray and pink strains, we failed to sequence the PCR product corresponding to the intergenic region between *bcbik5* and *bcbik6*. However, Southern-blot analysis confirmed that the genes are at the same locus as in the genomes of T4 and B05.10 (data not shown). Interestingly, the 3' non-coding region of *bcbik2* in the pink strains could not be amplified using primers defined on the B05.10 sequence suggesting a strain-specific polymorphism. A TAIL-PCR approach was therefore initiated by using specific forward primers binding the 3' coding sequence of *bcbik2* and degenerate primers (See Material and Methods;

[26]). By this approach we identified a PKS-encoding gene downstream of *bcbik2* (Fig. 1). In accordance with BIK1 from *F. fujikuroi*, the PKS contains the three essential domains typical of non-reducing PKSs, the ketoacyl synthase (KS), acyl transferase (AT) and phosphopantetheine (PP) domains, as well as an additional thioesterase (TE) release domain [19]. Bidirectional Best Hit analysis (BDBH; [5]) confirmed that this new *B. cinerea* PKS, hereafter called BcBIK1, is the orthologue of *F. fujikuroi* BIK1. Therefore, the bikaverin gene cluster in *B. cinerea* strains 1750, 1787 and SEP159 consists of the same six genes (*bcbik1* to *bcbik6*) and shows the same organization as the bikaverin gene cluster in *F. fujikuroi*. Moreover, the coding regions of the genes in the pink strains do not show any stop codons, frame shifts or deletions suggesting that the expression of these genes lead to functional enzymes and in turn to the biosynthesis of bikaverin. To confirm this hypothesis, the red pigment produced by strains 1750 and 1787 was purified and analyzed by Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance (MS and NMR, see details in Material and Methods). The spectroscopic data were similar to those previously reported for bikaverin [27–28] confirming that the gene cluster is functional in the pink strains of *B. cinerea*.

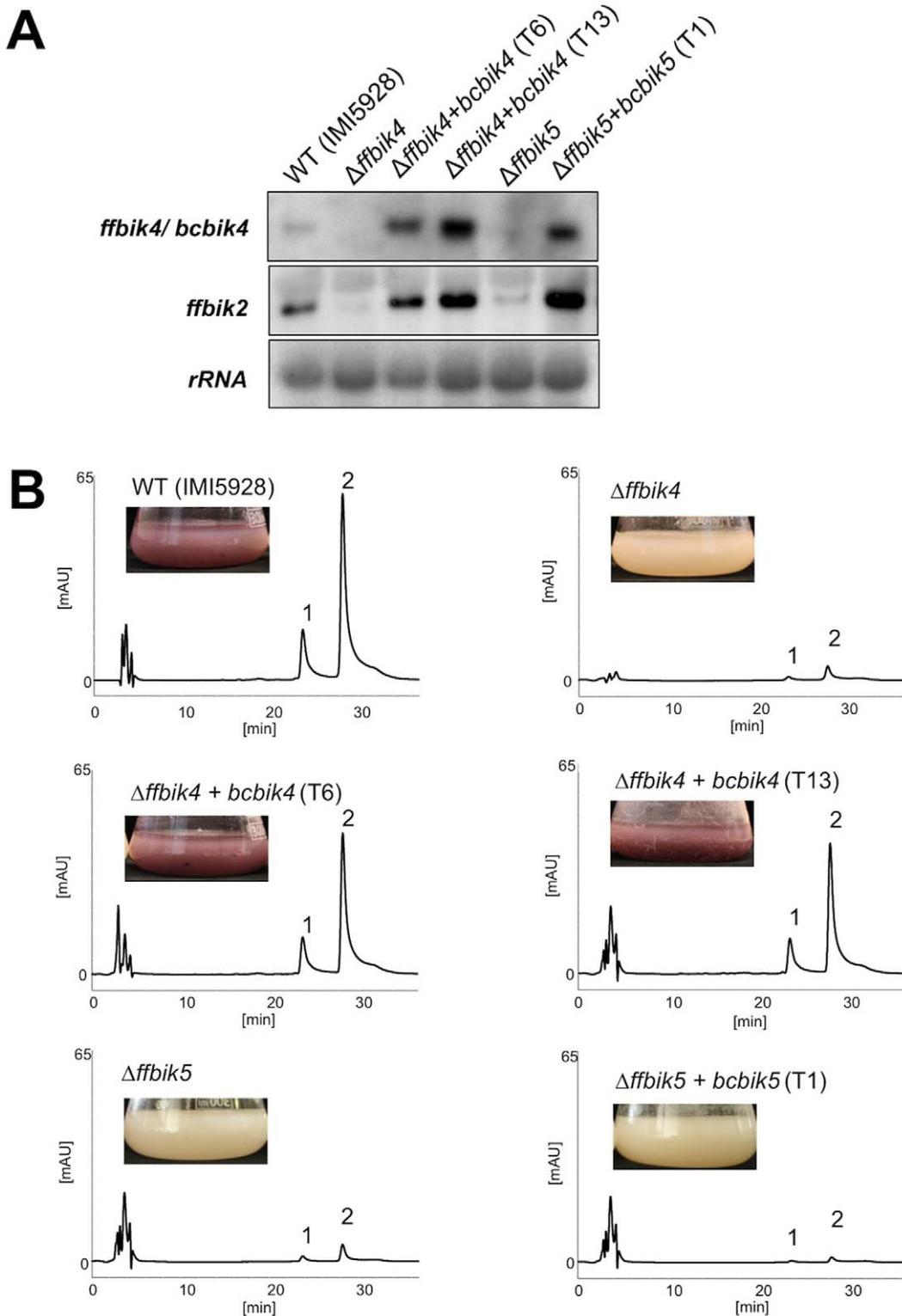


Figure 3. Heterologous expression of *bcbi4* and *bcbi5* of the gray strain B05.10 in the respective *Fusarium fujikuroi* (IMI58289) deletion mutants. A. Expression of *ffbi2* and *ffbi4/bcbi4*. Wild type (IMI58289) and mutants were grown for three days in 10% liquid ICI (0.6 mM glutamine) medium at 28°C and 180 rpm. The northern blots were hybridized with probes for *ffbi2* or simultaneously hybridized with probes for *ffbi4* and *bcbi4*. rRNA is shown as loading control. B. Identification of bikaverin and norbikaverin production. Wild type (IMI58289) and mutants were grown in liquid ICI medium containing 6 mM glutamine for three days. Samples were taken and used for HPLC-DAD analyses (detected at 450 nm) as described in Material and Methods. Peaks for norbikaverin (1) and bikaverin (2) are labeled in the chromatograms. doi:10.1371/journal.pone.0053729.g003

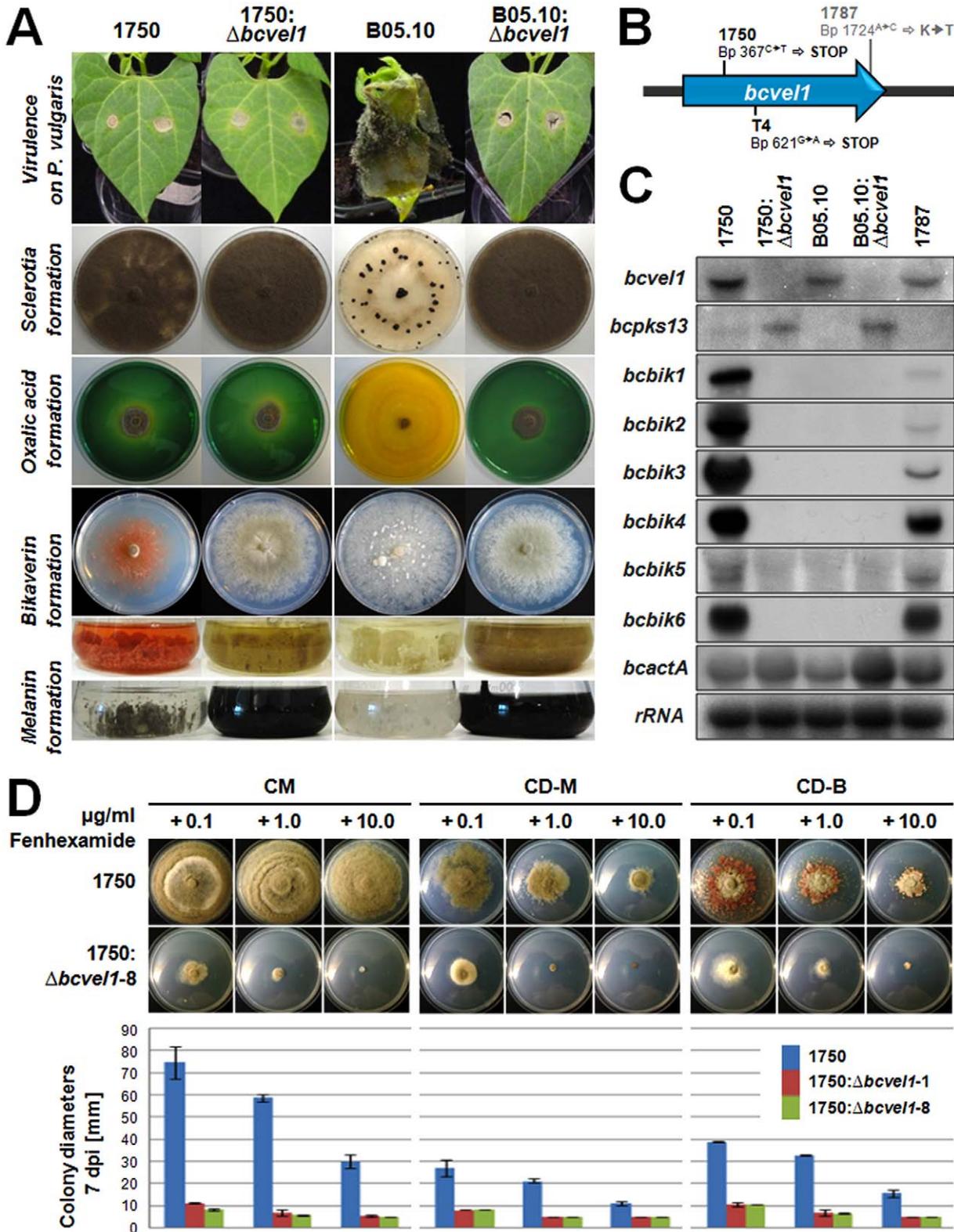


Figure 4. Role of the global regulator BcVEL1 in the pink strain 1750. A. Phenotypes caused by the deletion of *bcvel1* in two different genetic backgrounds, 1750 and B05.10. Virulence of strains was monitored on living plants of *Phaseolus vulgaris* (7 days after inoculation), sclerotial development by incubation on complete medium (CM) in continuous darkness (14 days), oxalic acid production by using the pH indicator bromothymol blue (color change from green to yellow indicate the acidification of the culture medium) (7 days), bikaverin formation by incubation in liquid or on solid CD-B medium in the dark (7 days), and melanin formation by incubation in liquid CD-M medium in light-dark conditions (7 days). B. Sequencing of *bcvel1* in the pink strains 1750 and 1787 revealed several SNPs. The point mutation of base pair 367 in 1750 results in a stop codon; a similar mutation leading to a truncated BcVEL1 was recently found in strain T4 [32]. Both 1750 and 1787 comprise additional point mutations that are

either silent or result in amino acid exchanges (see also Fig. S2). C. Detection of *bcbk1-6* expression in pink (1750, 1787) and gray (B05.10) strains. Strains were grown for 3 days on solid CD-B medium covered with cellophane overlays. Northern blots were hybridized with probes for *bcvel1*, *bcpks13* (encoding the polyketide synthase that catalyzes the first step in melanin biosynthesis), *bcbk1-6*, and *bcactA* (actin). rRNA is shown as loading control. D. Effect of fenhexamid on growth rates of 1750 and 1750: $\Delta bcvel1$ mutants. Strains were grown on complete medium (CM), CD-M (bikaverin-non-inducing conditions) or CD-B (bikaverin-inducing conditions) supplemented with the indicated concentrations of fenhexamid. Diameters of six colonies per strain and condition were measured after 7 days of incubation; pictures were taken after 13 days. doi:10.1371/journal.pone.0053729.g004

The functional bikaverin gene cluster has been acquired through horizontal gene transfer

The recent phylogenetic study of Campbell et al. [25] revealed that *B. cinerea* strains B05.10 and T4 have inherited *bcbk2* to *bcbk6* from *Fusarium* through an HGT. Because of the lack of *bcbk1* in these gray strains, it was not known whether the complete bikaverin gene cluster was initially transferred between the two distantly related species. The identification of the complete and functional bikaverin cluster in few *B. cinerea* strains provided the opportunity to answer this question. We performed a phylogenetic analysis on the basis of the six *bcbk* functional genes of strain 1750. The distribution of the bikaverin gene cluster among fungal genomes was investigated by similarity searches using the *F. fujikuroi* FfBIK protein sequences [14] (Material and methods). Corresponding genes of *F. oxysporum* and *F. verticillioides* were found in the genome database at the Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative>). In these two bikaverin-producing species the cluster organization is identical to that described in the closely related species *F. fujikuroi* [14] [25]. From the current genomic data, *B. cinerea* appears to be the only species sharing the bikaverin cluster with the *Fusarium* species as the cluster could not be detected in any other fungal species sequenced so far. The amino acid sequences of BcBIK1 to BcBIK6 of the pink strain 1750 were aligned with the proteins from the *Fusarium* species and maximum likelihood phylogenies were estimated. Figure 2 presents the phylogenetic tree of the longer and more polymorphic BIK1 compared to the tree of the conserved elongation factor EF1 α whose evolution represents the evolution of fungal species. According to the recent phylogenetic study of Watanabe et al. [29], the bikaverin-producing *Fusarium* species are closely related as they all belong to the Clade V of the *Fusarium* genus. Inside this clade, *F. verticillioides* and *F. fujikuroi* are members of the *G. fujikuroi* species complex (also named *Liseola* section) while *F. oxysporum* stands apart (in the *Elegans* section). The phylogenetic tree shows that the evolution of BIK1 from the *Fusaria* fits with the evolution of these species, suggesting that BIK1 was vertically inherited from a common ancestor. In contrast, the position of BcBIK1 inside the *Fusarium* branch is not compatible with a vertical inheritance of the gene. Phylogenetic analysis of BIK2 to BIK5 also placed the *B. cinerea* proteins inside the group of *Fusarium* proteins. Nevertheless, the bootstrap values on the branches were weaker than for BIK1, probably because of the smaller number of informative polymorphic amino acids compared to the PKS (Fig. S1). Finally, the protein sequences were concatenated to generate a tree based on the polymorphism of the whole set of BIK proteins that resembles the BIK1 tree (Fig. S1). In sum, these data demonstrate that *B. cinerea* has acquired the functional bikaverin gene cluster from *Fusarium* through a HGT.

To get an indication of how widely distributed the bikaverin cluster in the genus *Botrytis* is, we investigated its presence in 30 strains of *B. cinerea* and 15 other *Botrytis* species that belong either to the clade 1 or to the clade 2 defined by Staats et al. [30] (Table S2). *Bcbk6* was detected by diagnostic PCR in all *B. cinerea* strains, as well as in the species *B. pelargonii* and *B. pseudocinerea* that

are members of clade 1 like *B. cinerea* [31], and in *B. tulipae* belonging to clade 2 [30]. By contrast, the PKS-encoding gene *bcbk1* was only found in the seven *B. cinerea* strains that produce the red pigment. The distributional patterns of the bikaverin gene cluster within the genus *Botrytis* suggest that the HGT probably occurred from *Fusarium* to a common ancestor of *Botrytis* clade 1 and 2 and that most of the strains of the investigated species have lost either the whole or a part (*bcbk1*) of the bikaverin cluster later on rendering them incapable to produce bikaverin.

Bikaverin-producing strains are heterogenous with regard to differentiation and virulence

The seven pink *B. cinerea* strains collected so far (Table 1) do not share any common geographic origin or host. In order to investigate whether the production of bikaverin affects differentiation and virulence in *B. cinerea*, several fitness characteristics of pink strains were compared to those of gray strains (B05.10, T4, SAS405 and SAS56). Radial growth rates on different solid media such as on minimal (MM) and rich medium (MA), varying light conditions (16 h light per day versus complete dark), and different temperatures (18, 23 and 27°C; See Material and Methods) gave similar results (Table 1; data not shown). On all tested media, the pink strains conidiated like the gray strains, with the exception of TM517 and TM2413 that only produce very few conidia. Formation of sclerotia in darkness occurred for all strains except 1750, TM2413 and T4. Virulence tests also revealed heterogeneity among the pink strains with two strains being nonpathogenic (TM517 and TM2413) on bean leaves and one strain (1750) exhibiting reduced virulence as the gray strain T4. In conclusion, no common biological feature could be identified among the bikaverin-producing strains when compared to the gray reference strains indicating that bikaverin production does not affect processes such as light-dependent differentiation and virulence.

BcBIK4 of the bikaverin-nonproducing strain B05.10 is fully functional

Based on bioinformatics analyses of the evolution of the incomplete bikaverin gene clusters found in strains B05.10 and T4, Campbell et al. [25] suggested that the regulatory genes *bcbk4* and *bcbk5* encoding a NMR-like protein and the putative pathway-specific Zn(II)₂Cys₆ transcription factor, respectively, are probably functional. They postulated selective preservation of these regulatory genes, and especially of *bcbk4*, due to its possible involvement in other non-bikaverin-related biosynthetic pathways in *B. cinerea*. To verify this hypothesis experimentally, we expressed *bcbk4* and *bcbk5* from the gray strain B05.10 driven by the *A. nidulans oliC* promoter in *F. fujikuroi* $\Delta ffbk4$ and $\Delta ffbk5$ mutants, respectively. In $\Delta ffbk4$ and $\Delta ffbk5$ mutants, bikaverin production is drastically reduced due to the down-regulation of the three biosynthetic genes, *ffbk1-ffbk3* [14]. Transformants overexpressing *bcbk4* ($\Delta ffbk4+bcbk4$) showed the expected strong expression of *bcbk4* (Fig. 3A) and full restoration of bikaverin production as shown by HPLC spectra (Fig. 3B). On the other hand, $\Delta ffbk5$ mutants expressing *bcbk5* ($\Delta ffbk5+bcbk5$) did not produce the pigment. However, the BcBIK5 transcription factor

Table 2. Fungal strains used in this study for genetic modifications.

Fungus/strain	Description/genotype	Reference
<i>Botrytis cinerea</i>		
B05.10	Isolated from <i>Vitis</i> (Germany); <i>MAT1-1</i>	[59]
B05.10: $\Delta bcvel1$	B05.10, $\Delta bcvel1::hph$, homokaryon	[32]
1750	Isolated from cucumber (Japan); <i>MAT1-1</i>	This study
1750: $\Delta bcvel1$	1750, $\Delta bcvel1::hph$, homokaryon	This study
<i>Fusarium fujikuroi</i>		
IMI58289	Wild-type strain	Commonwealth Mycological Institute, UK
$\Delta ffbik4$	IMI58289, $\Delta ffbik4::nat1$	[14]
$\Delta ffbik4 + bcbik4$	IMI58289, $\Delta ffbik4::nat1$, OE <i>bcbik4</i> ^{B05.10} :: <i>hph</i>	This study
$\Delta ffbik5$	IMI58289, $\Delta ffbik5::nat1$	[14]
$\Delta ffbik5 + bcbik5$	IMI58289, $\Delta ffbik5::nat1$, OE <i>bcbik5</i> ^{B05.10} :: <i>hph</i>	This study

doi:10.1371/journal.pone.0053729.t002

must be partially functional, since it restores the expression of *ffbik4* and *ffbik2* (Fig. 3A). In summary, BcBIK4 and BcBIK5 of the bikaverin-nonproducing strain B05.10 retained full or partial functionality and were able to restore expression of other cluster genes (BcBIK4 and BcBIK5) and bikaverin biosynthesis (BcBIK4).

Bikaverin formation in strain 1750 is regulated by the VELVET protein BcVEL1

The VELVET protein complex is known for its function in coordinating secondary metabolism and light-dependent development in filamentous fungi (reviewed in [8]), and members of this protein complex were previously shown to regulate the biosynthesis of bikaverin and other secondary metabolites in *F. fujikuroi* [14]. Recently, we identified the VeA/FvVEL1-homologous gene of *B. cinerea* (*bcvel1*) by a map-based cloning approach for unraveling the genetic basis for the phenotypical differences between the two sequenced *B. cinerea* strains: the virulent strain B05.10 and the less virulent strain T4. We demonstrated that a single nucleotide polymorphism (SNP) in the T4 *bcvel1* homologue (*bcvel1*^{T4}) leads to a truncated and nonfunctional BcVEL1 protein. Thus, the replacement of the truncated *bcvel1*^{T4} copy by the native copy (*bcvel1*^{B05.10}) in the T4 genomic background resulted in the B05.10 phenotype and in turn, the deletion of *bcvel1* in B05.10 (B05.10: $\Delta bcvel1$) resulted in the T4 phenotype. T4 and B05.10: $\Delta bcvel1$ mutants are less virulent on bean plants, do not produce oxalic acid and form abundant conidia instead of sclerotia in continuous darkness. Notably, the production of the phytotoxic secondary metabolites botrydial and botcinic acid is not affected by the *bcvel1* mutations. Vegetative growth of the deletion mutant, however, was accompanied by increased secretion of the pigment melanin resulting in dark-colored culture broths [32].

To investigate if BcVEL1 regulates the formation of the red pigment bikaverin as well, we deleted the gene in the bikaverin-producing strain 1750. In two independent transformants (designated as 1750: $\Delta bcvel1$ -T1, and -T8) *bcvel1* was replaced by the hygromycin resistance cassette. In the first instance, we studied the impact of the *bcvel1* deletion on bikaverin formation. Strain 1750 produces bikaverin when cultivated in modified Czapek-Dox medium containing ammonium nitrate instead of sodium nitrate as nitrogen source (CD-B) under dark conditions (Fig. 4A). In contrast, 1750: $\Delta bcvel1$ mutants failed to produce bikaverin and did not express the cluster genes (*bcbik1-bcbik6*) indicating that BcVEL1 functions as a positive regulator of bikaverin formation (Fig. 4A).

We also searched for phenotypes that were associated with the *bcvel1* deletion in B05.10, such as reduced virulence, loss of sclerotia and oxalic acid formation, and overproduction of melanin. Strikingly, strain 1750 exhibited some of the characteristics of strain T4 expressing a mutated BcVEL1 and $\Delta bcvel1$ mutants derived from strains 1750 and B05.10; i.e. all four strains formed conidia instead of sclerotia during incubation in continuous darkness, exhibited reduced virulence on bean leaves, and did not produce oxalic acid. This indicates that strain 1750 itself may represent a natural *bcvel1* mutant as it was previously described for strain T4. Sequencing of the *bcvel1* open reading frame in 1750 revealed several SNPs involving base pairs 167, 234, 367, 981, 1080, and 1724 (Fig. S2). All SNPs except for that found at base pair 367 are also present in *bcvel1* of the pink strain 1787 indicating a closer relationship of both bikaverin producers with each other than with the gray strains (e.g. B05.10 and T4). Most mutations caused by the common SNPs in 1750 and 1787 are silent, the SNP at bp 1724 results in an amino exchange. The SNP at bp 367 (C to T) that is unique to strain 1750, however, introduces a stop codon and consequently leads to a shorter protein of only 100 aa (BcVEL1¹⁷⁵⁰) instead of 575 aa (wild-type protein: BcVEL1^{B05.10}). Therefore, phenotypes of 1750 concerning virulence, sclerotial development/light-independent conidiation, and oxalic acid formation can be assigned to the identified SNP in 1750. However, the phenotype of 1750: $\Delta bcvel1$ mutants differed from that of 1750 expressing the truncated BcVEL1 protein with regard to pigment formation: firstly, the deletion mutant lost the ability to produce bikaverin, and secondly, the deletion mutant but not 1750 exhibited increased melanin formation (Fig. 4C). Based on this fact, we conclude that the first 100 aa of the BcVEL1 protein are sufficient for regulation of bikaverin and melanin formation while the regulation of light-dependent differentiation and virulence requires the full-length protein.

Aside from the production of bikaverin, the strains 1750 and 1787 share an uncommon phenotype i.e. a specific type of resistance towards the fungicide fenhexamid (HydR2; [23]; Table 1). Having a 1750 mutant in hand that lacks the expression of *bcbik1* to *bcbik6* and consequently the formation of bikaverin, we studied the relationship between bikaverin and fenhexamid resistance by performing growth assays on solid media differentially affecting bikaverin formation (CM and CD containing sodium nitrate or ammonium nitrate as single nitrogen source) that were supplemented with different concentrations of fenhexamid. As shown in Fig. 4D, the lack of bikaverin gene cluster

activity in 1750: $\Delta bcvel1$ mutants was accompanied by the inability of the mutant to grow on medium containing fenhexamid, indicating that BcVEL1 regulates both characteristics. However, the loss of resistance is likely not correlated with the loss of the pink pigmentation of the mycelium, as 1750 is resistant to fenhexamid even on media that do not stimulate bikaverin production (CM and CD-M).

The bikaverin gene cluster of strain 1750 is genetically linked to the HydR2 locus responsible for a specific type of fenhexamid resistance

A formal genetic analysis was employed to test whether there is a link between the functional bikaverin cluster and the HydR2 type of fenhexamid resistance. A cross between the HydR2 pink strain 1750 and a gray strain sensitive to fenhexamid (HydS) was realized. Microconidia from 1750 were mixed with sclerotia of the two reference strains SAS56 and SAS405 exhibiting the *MAT1-1* and *MAT1-2* mating types, respectively [33]. Apothecia were recovered from the fertilization of sclerotia obtained from SAS405 with microconidia of 1750 indicating that 1750 possesses the MAT1-1 mating type. Seventy-three single ascospore-derived progeny were analyzed for their capability to produce bikaverin (Table S3). About half (40) of them produced pink mycelia when grown on solid YSS medium suggesting that only one locus is responsible for the phenotype. PCR tests furthermore showed that the individuals able to produce the pink pigment contain *bcbik1*, and in turn that gray individuals lack *bcbik1*. These data confirm that the described gene cluster is responsible for the production of bikaverin. PCR analyses using specific primers for detection of the two mating types (*MAT1-1* or *MAT1-2*) confirmed that genetic recombination between both parental strains had taken place; both mating types were found although not at equal ratios among the pink and gray individuals. Finally, we evaluated the linkage between bikaverin biosynthesis and fungicide resistance by cultivating the individuals on fenhexamid-containing media. All pink individuals showed the HydR2 phenotype as the parental strain 1750 while all except for one individual of the gray progeny were sensitive to fenhexamid resembling the HydS phenotype of parental strain SAS405 (number 52, Table S3). These segregation data suggest that the bikaverin cluster is genetically linked to the locus responsible of the HydR2 type of resistance in strain 1750.

Discussion

The recent sequencing of ascomyceteous genomes has revealed the large number and diversity of secondary metabolic gene clusters [3]. For instance, the genome of *B. cinerea* contains more than 43 potential secondary metabolism gene clusters; only 19 of them are shared with the closely related species *Sclerotinia sclerotiorum* although most genes have orthologues in at least one other more distantly related fungus [5]. This “patchy” distribution of secondary metabolism gene clusters in fungal species may be due to gene losses, but also due to acquisition of new genes by HGT between species. Such HGTs are assumed when clusters present in distantly related species show high degrees of microsynteny and when the orthologues exhibit high levels of amino acid identity [10] [9]. The hypothesis of a HGT from a donor species to a receptor species could be validated by phylogenetic analysis *i.e.* the genes of the receptor species are expected to group with those of the donor species in gene phylogenies and to be in stark contrast to the host species phylogeny. Using these approaches, a couple of HGTs between unrelated fungal species have recently been demonstrated. A cluster of five to six genes including a PKS-NRPS-encoding gene

was shown to be transferred from a donor close to *Magnaporthe grisea* to an ancestor of *Aspergillus clavatus* [9]. More recently, Slot and Rokas [10] provided evidence that the complete and functional sterigmatocystin biosynthesis gene cluster that is more than 50 kb in size was transferred from *Aspergillus* to *Podospora anserina*. Finally, Campell *et al.* [25] have shown that the sequenced genomes of the two *B. cinerea* strains T4 and B05.10 contain a nonfunctional bikaverin gene cluster that was acquired through HGT from a *Fusarium* ancestor. Because of the degenerated biosynthesis genes (*bcbik 2* and *bcbik 3*) and the absence of *bik1* encoding the key enzyme PKS, they postulated that the remaining *bcbik* genes were part of a dead bikaverin gene cluster. Our work provides evidence that this HGT originally also included the gene encoding the PKS (BIK1), and that the complete cluster is still present in strains of *B. cinerea* with the pink-mycelium phenotype, which are a minority of strains of this species. Indeed, phylogenetic analysis clearly showed that BcBIK1 nests within the *Fusarium* BIK1 proteins demonstrating that the gene was acquired horizontally from *Fusarium*. The facts that the *bcbik1* to *bcbik-6* genes sequenced in the pink strains do not show any deleterious mutation as the genes of the gray strains T4 and B05.10 do, that the cluster comprising *bcbik1* to *bcbik6* co-segregates with pigment production in a genetic cross between a pink and a gray strain, and that MS and NMR analysis identified the produced pink pigment as bikaverin demonstrate that the cluster is fully functional in few *B. cinerea* strains giving them the capability to form bikaverin. The presence of *bcbik6* in other *Botrytis* species (*B. pseudocinerea*, *B. pelargonii* and *B. tulipae*) indicates that the HGT occurred in an ancestor of *B. cinerea* before the divergence of the clade 1 and 2 [30]. However, our PCR screen did not detect a complete cluster in any of these other species suggesting that in most cases, the ability to produce bikaverin was lost.

The production of bikaverin by only a minority of *B. cinerea* strains raises the question of the biological function of this compound in the life cycle of the gray mold fungus. The acquisition and the conservation of the ability to produce a new secondary metabolite is likely driven by the need to survive in a particular environmental niche [2–3]. In the case of bikaverin in *B. cinerea*, this niche could not be anticipated from the origin of the seven known pink strains since they were collected from different continents and host plants. In controlled growth conditions, the pink strains showed heterogeneous behaviors in developmental processes such as formation of conidia and sclerotia. Furthermore, our experiments did not reveal any particular adaptation to temperature variations or light conditions when compared to the gray strains. Finally, virulence on bean leaves also illustrated the heterogeneity of the strains, with two of them being nonpathogenic.

Fungi are known to produce several pigments, in most cases PKS-derived secondary metabolites [34]. *B. cinerea* and many other fungi produce dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin that is excreted to the cell wall to protect survival structures from UV radiation, oxidizing agents, and desiccation [35]. Melanin is found in both macroconidia and sclerotia that are produced by *B. cinerea* depending on the environmental light conditions [36–37]. Melanization of sclerotia may protect them from mycoparasitism [38]. DHN-melanin biosynthesis involves a non-reducing PKS enzyme of clade II as defined by Kroken *et al.* [24]. The genome of *B. cinerea* contains a gene encoding such a PKS (*bcps13*), clustered with two other genes that could contribute to melanin biosynthesis [5]. In contrast, *Fusarium* species including the bikaverin-producing species *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, and *F. fujikuroi*, lack the PKS-encoding gene responsible for DHN-melanin biosynthesis [24]. In these species, the production of bikaverin could be an alternative way to protect the fungus from

UV damages. Recently, a second PKS-derived red pigment, the perithecia pigment fusarubin, has been identified in *F. fujikuroi* which was shown to mechanically stabilize the fruiting bodies and probably also protects these structures from environmental stresses [39]. Whether the production of both melanin and bikaverin by some *B. cinerea* strains provides an increased protection against UV light remain to be investigated. Bikaverin was also previously described as an antibiotic effective against protozoa, ascomycetes and oomycetes [13] [15]. Therefore, it may be involved in inhibition of competing microorganisms that interact with *Fusarium spp.* and *B. cinerea*.

The gray strains of *B. cinerea* are impaired in bikaverin production because of the absence or deleterious mutations in the biosynthetic genes (*bcbik1-3*) but the previous sequence analysis of the regulatory genes *bcbik4* and *bcbik5* suggested that they are still functional [25]. This was confirmed by our heterologous complementation approach: *bcbik4* and *bcbik5* from the gray strain B05.10 were shown to fully or partially complement the corresponding deletion mutants of *F. fujikuroi* [14]. While BcBIK4 restored bikaverin production in the Δ *ffbik4* mutant, BcBIK5 was able to overcome the down-regulation of bikaverin cluster genes, e.g. *ffbik4* and *ffbik2*, in the Δ *ffbik5* mutant. The reason why overexpression of *bcbik5* did not restore bikaverin production but only expression of cluster genes might be the partial deletion of the adjacent *ffbik6* gene in the Δ *ffbik5* mutant due to the *ffbik5* gene replacement strategy used [14]. The fact that the regulatory genes *bcbik4* and *bcbik5* are still functional despite the absence of functional biosynthesis genes (*bcbik1-3*) suggest that they may have acquired some additional regulatory functions in the expression of *B. cinerea* genes unrelated to the production of the red pigment as hypothesized by Campbell et al [25].

The work presented here has also explored the upstream regulation of the bikaverin cluster in *B. cinerea*. Expression of the gene cluster and the production of bikaverin depends on the global regulator VELVET (BcVEL1), as the deletion of *bcvel1* in a pink strain resulted in the absence of *bcbik1-6* expression and consequently in nonpigmented mutants. However, in contrast to the situation in *F. fujikuroi*, VEL1 acts as positive regulator of bikaverin formation in *B. cinerea*. The significant up-regulation of bikaverin formation in Δ *bcvel1* mutants is restored to wild-type levels by heterologous expression of BcVEL1 [32] suggesting that the antagonistic regulation of bikaverin formation by VELVET depends on the fungus and its downstream signaling processes rather than on the VEL1 protein. VELVET (VeA) homologues are known for their role in coordinating light-dependent development and secondary metabolism in ascomycetes, thereby positively or negatively affecting secondary metabolism, e.g. production of toxins and pigments [8]. Thus, FVEL1 is a repressor of bikaverin formation and at the same time a positive regulator of the production of gibberellic acids, fumonisins and fusarin C [14]. Interestingly, and in contrast to many other fungi, BcVEL1 does not affect the formation of the two most prominent secondary metabolites (botrydial and botcinic acid). Nevertheless, *bcvel1* mutants revealed significantly reduced virulence [32]. Similarly to *B. cinerea*, the deletion of VeA homologues affects pigment formation in other fungi, e.g. causing excessive brown pigmentation in *Aspergillus nidulans* [40], increased DHN melanin biosynthesis in *Cochliobolus heterostrophus* [41], and loss of aurofusarin formation in *F. graminearum* [42–43], of melanin formation in *Mycosphaerella graminicola* [44], and of the yellow pigmentation in *Trichoderma virens* [45].

By characterizing the pink strain (1750) that we chose for the *bcvel1* knock-out approach we identified a SNP in *bcvel1* leading to a truncated protein. Therefore, strain 1750 exhibits the “*velvet*

phenotype” (light-independent conidiation, loss of sclerotia formation and oxalic acid production, reduced virulence) as previously described for the *B. cinerea* strain T4 and the *bcvel1* deletion mutant in the B05.10 background [32]. Both pink strains 1787 and 1750 share several SNPs in *bcvel1*; the only exception is the SNP that leads to the stop codon in 1750. Whether the other pink strains contain SNPs in their *bcvel1* homologues as well needs to be investigated. However, as most of them are virulent and able to produce sclerotia, it can be ruled out that they are sharing the detrimental SNP with strain 1750. SNPs in the *bcvel1* are likely quite common, and so far two different loss-of-function mutations were described resulting in a 100-aa protein in the bikaverin producer 1750 and in a 184-aa protein in the nonproducing strain T4. Due to the fact that the phenotype of Δ *bcvel1* mutants differed from that of the progenitor 1750, different functions can be attributed to the N- and C-terminal parts of the VEL1 protein in *B. cinerea*. Based on the previous results, the presence of the C terminus (aa 185–575) of BcVEL1 is a prerequisite for nuclear localization, sclerotia formation, oxalic acid formation and full virulence [32] while the data obtained from the current study provide evidence that only the first 100 aa of BcVEL1 are required for regulation of pigment formation (repression of melanin formation and stimulation of bikaverin formation, respectively). Considering the fact that the expression of the truncated BcVEL1 protein in 1750 does not represent a loss-of-function mutation of BcVEL1 with regard to pigment formation, we compared the growth characteristics of both strains 1750 and T4. Like 1750, strain T4 did not show an increase in melanin production. Furthermore, both strains displayed reduced growth rates on standard media and formed conidia instead of sclerotia in constant darkness, while they produced fewer conidia compared to the wild type B05.10 and the respective Δ *bcvel1* mutant (data not shown). To gain a better understanding of the signaling function of BcVEL1 it will be necessary to investigate other proteins of the VELVET complex such as the homologues of *A. nidulans* VelB, VosA and LaeA. For instance, it was shown in *A. nidulans* that VeA interacts via the N terminus with VelB in the cytoplasm, and via the C terminus with the putative histone methyltransferase LaeA after entry of the VeA-VelB dimer into the nucleus [40].

Two of the studied pink strains show a HydR2 type of resistance to the hydroxylanilide fenhexamid, a botryticide whose target site is the 3-ketoreductase involved in the sterol C4 demethylation process [46]. Until now, three main phenotypes exhibiting specific resistance to fenhexamid have been identified among gray mold populations. HydR1 corresponds to the naturally resistant species *B. pseudocinerea* recently described [31]. In this species, resistance to fenhexamid is mainly determined by detoxification of the hydroxylanilide by a dedicated cytochrome P450 monooxygenase (A. Billard et al., unpublished). In *B. cinerea*, two types of resistance have been characterized. HydR3 corresponds to qualitative changes in the sterol 3-ketoreductase, the target of fenhexamid [47–48]. The mechanism of resistance in HydR2 strains remains unknown but the involvement of a yet unidentified monooxygenase, different from that of HydR1 strains, leading to an increase detoxification of fenhexamid has been suggested in both gray and pink strains [23]. The phenotype of 1750: Δ *bcvel1* mutants revealed that the *hydR2* locus is positively regulated by the VELVET complex similar to the bikaverin cluster. In addition, our analysis of a genetic cross between the HydR2 pink strain 1750 and a gray HydS strain suggested that the *hydR2* locus is genetically linked to the bikaverin cluster because both characters co-segregated in all but one ascospore isolates. Nevertheless, the presence of one gray resistant recombinant furthermore indicated that the complete gene cluster is not required for the HydR2 phenotype. At this

stage, our hypothesis is that the *hydr2* locus is either the *bcbik2* gene encoding a FAD-dependent monooxygenase, either another gene encoding a monooxygenase that is located near to the bikaverin gene cluster. Further genetic analyses are needed to identify this locus and the associated enzymatic activity involved in fenhexamid detoxification.

In summary, the existence of the complete bikaverin biosynthesis pathway in *B. cinerea* reveals that HGT contributed to the evolution of secondary metabolism and to the diversity of the gray mold populations. In *B. cinerea*, the bikaverin cluster is positively regulated by the VELVET protein BcVEL1 while the original cluster in *Fusarium* is negatively regulated by FIVEL1. Finally, the identification of another natural mutation of *bcvel1* in strain 1750 highlights this gene as an important source for achieving phenotypic variation, e.g. with regard to light-dependent differentiation, virulence and pigment formation.

Materials and Methods

Strains and culture conditions

The strains of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. [*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz] used in this study are listed in Tables 1 and S2. All newly isolated strains were genetically purified by generating cultures from single conidia. The genomes sequences of *B. cinerea* B05.10 and T4 strains are publicly available (strain T4: <http://urgi.versailles.inra.fr/index.php/urgi/Species/Botrytis>; strain B05.10: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/). Standard procedures for culturing and maintaining of *B. cinerea* strains and mutants were carried out at 21°C with 16 h daylight per day whereas sclerotia formation was induced by culturing the strains in complete darkness. Cultures were done on malt agar medium (MA; 2 g l⁻¹ malt extract, 2 g l⁻¹ yeast extract, 15 g l⁻¹ agar), and minimal medium (MM; 10 g l⁻¹ glucose, 2 g l⁻¹ NaNO₃, 500 mg l⁻¹ KH₂PO₄, 250 mg l⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, 250 mg l⁻¹ KCl, 1 mg l⁻¹ FeSO₄ 7H₂O, 469 mg l⁻¹ guanine, 15 g l⁻¹ agar). Estimation of growth rates and conidiation was examined on three different plates at 3, 6 and 10 days post-inoculation. Sensitivity to fenhexamid was established on mycelial growth on solid YSS medium (2 g L⁻¹ of yeast extract, 10 g L⁻¹ of glucose, 2 g L⁻¹ of KH₂PO₄, 1.5 g L⁻¹ of K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ of (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ of MgSO₄ 7H₂O) supplemented with fenhexamid (technical grade, kindly provided by Bayer CropScience SAS) at 0.5, 2 and 5 µg ml⁻¹. Plates were inoculated with 3 day-old unsporulated mycelial plugs and incubated at 20°C in the dark during 3–4 days. Resistant strains produced mycelium at fenhexamid concentrations up to 5 µg ml⁻¹, low resistant strains up to 2 µg ml⁻¹. Sensitive strains did not grow at these concentrations.

Identification and sequencing of the bikaverin gene cluster

Genomic DNA was extracted from fungal mycelium using a Sarcosyl-based protocol [49]. PCR reactions were done with the Silverstar *Taq* DNA polymerase (Eurogentec) except for the sequencing for which the *Pfu* high fidelity polymerase (Fermentas) was used. Gel electrophoresis, restriction enzyme digestion, Southern experiments were performed using standard protocols [50]. DNA probes were labeled by the random primer method using the ready-to-go DNA Labeling beads (Amersham) and 20 µCi α-³²P-dCTP. The bikaverin clusters of the pink strains 1750, 1787 and SEP159 were sequenced by designing PCR primers on basis of the B05.10 sequence (BROAD references BC1G_15238.1 to 15242.1; primers in Table S1). Seven overlapping PCR products ranging from 1.4 kb to 5.3 kb were obtained.

These fragments were purified with PEG8000 solution (26.2% polyethylene glycol 8000, 6.6 mM MgCl₂ and 0.6 M NaOAc) and double-strand sequenced at the INRA-BIOGER genotyping platform using a CEQ8000 capillary sequencing system (Beckman Coulter). In order to investigate the genomic region downstream of *bcbik2*, several rounds of TAIL (thermal asymmetric interlaced)-PCR were performed as described in Liu et al. [26]. The designed trios of successive forward primers are indicated in Table S1. Sequences of *bcbik1* to *bcbik6* of the strain 1750 have been deposited at EMBL (accession numbers HE802545 to HE802550).

Chemical identification of bikaverin

B. cinerea strains 1750 and 1787 were grown in liquid malt medium for one week. The red pigment was extracted with dichloromethane and purified using TLC. MS using direct injection, electrospray ionization and positive detection allowed the attribution of a molecular weight of 382 through observation of both [M]⁺ (m/z 382) and [M+Na]⁺ (m/z 425) ions. ¹H NMR spectrum (300 MHz in CDCl₃) revealed the highly substituted aromatic structure of this compound through the observation of only three aromatic resonances at respectively 6.39 (s), 6.8 (bs) and 6.97 (bs) ppm but also the presence of three methoxy groups, two of which corresponding to methoxy groups (3.92 and 3.96 ppm), the third one being characteristic of a methyl linked to an aromatic ring (2.85 ppm). Due to the low quantity of compound, only partial ¹³C data were obtained (75.5 MHz in CDCl₃) where some resonances of quaternary carbons were missing. Indeed, only three resonances were observed in the region of aromatic carbons bearing phenolic groups (164.5, 159.1 and 158.5 ppm) and only one in the carbonyl region (180.4 ppm). Nevertheless, resonances were also observed for the three methyl groups (56.8, 56.0 and 23.4 ppm) and three methine aromatic carbon (99.0, 112.5 and 117.9 ppm). Out of this data, the characteristic chemical shifts of 6.39 ppm for the proton and 98.9 ppm for the corresponding carbon were consistently in agreement for the presence of the peculiar 2-methoxy 1,4-*p*-quinonic moiety of bikaverin. These spectroscopic data are in good agreement with those of the already reported data of bikaverin [27–28].

For bikaverin analysis of two day-old cultures of *F. fujikuroi*, the culture fluids were filtered over a 0.2 µm-pore-size membrane filter (Millex; Millipore) and measured directly using high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) as previously described [39].

Phylogenetic analysis

Genes responsible for bikaverin biosynthesis in *F. fujikuroi* [14] were used to search for orthologues in fungal genomes available at the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) or at the BROAD institute (<http://www.broadinstitute.org>). For this purpose, similarity searches were run using the FfBIK proteins and the BLAST program. Orthology links were confirmed by using the orthoMCL version 1.4 program [51]. Protein sequences were aligned with the MUSCLE program, alignments were curated with the Gblock program, phylogenetic analyses were performed using the PhyML program and resulting tree were obtained with the TreeDyn program [52] (<http://www.phylogeny.fr>).

Sexual crosses and segregation analysis

Sexual crosses between *B. cinerea* strains were performed as described by Walker et al. [31]. Parental strain were cultured at 17°C, in the dark, on MA medium for two weeks and then incubated for one month at 4°C, to induce the formation of microconidia and sclerotia. We mixed three to six sclerotia with 1 ml of microconidia suspension in transparent 24-well microtiter

plates. SAS405 and SAS56 are reference strains for MAT1-1 and MAT1-2 mating types, respectively [33]. Cross preparations were stored at 10°C, in 16 h photoperiod conditions, until apothecia developed. Single ascospore-colonies were then isolated by dissecting the apothecia in sterile water and by spreading the ascospores on MM. The ascospore isolates were tested for production of the red pigment on MM, their resistance to fenhexamid and the presence of *bcik6* and *bcik1* by using the primer couples Bik1-F6/Bik1-R6 and Bik-F1/Bik-R1 in a diagnostic PCR (Table S1 and Table S3). Sexual recombination among the offspring was assessed by determining the mating-type of each individual using the forward primer MatF and the specific reverse primers Mat1-1R and Mat1-2R (Table S1 and Table S3).

Functional characterization of BcVEL1 in the pink strain 1750

Recently, *bcvel1* encoding one of the four fungal-specific VELVET proteins of *B. cinerea* was inactivated by a replacement approach in the wild-type strain B05.10 (mutants are in the following designated as B05.10: $\Delta bcvel1$) [32]. The same deletion construct comprising a hygromycin resistance cassette that is flanked by 5' and 3'-noncoding regions of *bcvel1* was used for deletion of *bcvel1* in the pink strain 1750. For that, the replacement construct (3,419 bp) was amplified using primers *bcvel1*-5F and *bcvel1*-3R (Table S1) and transformed into protoplasts of strain 1750 as described previously [53]. Hygromycin-resistant colonies were transferred to agar plates containing Gamborg's B5 medium (Duchefa Biochemie BV, The Netherlands) supplemented with 2% glucose, 0.1% yeast extract and the respective selection agent in a concentration of 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Single conidial transformants were obtained by spreading conidial suspensions on selective media and transferring single colonies to new plates. Homologous integration events in hygromycin-resistant transformants were detected by diagnostic PCR using the primers pCSN44-trpC-T and pCSN44-trpC-P, binding in the hygromycin resistance cassette and the primers *bcvel1*-hi5F and *bcvel1*-hi3R, binding upstream and downstream of the *bcvel1* flanking regions. Single spore transformants were screened for the absence of the *bcvel1* allele by using primers *bcvel1*-WT-F and *bcvel1*-WT-R matching the substituted coding region of *bcvel1*. In summary, two independent deletion mutants of *bcvel1* (T1 and T8) in the 1750 background (designated as 1750: $\Delta bcvel1$) were generated that exhibited the same phenotype. Therefore, the data for one transformant (T8) obviously lacking the *bcvel1* transcript, are presented in Fig. 4. Media for cultivation of *B. cinerea* strains were synthetic complete medium (CM) pH 5 [54], CM pH 7.5 supplemented with 0.01% (w/v) of the pH indicator bromothymol blue for detection of oxalic acid secretion, and modified Czapek Dox (CD) medium pH 5 containing 20 g L⁻¹ sucrose, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ KCl, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, and 3 g L⁻¹ NaNO₃ as nitrogen source for detection of melanin formation (CD-M) or 4 g L⁻¹ NH₄NO₃ as nitrogen source for detection of bikaverin formation (CD-B). Solid media were supplemented with 15 g L⁻¹ agar. For studying gene expression by northern blot analyses, the strains were grown for 3 days on CD-B agar with cellophane overlays in continuous darkness at 20°C. Total RNA was isolated making use of the TRIzol reagent (Invitrogen, The Netherlands). Samples (25 μg) of total RNA were transferred to Hybond-N+ membranes after electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel containing formaldehyde, according to the method of Sambrook et al. [50]. Blot hybridizations with random-primed α -³²P-dCTP-labelled probes were performed as previously described [55].

Expression *bcik4* and *bcik5* in respective *F. fujikuroi* *ffbik* deletion mutants

For generation of complementation constructs, the open reading frames of *bcik4* (981 bp) and *bcik5* (2,366 bp) were amplified from genomic DNA of the gray strain B05.10 using primer pairs *bcik4*-PoliC-F/*bcik4*-Tgluc-R and *bcik5*-PoliC-F/*bcik5*-Tgluc-R, respectively. Primers comprised extensions facilitating yeast recombinational cloning: thus, the PCR fragments were assembled with plasmid pNDN-OGG [53] digested with *Nco*I and *Not*I, yielding vectors pNDH-OB4G and pNDH-OB5G containing *bcik4* or *bcik5* under control of the constitutive *OliC* promoter from *Aspergillus nidulans* and the *gluc* terminator from *B. cinerea*.

The nourseothricin-resistant mutants *F. fujikuroi* $\Delta ffbik4$ and $\Delta ffbik5$ [14] were transformed with plasmids pNDH-OB4G and pNDH-OB5G, respectively, mediating the resistance to hygromycin (Table 2). Preparation and transformation of *F. fujikuroi* protoplasts was carried out as previously described [56]. Protoplasts were regenerated at 28°C in regeneration agar (0.7 M sucrose, 0.05% yeast extract, 0.1% casamino acids) supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin B. Random integration of the plasmids containing the *B. cinerea* genes were verified by PCR using primers *PoliC*-sF2 and *Tgluc*-sR2 spanning the open reading frames of *bcik4* and *bcik5*.

For submerged cultures, *F. fujikuroi* was pre-incubated at 28°C and 190 rpm for 72 h in 100 ml of Darcken medium [57]. For detection of bikaverin production, 0.5 ml of the pre-culture was used to inoculate 100 ml of ICI media [58] containing 6 mM glutamine (10% ICI medium), and incubated at 28°C and 190 rpm for up to five days.

Virulence tests

Infection assays of *B. cinerea* WT strains and mutants were done by inoculating mycelium or conidia on French bean (*Phaseolus vulgaris*, Caruso cultivar) grown in a climatic chamber. For mycelium test, leaves were harvested from 2 weeks plants and placed in a transparent plastic box lined with tissue moistened with water. Leaves were inoculated with 1.8 mm diameter-plugs of 3 days old mycelium obtained on MA medium. Storage boxes containing inoculated leaves were incubated in a growth cabinet at 21°C with 16 h daylight. Disease development on leaves was recorded daily as radial spread from the inoculation point to the lesion margin. Pathogenicity assays on leaves were repeated three times using at least five leaves per assay. For conidial tests, living *P. vulgaris* plants were used. Conidia were re-suspended in Gamborg's B5 medium supplemented with 2% glucose and 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6.4. Droplets (7.5 μl) of conidial suspensions (2×10^5 conidia/ml) were used for inoculation. Plants were incubated in plastic propagator boxes at 20°C under natural illumination and humid conditions.

Supporting Information

Figure S1 Comparative phylogenies of BIK1 to BIK6. Alignments of the protein sequences were performed using the PhyML program [52]. *Maximum likelihood* phylogenies from alignments of the protein sequences were estimated using the PhyML program with the substitution model WAG and a number of bootstraps of 100 [52] (<http://www.phylogeny.fr>). The last tree is based on the concatenated proteins BIK1 to BIK6. Selected proteins are from the pink *B. cinerea* strain 1750 (EMBL: HE802550, HE802545, HE802546, HE802547, HE802549, HE802548), *F. fujikuroi* (GenBank: CAB92399.1, CAJ75275.1, CAJ75274.1, CAM90598.1, CAM90597.1, CAM90596.1), *F. oxysporum* (BROAD: FOXG_04757.3, FOXG_04756.3,

FOXG_04755.3, FOXG_04754.3, FOXG_04753.3, FOXG_04752.3), *F. verticilloides* (BROAD: FVEG_03379.3, FVEG_03380.3, FVEG_03381.3, FVEG_03383.3, FVEG_03382.3, FVEG_03384.3). Protein sequences from *A. niger* (JGI: ANG51499, ANG190154, ANG185884, ANG189113, ANG130183, ANG172695) were used to root the trees. (TIFF)

Figure S2 Alignment of *bce1l* sequences from the pink strains 1750 and 1787 and the gray strains B05.10 and T4. Nucleotide sequences were aligned using Lasergene's MegAlign (DNASTAR). SNPs that resulted in stop mutations (T4 and 1750) are indicated in blue, in silent mutations in green (1750 and 1787) and SNPs that lead to an amino acid exchange (1787) are indicated in red. GenBank accession numbers are: *bce1l*^{B05.10} (GenBank: HE977589), *bce1l*^{T4} (GenBank: HE977590), *bce1l*¹⁷⁵⁰ (GenBank: HF549030), *bce1l*¹⁷⁸⁷ (GenBank: HF549031). (TIFF)

Table S1 Oligonucleotidic primers used for diagnostic PCR, sequencing, Tail-PCR and cloning. (DOCX)

Table S2 Screening for the presence of *BcBIK1* and *BcBIK6* genes in different *Botrytis* strains using PCR. (DOCX)

References

- Hoffmeister D, Keller NP (2007) Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep* 24: 393–416.
- Fox EM, Howlett BJ (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr Opin Microbiol*. 11:481–487.
- Osbourn A (2010) Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet* 26: 449–457.
- Soanes DM, Richards TA, Talbot NJ (2007) Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: what can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? *Plant cell* 19: 3318–3326.
- Anselem J, Cuomo CA, van Kan JA, Viaud M, Benito EP, et al. (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 7: e1002230.
- Walton JD (2000) Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal Genet Biol* 30: 167–171.
- Palmer JM, Keller NP (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr Opin Microbiol* 13: 431–436.
- Bayram O, Braus GH (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* 36: 1–24.
- Khalidi N, Collemare J, Lebrun MH, Wolfe KH (2008) Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome Biol* 9: R18.
- Slot JC, Rokas A (2011) Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolite gene cluster between fungi. *Current Biol* 21: 134–139.
- Lawrence DP, Kroken S, Pryor BM, Arnold AE (2011) Interkingdom gene transfer of a hybrid NPS/PKS from bacteria to filamentous Ascomycota. *PLoS One* 6: e28231.
- Balan J, Fuska J, Kuhr I, Kuhrova V (1970) Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. *Folia Microbiol (Praha)* 15: 479–484.
- Limon MC, Rodriguez-Ortiz R, Avalos J (2010) Bikaverin production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 21–29.
- Wiemann P, Willmann A, Straeten M, Kleigrewe K, Beyer M, et al. (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol* 72: 931–946.
- Son SW, Kim HY, Choi GJ, Lim HK, Jang KS, et al. (2008) Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *J Appl Microbiol* 104: 692–698.
- Choi YE, Brown JA, Williams CB, Canales LL, Shim WB (2008) GAC1, a gene encoding a putative GTPase-activating protein, regulates bikaverin biosynthesis in *Fusarium verticilloides*. *Mycologia* 100: 701–709.
- Kohut G, Olah B, Adam AL, Garcia-Martinez J, Hornok L (2010) Adenylyl cyclase regulates heavy metal sensitivity, bikaverin production and plant tissue colonization in *Fusarium proliferatum*. *J Basic Microbiol* 50: 59–71.
- Malz S, Grell MN, Thrane C, Maier FJ, Rosager P, et al. (2005) Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genet Biol* 42: 420–433.
- Linnemannstons P, Schulte J, del Mar Prado M, Proctor RH, Avalos J, et al. (2002) The polyketide synthase gene *pkS4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key

Table S3 Phenotypes and genotypes of 1750 × SAS405 progeny. (DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to Annick Arnold and Lucien Kerhuas (INRA, Versailles, France) for their contribution to the identification of bikaverin in *B. cinerea*, to Patrick Yeboah (INRA, Grignon, France) for his technical help with progeny analysis, Linda Beckmann and Anne Viehues (WWU Münster, Germany) for their help with *bce1l* mutants screens, Kathleen Huß (WWU Münster) for generation and screening of *F. fujikuroi* mutants and Damien De Vienne (Bioinformatics and Genomics Program, Barcelona, Spain) for his help with the phylogeny analyses. We also thank David Cane (Brown University, USA) for his critical reading of the manuscript and Christel Leyronas (INRA, Avignon, France) and Themis J. Michailides (University of California, USA) for providing the SEP159 and the four TM strains, respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JS AG SF PL BT MV PHD. Performed the experiments: JS AG GM PLP SA SF PL BT MV LS. Analyzed the data: JS AG GM PLP SA SF PL BT MV LS PHD. Wrote the paper: JS SF PL BT MV PHD.

- enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genet Biol* 37: 134–148.
- Heald FD, Sprague R (1926) A spot rot of apple caused by *Botrytis*. *Phytopathology* 16: 485–488.
- Barnes B (1930) Variations in *Botrytis cinerea*, Pers., induced by the action of high temperatures. *Ann Bot* 44: 825–858.
- Grindle M (1979) Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J Gen Microbiol* 111: 109–120.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, et al. (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag Sci* 58: 876–888.
- Kroken S, Glass NL, Taylor JW, Yoder OC, Turgeon BG (2003) Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15670–15675.
- Campbell MA, Rokas A, Slot JC (2012) Horizontal Transfer and death of a fungal secondary metabolic gene cluster. *Genome Biol Evol*. 4: 289–293.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8: 457–463.
- Cornforth JW, Ryback G, Robinson PM, Park D (1971) Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin). *J Chem Soc Perkin* 1. 16: 2786–788.
- de Boer JJ, Bright D, Dallinga G, Hewitt TG (1971) Crystal and molecular structure of the chloroform solvate of bikaverin. *J Chem Soc Perkin* 1. 16: 2788–791.
- Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, et al. (2011) Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol Biol* 11: 322.
- Staats M, van Baarlen P, van Kan JA (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol Biol Evol* 22: 333–346.
- Walker AS, Gautier AL, Confais J, Martinho D, Viaud M, et al. (2011) *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101: 1433–1445.
- Schumacher J, Pradier JM, Simon A, Traeger S, Moraga J, et al. (2012) Natural variation in the VELVET gene *bce1l* affects virulence and light-dependent differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS One* 7(10): e47840.
- Faretra F, Antonacci E, Pollastro S (1988) Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *J General Microbiol* 134: 2543–2550.
- Gao Q, Garcia-Pichel F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Rev Microbiol* 9: 791–802.
- Butler MJ, Day AW (1998) Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 44: 1115–1136.
- Doss RP, Deisenhofer J, Krug von Nidda HA, Soeldner AH, McGuire RP (2003) Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63: 687–691.

37. Zeun R, Buchenauer H (1985) Effect of tricyclazole on production and melanin contents of sclerotia of *Botrytis cinerea*. J Phytopathol 112: 259–267.
38. Musavi MA, D'yakov YUT, Chaika MN (1991) Effect of tricyclazol on the formation of sclerotia by the fungi *Botrytis cinerea* Pers and *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. Appl Biochem Microbiol 27: 255–260.
39. Studt L, Wiemann P, Kleigrewe K, Humpf HU, Tudzynski B (2012) Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. Appl Environ Microbiol 78: 4468–4480.
40. Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, et al. (2008) VeB/VeA/LacA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. Science 320: 1504–1506.
41. Wu D, Oide S, Zhang N, Choi MY, Turgeon BG (2012) ChLae1 and ChVel1 Regulate T-toxin Production, Virulence, Oxidative Stress Response, and Development of the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. PLoS Pathogens 8: e1002542.
42. Merhej J, Urban M, Dufresne M, Hammond-Kosack KE, Richard-Forget F, et al. (2011) The velvet gene, *FgVe1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. Mol Plant Pathol 13: 363–374.
43. Jiang J, Liu X, Yin Y, Ma Z (2011) Involvement of a Velvet Protein FgVeA in the Regulation of Asexual Development, Lipid and Secondary Metabolisms and Virulence in *Fusarium graminearum*. PLoS One 6: e28291.
44. Choi Y-E, Goodwin SB (2011) MVE1, encoding the Velvet gene product homolog in *Mycosphaerella graminicola*, is associated with aerial mycelium formation, melanin biosynthesis, hyphal swelling, and light signaling. Appl Environ Microbiol 77: 942–953.
45. Mukherjee PK, Kenerley CM (2010) Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vel1. Appl Environ Microbiol 76: 2345–2352.
46. Debieu D, Bach J, Hugon M, Malosse C, Leroux P (2001) The hydroxylanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Pest Manag Sci 57: 1060–1067.
47. Albertini C, Leroux P (2004) A *Botrytis cinerea* putative 3-keto reductase gene (ERG27) that is homologous to the mammalian 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene (17 β -HSD7). Eur J Plant Pathol 110: 723–733.
48. Fillinger S, Leroux P, Auclair C, Barreau C, Al Hajj C, et al. (2008) Genetic analysis of fenhexamid-resistant field strains of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Antimicrob Agents Chemother 52: 3933–3940.
49. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version 2. Plant Mol Biol Rep 1: 19–21.
50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
51. Li L, Stoekert CJ Jr., Roos DS (2003) OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome Res 13: 2178–2189.
52. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, et al. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res 36: W465–469.
53. Schumacher J (2012) Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. Fungal Genet Biol 49: 483–497.
54. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AW (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv Genet 5: 141–238.
55. Siewers V, Smedsgaard J, Tudzynski P (2004) The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. Appl Environ Microbiol 70: 3868–3876.
56. Tudzynski B, Homann V, Feng B, Marzluf GA (1999) Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. Mol Gen Genet 261: 106–114.
57. Darken MA, Jensen AL, Shu P (1959) Production of gibberellic acid by fermentation. Appl Microbiol 7: 301–303.
58. Geissman TA, Verbiscar AJ, Phinney BO (1966) Studies on the biosynthesis of gibberellins from (–) kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*. Phytochemistry 5: 933–947.
59. Quidde T, Büttner P, Tudzynski P (1999) Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. Eur J Plant Pathol 105: 273–283.

Résumé

La pourriture grise est une maladie qui affecte de nombreuses cultures dont la vigne. Elle est provoquée par un complexe de deux espèces fongiques, l'espèce majoritaire *Botrytis cinerea* et l'espèce minoritaire *Botrytis pseudocinerea*. Les deux espèces se distinguent par leur sensibilité à certains fongicides notamment au fenhexamid, inhibiteur de la 3-cétoréductase des stérols. Ce fongicide a un spectre d'action restreint aux espèces phylogénétiquement proches du genre *Botrytis* (*Sclerotinia* et *Monilinia fructicola*). Son utilisation a conduit à la sélection de souches résistantes parmi lesquelles on distingue trois phénotypes : le phénotype HydR1 correspond à l'espèce *B. pseudocinerea* naturellement résistante ; les phénotypes HydR2 et HydR3 correspondent à l'espèce *B. cinerea* ayant acquis la résistance suite à l'introduction du fongicide. L'objet de cette thèse est l'étude des phénotypes HydR1 et HydR2 présents à de faibles, voire très faibles fréquences dans des populations de pourriture grise.

Chez *B. pseudocinerea* (HydR1), nous avons identifié une monooxygénase à cytochrome P450 nommée Cyp684 responsable de la résistance au fenhexamid. Le gène *cyp684* montre des polymorphismes (structure et séquence nucléotidique) entre les espèces ainsi qu'une induction par le fenhexamid chez *B. pseudocinerea*. La comparaison de la séquence du gène *cyp684* chez plusieurs espèces de *Botrytis* et de leurs niveaux de résistance au fenhexamid indique que les acides aminés polymorphes de la protéine Cyp684 sont responsables de la résistance au fenhexamid chez *B. pseudocinerea*. Le rôle connu des monooxygénase à cytochrome P450 dans la métabolisation des xénobiotiques et la synergie entre le fenhexamid et des inhibiteurs de monooxygénases à P450 suggèrent que Cyp684 soit impliqué dans la métabolisation du fenhexamid. Concernant le phénotype HydR2 de *B. cinerea*, le mécanisme de résistance reste à identifier. Les souches HydR2 se distinguent par leur phénotype rose dû à un métabolite secondaire nommé bikavérine. Le génotypage réalisé sur les descendantes d'un croisement entre une souche HydR2 et une souche sensible a mis en évidence un lien physique entre le gène ou l'allèle *hydR2* et le cluster bikavérine. Afin d'identifier la niche écologique et de comprendre l'épidémiologie de *B. pseudocinerea*, nous avons développé une méthode de qPCR espèce spécifique, nommée « *B. pseudocinerea* allele specific PCR » (BpASP). Cet outil permettra de détecter et de quantifier l'espèce *B. pseudocinerea* dans les populations de *Botrytis*, selon la saison, la région géographique et les plantes hôtes.

Abstract

Grey mold is a fungal disease affecting many crops including grapevine. It is generated by a species complex of two fungal species, the major one, *Botrytis cinerea*, and the minor species, *Botrytis pseudocinerea*. Both species differ by their sensitivity to several fungicides, in particular to fenhexamid, a potent inhibitor of sterol 3-ketoreductase. This fungicide has a narrow spectrum of activity limited to species closely related to the genus *Botrytis* (e.g., *Sclerotinia* and *Monilinia fructicola*). Fenhexamid applications have led to the selection of resistant strains with three different phenotypes: the HydR1 phenotype corresponds to the naturally resistant species *B. pseudocinerea*; HydR2 and HydR3 phenotypes correspond to *B. cinerea* strains that acquired resistance after the introduction of fenhexamid. The topic of this thesis is the study of the phenotypes HydR1 and HydR2 present at low or even very low frequencies in grey mold populations.

We identified a cytochrome P450 monooxygenase named Cyp684 responsible for resistance to fenhexamid in *B. pseudocinerea* (HydR1). The *cyp684* gene differs between both species in its gene structure, nucleotide sequence (polymorphisms) and expression. The comparison of *cyp684* sequences among different *Botrytis* species and their resistance levels to fenhexamid indicate the polymorphic amino acids of the Cyp684 protein to be responsible for fenhexamid resistance in *B. pseudocinerea*. The known involvement of cytochrome P450s in xenobiotic metabolism and synergy between fenhexamid and P450-inhibitors suggest that Cyp684 could be involved in fenhexamid metabolism. Concerning the *B. cinerea* HydR2 phenotype, the resistance mechanism remains to be identified. HydR2 strains have a specific purple pigmentation due to the secondary metabolite bikaverin. Genotyping of progeny derived from a cross between a HydR2 and a sensitive strain revealed a physical link between the *hydR2* gene or allele and the gene cluster involved in bikaverin biosynthesis. In order to identify the ecological niche of *B. pseudocinerea* and its epidemiological behavior we developed a species-specific qPCR method named "*B. pseudocinerea* allele specific PCR" (BpASP). This tool will allow detecting and quantifying the species *B. pseudocinerea* in natural *Botrytis* populations, collected according to season, geographic origin or plant hosts.