



**HAL**  
open science

# Durabilité de l'efficacité de méthodes de lutte contre les champignons phytopathogènes

Marc Bardin

► **To cite this version:**

Marc Bardin. Durabilité de l'efficacité de méthodes de lutte contre les champignons phytopathogènes. Mycologie. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2012. tel-02809403

**HAL Id: tel-02809403**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02809403v1>**

Submitted on 6 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.

Université de Montpellier 2  
Sciences et techniques du Languedoc  
Académie de Montpellier

Dossier scientifique présenté en vue d'obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches  
(Spécialité Sciences de la vie)

Par :

**Marc BARDIN**

Chargée de Recherches INRA

UR 407 Pathologie Végétale, INRA - Avignon, Centre de Recherche PACA

Durabilité de l'efficacité de méthodes de lutte contre les  
champignons phytopathogènes

Soutenu le 14 septembre 2012

## Jury

Fabienne Bailleul	Professeur Université de Reims	Rapporteur
Eric Galiana	Directeur de Recherche INRA, Sophia-Antipolis	Rapporteur
Didier Tharreau	Chercheur CIRAD, Montpellier	Rapporteur
Miguel Ferber-Lopez	Professeur Ecole des Mines d'Alès	Examineur
Marc-André Sélosse	Professeur Université de Montpellier	Examineur



Durabilité de l'efficacité de méthodes de lutte contre les champignons phytopathogènes de BARDIN Marc est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 3.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/).



## Remerciements

Merci à tous ceux qui ont contribué à ces travaux, collaborateurs et personnel permanent ou temporaire de l'Unité de Pathologie Végétale d'Avignon.

Merci à l'ensemble du personnel technique présent ou passé du labo de Mycologie, Claire, Corinne, Géraldine, Gisèle, Magali, pour son efficacité, son aide et son soutien. Merci à Philippe avec qui je partage mon quotidien de chercheur à Avignon depuis le début (déjà 20 ans !). Merci chers Mistraliens pour tous les bons moments passés ensemble. C'est pour moi toujours un vrai plaisir de venir au labo tous les matins.

Merci à tous les étudiants qui m'ont accompagné, poussé et aidé à avancer. Et un merci tout particulier à Sakhr avec qui j'ai passé 4 années magiques.

Merci à l'ensemble du personnel de l'Unité pour votre aide quotidienne efficace et indispensable, en particulier pour la production annuelle de milliers de plantes, pour réussir la prouesse de maintenir en état de marche notre bonne vieille CC6, pour nous rendre la vie plus simple pour nos déplacements, lors de l'arrivée de stagiaires ou pour la justification de contrats (ah VALORT !), pour faire fonctionner mon ordinateur portable presque sans problème et pour votre aide dans vos différents domaines d'expertise de la microscopie à la bibliographie.

Merci aux nombreux collègues avec qui j'ai eu l'opportunité de collaborer et au groupe des HDRs anonymes d'Avignon qui m'a poussé à aller jusqu'au bout de la démarche.

Merci aux rapporteurs et membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements seraient incomplets si je ne faisais pas mention de mes amis de Chateaurenard et d'ailleurs, Gilles et Rob, les théâtraux, les guitaristes, les cyclistes et tous les autres pour tous les bons moments partagés en dehors de ma vie de chercheur...

Enfin un grand merci à ma famille, en premier lieu Sylvie, Camille et Charlotte pour leur soutien permanent et leur patience et à mon père pour avoir trouvé le temps entre un 'Ourson' et un 'Arolle' de relire ce manuscrit.



## Sommaire

Curriculum vitae	1
Activités d’animation de la recherche, d’encadrement et responsabilités collectives	3
Liste des productions scientifiques	11
<b>Synthèse des activités de recherche</b> : Durabilité des méthodes de lutte contre les champignons phytopathogènes	21
1. Résumé du parcours scientifique et contexte général des travaux de recherche	21
2. Durabilité de la lutte génétique contre les oidiums et les rouilles	25
2.1. Diversité phénotypique et génétique des oidiums des cultures maraichères	25
2.2. Sélection stabilisatrice dans une population de <i>Puccinia coronata</i>	29
2.3. Conclusion	31
3. Durabilité de la protection biologique contre <i>Botrytis cinerea</i>	33
3.1. Développement d’outils tactiques et mobilisation dans des stratégies de protection intégrée	34
3.2. Evaluation fonctionnelle du risque de contournement de la protection biologique par <i>B. cinerea</i>	37
3.3. Dynamique de la pression d’inoculum de <i>B. cinerea</i>	47
3.4. Conclusion	51
<b>Projet de recherche</b>	53
1. Durabilité de la protection biologique contre les agents phytopathogènes	54
2. Perspectives de protection biologique par conservation	59
<b>Références</b>	65
<b>Annexe</b> : quelques publications	69



## Curriculum vitae

### Marc BARDIN

INRA - UR407 Pathologie Végétale  
Domaine Saint-Maurice - BP94  
84140 Montfavet - France  
Tel: 04 32 72 28 55 - Fax: 04 32 72 28 42  
[marc.bardin@avignon.inra.fr](mailto:marc.bardin@avignon.inra.fr)  
[http://www4.paca.inra.fr/pathologie vegetale](http://www4.paca.inra.fr/pathologie_vegetale)

Né le 26 mai 1966 à Lyon 6°  
Nationalité française ; marié, 2 enfants  
Service national: service de santé des armées - Besançon (1990-91)

### DIPLOMES

---

- 1996 Doctorat de Phytopathologie, Université Claude Bernard, Lyon - INRA, Pathologie Végétale, Avignon. Mention très honorable avec félicitations du jury.
- 1992 D.E.A. d'Ecologie Microbienne, Option "Sol et Eau", Université Claude Bernard, Lyon. Mention bien.
- 1990 Diplôme d'Ingénieur en Microbiologie Industrielle et Appliquée, Université de Provence, Marseille. Mention bien.
- 1987 DUT Biologie Appliquée option Agronomie, Université Claude Bernard, Lyon
- 1985 Baccalauréat C, Lyon

### EXPERIENCES DE RECHERCHE

---

- Depuis 1998 Chargé de Recherches (CR1 depuis août 2001), Unité de Pathologie Végétale, INRA-Avignon. Maladies cryptogamiques des plantes: connaissance de la biologie des pathogènes et mise au point de méthodes de lutte durables.
- 1996-97 Chercheur post-doctoral, Cereal Disease Laboratory, USDA-ARS, Université du Minnesota, St Paul, Minnesota. 'Selection in relation to virulence polymorphism in *Puccinia coronata* populations and adaptation to partially resistant oat cultivars'. Directeur Scientifique: K.J. Leonard.
- 1992-96 Attaché Scientifique Contractuel pour la préparation de la thèse de Doctorat; Unité de Pathologie Végétale, INRA-Avignon. 'Diversité phénotypique et génétique des oïdiums des cucurbitacées, *Sphaerotheca fuliginea* et *Erysiphe cichoracearum*'. Directeur de thèse: J.M. Lemaire.
- 1991-92 Stage de DEA; Laboratoire de Microbiologie des Sols, INRA-Dijon, (financement Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). 'Isolement et identification de souches de *Rhizobium leguminosarum* à partir d'un sol'. Directeurs Scientifiques: G. Laguerre et N. Amarger.



- 1990 Stage d'ingénieur; Département Biotechnologie et Environnement, Institut Français du Pétrole, Rueil-Malmaison. 'Estérification enzymatique en milieu organique : rôle de l'eau et influence du conditionnement de l'enzyme'. Directeur Scientifique: F. Monot
- 1989 Stage de Maitrise, Département de Microbiologie, Université de Wageningen, Pays Bas. 'Microbiological degradation of hydrocarbons in soil'. Responsables: A Zenhden et G. Schraa
- 1988 Stage de Licence, laboratoire régional d'hygiène appliquée, Institut Pasteur de Lyon. 'Analyses microbiologiques des eaux'. Responsable: M. Geoffray
- 1987 Stage de DUT 2<sup>ème</sup> année, département GAP, INRA-Dijon. 'Utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique pour l'amélioration de la féverole'. Responsable: G. Duc
- 1986 Stage de DUT 1<sup>ère</sup> année, Laboratoire de symbiote des racines, INRA-Montpellier. 'Caractérisation et dénombrement de bactéries symbiotiques (genre *Rhizobium*)'. Responsable: J.C. Cleyet-Marel

## FORMATIONS

---

- Radioprotection, INRA-Avignon (1j, 1996)
- Membre de jury de concours externes (2j, 1998 ; 2j, 2004) et président de jury de concours externes (2j, 2006)
- Participer activement à un projet Européen, INRA-Paris (2j, 2000)
- Ecole chercheur 'génétique des populations' - Montpellier (5j, 2002)
- Assurance Qualité en Recherche (2j, 2002)
- Outils de bibliographie (1j, 2003)
- Statistique et utilisation des logiciels SAS et R (10j, 2003 ; 6j, 2008)
- PCR quantitative (2j, 2008)
- Animation d'équipe et gestion des conflits (3j, 2010)

## Activités d'animation de la recherche, d'encadrement et responsabilités collectives.

### ACTIVITE D'ENCADREMENT

---

#### Doctorants

- Suliman, M. E. 2002. Powdery mildew of pepper (*Capsicum annuum* L.) caused by *Leveillula taurica* in the Sudan: epidemiology and control. PhD Faculty of Agricultural Sciences, University of Gezira, Sudan, Wad Medani. (coencadrement P. Nicot)  
Muna est maintenant enseignante-chercheure à l'Université de Wad Medani au Soudan.
- Ajouz, S. 2009. Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de doctorat de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, France. (coencadrement M. El Maâtaoui)  
Sakhr est maintenant Chargé de Recherche au Centre de Recherche Agronomique de Lattaquié en Syrie.

#### Stagiaires de Master

- Fine C. 1995. Diversité phénotypique d'une population d'isolats de *Sphaerotheca fuliginea*: résistance aux fongicides. DEA Ecologie Microbienne, Université Lyon I, Villeurbanne.
- Herrera A. 2001. Développement de techniques adaptées à l'étude moléculaire des mécanismes d'action impliqués dans la protection de la tomate contre *Botrytis cinerea* par deux champignons antagonistes. Maitrise Biologie et Chimie Végétale, Université Lyon I, Villeurbanne.
- Caddoux L. 2004. Étude de la durabilité de la lutte biologique contre *Botrytis cinerea*. Maitrise Biologie et Chimie Végétale, Université Lyon I, Villeurbanne.
- Orny F. 2008. Evaluation de la capacité d'adaptation de *Botrytis cinerea* aux agents de lutte biologique agissant par compétition nutritive. Master Gestion de la Qualité des Productions Végétales, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon.
- Wachter L. 2009. Development of miniaturised tests to determine the fungitoxicity of a plant defence compound. Master in de biowetenschappen: landbouwkunde. Katholieke Hogeschool Kenpen, Geel, Belgique. (coencadrement P. Nicot)
- Lenaerts R. 2010. Efficacy of biopesticides for the protection of Tomato and Lettuce against key pathogens. Master in de biowetenschappen: landbouwkunde. Katholieke Hogeschool Kempen Geel, Belgique. (coencadrement P. Nicot)
- Comby M. 2011. Relation entre l'agressivité des souches de *Botrytis cinerea* et l'efficacité de la protection biologique conférée par deux agents de lutte biologique. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage. Master Horticulture, Agrocampus-Ouest, Angers.

- Kryzaniak Y. 2012. Etude du mode d'action de l'agent de protection biologique *Microdochium dimerum* sur tomate. Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux - Gestion Intégrée des Agro-systèmes et de Paysages, Gradignan.
- Dorrieux E. 2012. Vers des stratégies novatrices de lutte contre des agents phytopathogènes à travers la caractérisation de leurs compromis adaptatifs. Master Gestion de la Qualité des Productions Végétales, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon.

#### Stagiaires Bac+2 et Bac+3

- Descroix L. 1996. L'oïdium des cucurbitacées: germination, résistance aux fongicides et virulence des souches. BTS Anabiotec, St-Genis-Laval.
- Henry S. 1998. Les oïdiums des cucurbitacées: recherche d'une méthode de conservation à long terme des isolats et génétique de la résistance du melon. Licence de Biochimie, Université de Besançon.
- Herrera A. 1999. Les oïdiums des cultures maraichères: génétique de la résistance du melon et recherche d'une méthode de conservation à long terme des isolats. IUT Génie Biologique, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Dupuy L. 2000. L'oïdium de la tomate : étude de la sensibilité d'une population d'isolats d'*Oidium lycopersicum* au Milsana. IUT Génie Biologique, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Guigue F. 2001. *Sphaerotheca fuliginea* agent responsable de l'oïdium sur melon: détermination et répartition des races, virulence et agressivité des souches. BTS Anabiotec, St-Genis-Laval.
- Cerniaud D. 2002. *Microdochium dimerum*, agent de lutte biologique contre *Botrytis cinerea* sur tomate: étude des mécanismes d'action de ce champignon antagoniste. BTS Anabiotec, St-Genis-Laval
- Perret I. 2003. *Microdochium dimerum*, agent de lutte biologique contre *Botrytis cinerea* sur tomate: conservation et mode d'action. BTS Anabiotec, St-Genis-Laval.
- Couston L. 2003. Protection intégrée de la tomate sous abri: étude de la compatibilité d'interventions phytosanitaires contre deux maladies aériennes et un ravageur à l'aide d'agents de lutte biologique. IUP Agrosociétés, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Ladvie P. 2003. Etude des mécanismes d'action de *Microdochium dimerum*, agent de lutte biologique contre *Botrytis cinerea* sur tomate. IUP Agrosociétés, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Thomas J. 2007. Durabilité de la lutte biologique contre *Botrytis cinerea* : résistance à un antibiotique produit par un agent de lutte biologique. Licence 3 Sciences de la Vie et de la Terre, UFR Sciences et Technologies, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Le Frêne F. 2010. Etude de la gamme d'hôtes de souches de *Botrytis cinerea*. Licence 3 Sciences de la Vie et de la Terre, option Agrosociétés, UFR Sciences et Technologies, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

- Blanchemain L. 2011. Agressivité et gamme d'hôtes de souches de *Botrytis cinerea*. Licence 3 Sciences de la Vie et de la Terre, option Agrosociétés, UFR Sciences et Technologies, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Del Vitto A. 2012. Caractérisation de populations de *Botrytis cinerea* prélevées sur laitues et tomates. IUT Biologie Appliquée option Agronomie, Université Claude Bernard Lyon 1.

#### Autres personnels :

- Y.F. Mohamed, chercheur Université de la Gezira, Wad-Medani, Soudan. 8 visites entre 1994 et 2006 (9 mois au total). Bourse du gouvernement Français gérée par EGIDE. Epidémiologie et contrôle des oïdiums des plantes maraichères : techniques de culture et de conservation des oïdiums des cucurbitacées et des solanacées maraichères, virulence de souches sur melon, sensibilité de souches aux fongicides, biologie moléculaire (extraction d'ADN, PCR). (Coencadrement avec P. Nicot)
- O. Calis, doctorant du laboratoire de J. Turner, University of East Anglia, Norwich, GB. 1999 (1 semaine). Convention d'échange international (ISIS) du BBSRC. Mise en culture sur cotylédons de *Lagenaria* de souches d'*Erysiphe* sp. pathogènes d'*Arabidopsis thaliana*.
- T. Jankovics, Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary. 3 visites en 2007, 2008 et 2009 (1 mois au total). Caractérisation moléculaire de souches d'*Ampelomyces quisqualis* - Projet INRA-MTA Budapest – HONGRIE. (Coencadrement avec P. Nicot)
- S. Servier. Ingénieur en CDD sur contrat ANR-Hortibiopé. 2009-2010 (12 mois). Evaluation de l'effet fongicide d'une molécule d'origine végétale. (Coencadrement avec P. Nicot)

#### **ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT**

- 
- Depuis 1994 Agrosociétés, Master 1 et 2 Gestion et Qualité des Productions Végétales, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 18 h/an de cours en moyenne Maladies cryptogamiques des plantes pérennes. Physiopathologie des interactions plantes-champignons. Déterminants du pouvoir pathogène des champignons. Variabilité des champignons pathogènes des plantes et durabilité des méthodes de lutte. Protection biologique contre les maladies des plantes. Induction des mécanismes de défense chez les plantes.
- Depuis 1998 IUT de Génie Biologique option Agronomie, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 12 h/an de Travaux Pratiques. Observer, isoler et identifier des champignons phytopathogènes à partir de plantes malades.
- Depuis 2008 accueil des étudiants de 1<sup>ère</sup> année d'Ingénieur AgroParisTech : exposé des thématiques scientifiques du laboratoire et visite d'essais (1 jour/an).

## PARTICIPATION A DES PROJETS SCIENTIFIQUES FINANCES

---

- Ecophyto2018, ONEMA, MAAP, 2012-2015 'Utilisation de micro-doses de Sucres en protection des plantes' (USAGE). Porteur du projet I. Arnaud (Université de Tours). **Animateur du groupe de travail 'Maraichage'**
- FP7-KBBE-2010-4, 2011-2015 'Pesticide Use-and-Risk Reduction in European farming systems with Integrated Pest Management' (PURE). Porteur du projet F. Lescourret (Avignon). **Animateur du WP 8.3 'Durabilité de la lutte biologique'**
- Interreg Alcotra Italie-France 2010-2012 'VALORisation des productions légumières Transfrontalières' (VALORT). Porteur du projet M. Baudino (CA Cuneo, Italie)
- FP6-2005-FOOD-4-A, 2007-2011, NoE, 'European Network for the Durable Exploitation of crop protection strategies' (ENDURE). Porteur du projet P. Ricci (Sophia Antipolis)
- ANR EmergenceBio 2009-2010 'Développement de biopesticides d'origine végétale pour l'horticulture: méthodes de production, spectre d'action et validation *in vivo* de l'efficacité des acides dicaféoylquiniques' (Hortibiope). Porteur du projet J.L. Poëssel (GAFL Avignon)
- AIP BioRessources 2009-2010 'Production de banques de microsattellites' (EcoMicro). Porteur du projet T. Malausa (Sophia Antipolis)
- Région PACA 2008 'Protection biologique contre *Botrytis cinerea* en cultures maraîchères sous abri'. Porteur du projet P. Nicot (PV Avignon)
- France-Hongrie 2007-2009 'Understanding the biology of a recently emerged plant pathogen, *Oidium neolycopersici*, and characterization of the most common mycoparasites of powdery mildews'. Porteur du projet P. Nicot (PV Avignon)
- SPE 2007-2008 'Durabilité de la lutte biologique contre les maladies: résistance de *Botrytis cinerea* aux agents de lutte biologique'. **Coordinateur du projet**
- ANR-ADD 2005-08, 'Viabilité des systèmes de cultures protégées dans un contexte d'agriculture durable' (ECOSERRE). Porteur du projet T. Boulard (URIH Sophia Antipolis). **Animateur du WP3 'Maitrise des flux biotiques'**.
- SPE 2005-2007 'Diversité génétique et facteurs structurants des populations du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, à différentes échelles spatiales'. Porteur du projet A.S. Walker (Bioger Versailles)
- SPE 2005-2006 'Identification d'habitats originaux et non agricoles de microorganismes phytopathogènes'. Porteur du projet C. Morris (PV Avignon)
- SPE 2003-2005 'Dynamique de la biodiversité de deux bioagresseurs polyphages'. Porteur du projet C. Morris (PV Avignon)
- AIP PIC Serre 2002-2004 'Production intégrée dans un système sous serre lourde. Applications sur tomate et rosier'. Porteur du projet T. Boulard (URIH Sophia Antipolis).
- ACTA Agriculture Biologique 1999-2001 'Lutte biologique à l'aide d'un champignon antagoniste contre plusieurs maladies aériennes des fruits, légumes, vigne et fleurs'. Porteur du projet P. Nicot (PV Avignon)

- CTPS 1998-2000 'méthodes de conservation à long terme des agents pathogènes et mise en place d'une collection de référence à la Station Nationale d'Essais de Semences (SNES) du GEVES'. Porteur du projet M. Guénard (SNES-GEVES Angers)
- CTPS 1998-2000 'Stabilité des résistances du melon aux oïdiums'. Porteur du projet M. Pitrat (GAFL Avignon)

## **PARTICIPATION A DES RESEAUX SCIENTIFIQUES**

---

- Groupe de travail sur les 'Oïdiums' (1993-2003). Organisation de la réunion annuelle à Avignon en 1995.
- Groupe de travail 'Populations de *Botrytis*' (2004-2008)
- Réseau du département SPE 'Induction de Résistance' (INDRES) sur les stimulateurs de défense naturelle des plantes (depuis 2010)
- Participation au RMT ELICITRA 'Comprendre, développer et promouvoir au sein des filières végétales les stratégies de stimulation de défense des plantes' (depuis 2011).
- Réseau Ecologie des Interactions Durables (REID, depuis 2006)
- Réseau inter-organismes de recherche 'Biodiversité et Ecologie Microbienne : stratégies d'échantillonnages dans les études de diversité microbienne' (1998-2002).

## **MISSIONS A L'ETRANGER**

---

- Centre Horticole Expérimental à Albenga, Université de Turin (Italie) dans le cadre d'un Projet Galilée (5j, 1994): "Recherche de moyens de lutte contre les oïdiums des cucurbitacées".
- Mission au Soudan dans le cadre de la collaboration scientifique INRA-Université de la Gezira, soutenance de la thèse de Muna E.S. Suliman (12-22 novembre 2000)
- Formation aux techniques d'immuno-microscopie dans le cadre d'un projet CEE 'Biosporesuppress'. Laboratoire de J. Kohl, Plant Research International, Wageningen (5j, 2000).

## **MISSIONS D'EXPERTISE**

---

- Reviewer d'articles scientifiques (environ 5 par an) pour diverses revues: Biological Control, Crop Protection, European Journal of Plant Pathology, FEMS Microbiology Ecology, Food Microbiology, Journal of Applied Microbiology, Journal of Experimental Botany, Journal of Phytopathology, Journal of Plant Pathology, Molecular Plant Pathology, Mycological Research, Pest Management Science, Phytoparasitica, Plant Disease, Weed Research
- Reviewer pour le livre: "The Powdery Mildews: a comprehensive treatise" (Bélanger, Bushnell, Dik and Carver eds) APS press, 2002.

- Expertise de projets scientifiques nationaux et internationaux pour ACTA, INRA, CIRAD, Grant Agency of the Czech Republic, région Bourgogne, ANRT CIFRE
- Membre du comité de pilotage de projets scientifiques (CTPS-AMS 'Résistance du melon à l'oïdium' 2009-2011 et CTPS-AMS '*Verticillium* et *Fusarium* tomate' 2009-2011)
- Membre du Comité National de Lutte Biologique (2001-2004).
- Membre du comité scientifique du Groupement Régional d'Agriculture Biologique (GRAB, 2004-2005).
- Mise en place de formations sur les oïdiums pour un public large allant des instituts techniques, à des groupes privés français ou étrangers (semenciers essentiellement) ou des chercheurs : culture, conservation, tests de pouvoir pathogène sur plantes, tests de résistance aux fongicides (en moyenne, 1 formation par an depuis 1998).

### **ACTIVITE DE VULGARISATION – TRANSFERT VERS LE PUBLIC**

---

- Conférences de vulgarisation auprès de la profession : Chambres d'Agriculture, CTIFL, Sociétés de semences, Centre de recherche d'Avignon, Salon Interprofessionnels... (en moyenne, 1 conférence par an depuis 1998).
- Participation à l'organisation de 'La Fête de la Science' pour le centre PACA et présentation d'un stand (Avignon, 2005 et 2010).
- Participation au salon international de l'agriculture dans la cadre du réseau 'Induction de résistance' de l'INRA : contribution à l'organisation et à la présentation d'un stand sur 'la réponse de l'agressé à l'agresseur' (Paris, février 2011).

### **PARTICIPATION A DES COMITES DE RECRUTEMENT, COMITES DE PILOTAGE ET JURY DE THESE**

---

- Président de jury de concours INRA pour le recrutement de techniciens et d'ingénieurs (2002, 2004, 2006 et 2007).
- Membre de jury de concours INRA pour le recrutement de techniciens et d'ingénieurs (1998, 1999, 2008).
- Président de jury de concours INRA de sélection professionnelle pour l'accès au grade des techniciens de la recherche de classe exceptionnelle (2011).
- Membre de jury de concours INRA de sélection professionnelle pour l'accès au grade des techniciens de la recherche de classe exceptionnelle (2009).
- Président de Jury de titularisation d'agents ACP COTOREP INRA (2002)
- Membre de la commission de spécialistes de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (sections 64 à 69, 2001-2008).
- Membre du jury de recrutement de 6 maitres de conférences pour l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (entre 2001 et 2008)

- Membre du jury de recrutement d'un maître de conférences pour Agrocampus Ouest - centre d'Angers (2011)
- Comité de pilotage de thèse : Laetitia Fruit (1998-2001, Université de Lyon et INRA-Avignon), Laure Perchepied (2001-2004, Université de Paris et INRA-Avignon), Marie Berling (2006-2009, Université de Pau, INRA-Avignon et Ecole des Mines d'Alès), Muhammad Anees (2007-2009, Université de Bourgogne, INRA-Dijon), Manzoor Ali Abro (2009-2012, Université d'Avignon, INRA-Avignon)
- Membre de jury de thèse: Laetitia Fruit (12/02/2001, Université de Lyon), Anne-Noël Petit (7/10/2008, Université de Reims)

## RESPONSABILITES COLLECTIVES

---

- Membre du Conseil de Gestion de l'UR407 Pathologie Végétale, depuis janvier 2012.
- Animation scientifique: responsable de l'organisation des séminaires à Saint-Maurice (regroupant les unités de Pathologie Végétale et de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes) depuis 1998. Organisation de séminaires scientifiques et techniques hebdomadaires, participation à l'organisation de journées thématiques et de séminaires pour le centre d'Avignon en lien avec la cellule communication du centre.
- Membre nommé de la Commission Locale de Formation Permanente pour le centre PACA depuis 2006. Membre élu depuis 2012.
- Participation aux journées de département SPE en vue de son évaluation (2008)
- Assurance qualité en Recherche : membre du groupe AQR du centre d'Avignon (1998-2000) ; participation au groupe 'chambre climatique' de l'Unité (2002-2003) ayant abouti à la soumission d'un projet 'AQR du département SPE' (coordonné par P. Nicot)

## PARTICIPATION A DES CONGRES

---

- Colloque International sur la Systématique des Ascomycètes (Paris, France, 1993)
- Congrès de génétique et biologie moléculaire des champignons filamenteux (Lyon, France, 1995)
- Symposium International Microbiologie des Surfaces Aériennes des Plantes (Bandol, France, 1995)
- Rencontres de Mycologie-Phytopathologie, JJC (Aussois, France, 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, 2008, 2012)
- International Congress of Plant Pathology (Edinburgh, UK, 1998)
- International Powdery Mildew Conference, (Avignon, France, 1999)
- **Membre du comité scientifique et du comité local d'organisation**
- International Botrytis Symposium (Reims, France, 2000 ; Le Cap, Afrique du Sud, 2007 ; Cadix, Espagne, 2010)
- Forum Fruits et Légumes Biologiques (Lille, 2001)



- Colloque International Tomate sous abri - Protection intégrée (Avignon, France, 2003)
- OILB WPRS meeting 'Management of plant disease and arthropod pests by biological control agents and their integration in agricultural systems' (San Michele all'Adige, Italie, 2004)
- International conference on non chemical crop protection methods - AFPP (Lille, France, 2006)
- *Botrytis cinerea* Genome Workshop, (Kaiserslautern, Allemagne, 2005 ; Versailles, France, 2007)
- Exploratory Workshop (ESF-LESC) Microbiological Meteorology (Avignon, France, 2006)  
**Membre du comité local d'organisation**
- Rencontres du Végétal (Angers, France, 2007)
- ENDURE International conference, Diversifying crop protection (La Grande Motte, France, 2008)
- OILB WPRS meeting on Integrated control in protected crops, Mediterranean climate (Chania, Grèce, 2009),  
**Animateur de la session 'maladie des plantes'**
- ISTA Seed Health Workshop on 'Detection of *Botrytis* on *Linum* and sunflower seeds'(Angers, France, 2010)  
**Conférence invitée**
- OILB WPRS meeting on PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects (Neuchâtel, Suisse, 2011)
- *Botrytis Sclerotinia* Post-Genome workshop (Lyon, France, 2011)  
**Animateur de la session 'Adaptation de *Botrytis* et *Sclerotinia* à son environnement'**
- XII Meeting of IOBC-WPRS Working Group 'Biological control of fungal and bacterial plant pathogens' - Biocontrol of plant pathogens in sustainable agriculture (Reims, France, 2012).

## Liste des productions scientifiques

Publications dans des revues avec comité de lecture (en gras : étudiants (co-)encadrés)

### Synthèse des publications

	Nombre de publications	IF (2010)
Agronomy for Sustainable Development	1	2.972
Applied Microbiology and Biotechnology	2	3.280
BioControl	1	2.191
Biogeosciences	1	3.587
Biological Control	1	2.164
Biosystems Engineering	1	1.241
Canadian Journal of Microbiology	1	1.235
European Journal of Plant Pathology	2	1.575
Fungal Biology (ex Mycological Research)	3	2.259
Journal of Plant Pathology	1	1.054
Microbiology and Molecular Biology Reviews	1	12.220
Molecular Ecology	1	6.457
Plant Disease	2	2.387
Plant Pathology	2	2.237
Phytopathology	3	2.428
PLoS Pathogens	1	9.079
Theoretical and Applied Genetics	1	3.264

- A1. **Ajouz S**, Bardin M, Nicot P and El Maataoui M. 2011. Comparison of the development *in planta* of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate. *European Journal of Plant Pathology*, 129:31-42.
- A2. **Ajouz S**, Walker AS, Fabre F, Leroux P, Nicot PC and Bardin M. 2011. Variability of *Botrytis cinerea* sensitivity to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. *BioControl* 56:353-363.
- A3. Jankovics T, Dolovac N, Bulajić A, Krstić B, Pascal T, Bardin M, Nicot PC and Kiss L. 2011. Peach rusty spot is caused by the apple powdery mildew fungus, *Podosphaera leucotricha*. *Plant Disease* 95:719-724.
- A4. Kiss L, Pintye A, Kovacs GM, Jankovics T, Fontaine MC, Harvey N, Xu X, Nicot PC, Bardin M, Shykoff J and Giraud T. 2011. Temporal isolation explains host-related genetic differentiation in a group of widespread mycoparasitic fungi. *Molecular Ecology*, 20:1492-1507.
- A5. Leyronas C, Fatnassi H, Bardin M, Boulard T and Nicot PC. 2011. Modelling *Botrytis cinerea* spore exchanges and production in unheated greenhouses. *Journal of Plant Pathology* 93:407-414.
- A6. Morris CE, Sands DE, Bardin M, Jaenicke R, Vogel B, Leyronas C, Ariya PA and Psenner

- R. 2011. Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate. *Biogeosciences* 8: 17-25.
- A7. **Ajouz S**, Decognet V, Nicot PC and Bardin M. 2010. Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. *Fungal Biology* 114:949-954.
- A8. **Ajouz S**, Nicot PC and Bardin M. 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology* 59: 556-566.
- A9. Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal T and Nicot PC. 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology* 99: 185-193.
- A10. Fatnassi H, Leyronas C, Boulard T, Bardin M and Nicot P. 2009. Dependence of greenhouse tunnel ventilation on wind direction and crop height. *Biosystems Engineering* 103: 338-343.
- A11. Morris CE, Bardin M, Kinkel LL, Moury B, Nicot PC and Sands DC. 2009. Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens* 5: e1000693.
- A12. Aissat K, Nicot PC, Guechi A, Bardin M and Chibane M. 2008. Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 403-409.
- A13. Bardin M, Fargues J and Nicot PC. 2008. Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control* 46: 476-483.
- A14. Jankovics T, Bai Y, Kovács GM, Bardin M, Nicot PC, Toyoda H, Matsuda Y, Niks RE and Kiss L. 2008. *Oidium neolycopersici*: intraspecific variability inferred from amplified fragment length polymorphism analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. *Phytopathology* 98: 529-540.
- A15. Bardin M, **Suliman ME**, Sage-palloix AM, Mohamed YF and Nicot PC. 2007. Inoculum production and long-term conservation methods for cucurbits and tomato powdery mildews. *Mycological Research* 111: 740-747.
- A16. Perchepied L, Bardin M, Dogimont C and Pitrat M. 2005. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. *Phytopathology* 95: 556-565.
- A17. Lefebvre V, Daubeze AM, van der Voort JR, Peleman J, Bardin M and Palloix A. 2003. QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 661-666.
- A18. Morris CE, Bardin M, Berge O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H, Guinebretere MH, Lebaron P, Thiery JM and Troussellier M. 2002. Microbial biodiversity: Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 592-616.

- A19. Kiss L, Cook RTA, Saenz GS, Cunnington JH, Takamatsu S, Pascoe I, Bardin M, Nicot PC, Sato Y and Rossman AY. 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp nov. and *Oidium lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycological Research* 105:684-697.
- A20. Bardin M, Carlier J and Nicot PC. 1999. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Plant Pathology* 48, 531-40.
- A21. Bardin M, Nicot PC, Normand P and Lemaire JM. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. *European Journal of Plant Pathology* 103, 545-54.
- A22. Mohamed YF, Bardin M, Nicot PC and Pitrat M. 1995. Causal Agents of Powdery Mildew of Cucurbits in Sudan. *Plant Disease* 79, 634-6.
- A23. Laguerre G, Bardin M, and Amarger N. 1993. Isolation from Soil of Symbiotic and Nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA Hybridization. *Canadian Journal of Microbiology* 39:1142-1149.
- A24. Monot F, Paccard E, Borzeix F, Bardin M and Vandecasteele JP. 1993. Effect of Lipase Conditioning on Its Activity in Organic Media. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39:483-486.
- A25. Monot F, Borzeix F, Bardin M and Vandecasteele JP. 1991. Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35:759-765.

#### Publications dans des revues sans comité de lecture

- A26. **Ajouz S**, Bardin M, Troulet C, Riqueau G, Decognet V, Leyronas C, Walker AS, Leroux P and Nicot PC. 2009. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by several biological control agents. *IOBC/wprs Bulletin* 49: 51-56.
- A27. Fatnassi H, Boulard T, Leyronas C, Bardin M and Nicot P. 2008. Greenhouse tunnel ventilation dependence on tomato crop height and leaf area index. *Acta Horticulturae* 801:1285-1292
- A28. Leyronas C, Fatnassi H, Bardin M and Nicot P. 2008. Balance of airborne spores of *Botrytis cinerea* in tomato and lettuce tunnels and modelling of spore production. *Aspects of Applied Biology* 89:43-48.
- A29. Morris CE, Sands DC, Bardin M, Jaenicke R, Vogel B, Leyronas C, Ariya PA and Psenner R. 2008. Microbiology and atmospheric processes: an upcoming era of research on biometeorology. *Biogeosciences Discussion* 5: 191-212.
- A30. Bardin M, Fargues J, **Couston L**, Troulet C, Philippe G and Nicot PC. 2004. Compatibility of intervention to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato, using three biological methods. *IOBC/wprs Bulletin* 27:5-9.

- A31. Nicot PC, Decognet V, Fruit L, Bardin M and Trottin Y. 2002. Combined effect of microclimate and dose of application on the efficacy of biocontrol agents for the protection of pruning wounds on tomatoes against *Botrytis cinerea*. IOBC/wprs Bulletin 25:73-76.
- A32. Nicot PC, Moretti A, Romiti C, Bardin M, Caranta C and Ferrière H. 2002. Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions. Tomato Genetics Cooperative Report 52: 24-26.
- A33. Bardin M and Leonard KJ. 2000. Selection against unnecessary virulence in *Puccinia coronata*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 35:223-227.
- A34. Bardin M, Dogimont C, Nicot P and Pitrat M. 1999. Genetic analysis of resistance of melon line PI124112 to *Sphaerotheca fuliginea* and *Erysiphe cichoracearum* studied in recombinant inbred lines. Acta Horticulturae 492:163-168
- A35. **Suliman ME**, Bardin M, Daubeze AM, Mohamed YF and Nicot PC. 1999. Aggressiveness of *Leveillula taurica* on pepper. Capsicum & Eggplant Newsletter 18:83-86

#### Chapitres d'ouvrages

- A36. Nicot PC, Bardin M, Alabouvette C, Kohl J and Ruocco M. 2011. Potential of biological control based on published research. 1. Protection against plant pathogens of selected crops. In: Nicot PC (ed.). IOBC press. pp 1-11
- A37. Nicot PC, Bardin M and Dik AJ. 2002. Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. In: Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, (eds). *The powdery mildews, a comprehensive treatise*. St-Paul, Minnesota: APS press. pp 83-99
- A38. Pitrat M, Dogimont C and Bardin M. 1998. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. In: J.D. McCreight (Ed). *Cucurbitaceae 98, Evaluation and enhancement of Cucurbit Germplasm*. ASHS Press, Alexandria (USA). pp 167-173

#### Produits, documents et publications destinés à des utilisateurs de la recherche (professionnels, partenaires institutionnels...)

- A39. Bardin M, Fargues J, **Couston L**, Troulet C, Philippe G, Nicot PC. 2004. Lutte biologique combinée contre 3 bioagresseurs de la tomate. PHM Revue Horticole 461:36-39.
- A40. Decognet V, Bardin M, Nicot P. 2004. Dynamique spatio-temporelle d'une épidémie de *Botrytis* sur tomate sous serre: importance pour la protection intégrée. PHM Revue Horticole 461, 32-5.
- A41. Trottin-Caudal Y, Fournier C, Leyre JM, Nicot P, Decognet V, Bardin M, Romiti C. 2001. Tomate sous abri. Lutte biologique contre deux maladies aériennes, *Botrytis cinerea* et *Oïdium neolycopersici*. Infos-Ctifl septembre: 24-27.

- A42. Trottin-Caudal Y, Fournier C, Leyre JM, Nicot P, Decognet V, Bardin M, Romiti C. 2001. Tomate sous abri: lutte biologique contre *Botrytis cinerea* et *Oidium neolycopersici*. PHM-Revue horticole (supplément Le maraîcher N°428) septembre: XIII-XV.
- A43. Lemaire JM, Conus M, Mas P, Bardin M, Ferrière H, Nicot P. 1998. Les oïdiums des cucurbitacées. Cycle épidémique et gamme d'hôtes. Phytoma-La Défense des Végétaux 508:34-37.
- A44. Lemaire JM, Ginoux G, Bardin M, Conus M, Ferrière H, Chastellière MG, Nicot P, Mas P. 1998. Résistance à l'oïdium induite par greffage. Culture Légumière 45:13-16.

#### Rapports diplômants

- B1. Bardin M. 1996. Diversité phénotypique et génétique des oïdiums des cucurbitacées, *Sphaerotheca fuliginea* et *Erysiphe cichoracearum*. INRA-Avignon, Station de Pathologie Végétale ; Université Claude Bernard Lyon-1. Thèse de Docteur es Sciences, 169 p.
- B2. Bardin M. 1992. Isolement et identification de souches de *Rhizobium leguminosarum* à partir d'un sol. INRA-Dijon, laboratoire de Microbiologie des Sols ; Université Claude Bernard Lyon-1. DEA d'Ecologie Microbienne, 22 p.
- B3. Bardin M. 1990. Estérification enzymatique en milieu organique: rôle de l'eau et influence du conditionnement de l'enzyme. Institut Français du Pétrole, Rueil-Malmaison ; Université de Provence Marseille-1. Ingénieur en Microbiologie Industrielle et Appliquée, 39 p.

#### Communications orales dans un congrès national ou international

- C1. Kiss L, Jankovics T, Dolovac N, Bulajić A, Krstić B, Pascal T, Bardin M, Nicot PC. 2012. Is apple powdery mildew the causal agent of peach rusty spot? Abstracts of the 22nd Plant Protection Forum, Keszthely, Hungary, p. 85. [In Hungarian]
- C2. Bardin M, **Ajouz S**, Walker AS, Nicot P, Leroux P and Fillinger S. 2011. Comparison of resistance mechanisms to pyrrolnitrin and to iprodione in *Botrytis cinerea*. (*Botrytis* and *Sclerotinia* Post-genome Workshop, Lyon, France, 2011/09/15-17).
- C3. Bardin M, **Comby M**, **Lenaerts R** and Nicot, PC. 2011. Diversity in susceptibility of *Botrytis cinerea* to biocontrol products inducing plant defence mechanisms. (IOBC WPRS meeting on PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects, Neuchâtel, Suisse, 2011/09/04-08).
- C4. Nicot PC, Bardin M, Debruyne F, Lecompte F, Neu L, Pascal M. 2011. Effect of nitrogen fertilisation of strawberry plants on the efficacy of defence-stimulating biocontrol products against *Botrytis cinerea*. (OILB WPRS meeting on PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects, Neuchâtel, Suisse, 2011/09/04-08).
- C5. Bardin M. 2010. *Botrytis cinerea* of *Linum* and sunflower: taxonomy and epidemiology. ISTA Seed Health Workshop, Angers, France 2010/03/02-05 (conférence invitée)
- C6. Bardin M. 2010. Durabilité de la lutte biologique: estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Premières journées scientifiques

- INRA-PACA, "La santé des Plantes à l'horizon 2030", Cogolin, France, 2010/04/27-28. (conférence invitée)
- C7. Bardin M, **Ajouz S**, El Maataoui M, Nicot P. 2010. Development of resistance to pyrrolnitrin and associated fitness costs in the plant pathogen *Botrytis cinerea*. (15th International Botrytis Symposium, Cadiz, Spain, 2010/05/30-2010/06/04).
- C8. Koné D, Nicot P, Koné D, Bardin M, and Aké S. 2010. Caractérisation in vitro et phylogénétique de quelques isolats de *Cladosporium* sp., champignons parasites des bananiers en Côte d'Ivoire, p. 143-150, in: Systématique et conservation des plantes africaines, Comptes rendus du 18<sup>e</sup> congrès de l'AETFAT, Yaoundé, Cameroun. X. van der Burgt., J. Van der Maesen and J. M. Onana, eds. Kew publishing, Kew, UK.
- C9. Nicot PC, Alabouvette C, Bardin M, Blum B, Köhl J, Ruocco M. 2010. Review of factors influencing the success or failure of biocontrol: technical, industrial and socio-economic perspectives. (Meeting of the IOBC/WPRS working group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens", Graz, Austria, 2010/06/7-11).
- C10. **Ajouz S**, Bardin M, Troulet C, Riqueau G, Decognet V, Leyronas C, Walker AS, Leroux P and Nicot PC. 2009. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by several biological control agents. (Meeting of the IOBC/WPRS working group "integrated control in protected crops, Mediterranean climate, Chania, Crete, Greece, 2009/09/7-10).
- C11. **Ajouz S**, Bardin M, Troulet C, Riqueau G and Nicot PC. 2008. Adaptation de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par des agents de lutte biologique, pp. 7<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie, Aussois, France, 2008/01/20-24.
- C12. Leyronas C, Fatnassi H, Bardin M and Nicot P. 2008. Balance of airborne spores of *Botrytis cinerea* in tomato and lettuce tunnels and modelling of spore production. (Proceedings of the International conference on Applied Aspects of Aerobiology, Harpenden, UK, 2008/11/19)
- C13. Fatnassi H, Boulard T, Leyronas C, Bardin M and Nicot P. 2008. Greenhouse tunnel ventilation dependence on tomato crop height and leaf area index. (Proceedings of the International Symposium on High Technology for Greenhouse System Management: Greensys2007, Naples, Italy, 2007/10/4-6).
- C14. Nicot PC and Bardin M. 2007. Lutte biologique contre les maladies: situation actuelle et perspectives de durabilité, pp. 95-97. 4<sup>èmes</sup> rencontres du végétal, Angers, France, 2007/01/16-17. (conférence invitée)
- C15. Walker AS, Decognet V, Fermaud M, Bout A, Confais J, Leroux P, Gautier A, Martinez F, Roudet J, Nicot P, Bardin M, Robin P, Potron M and Fournier E. 2007. Genetic diversity and structuring factors for *Botrytis cinerea* French populations, pp. 19. (14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa, 2007/10/21-26).
- C16. Bardin M, Fargues J, **Couston L**, Troulet C, Philippe G and Nicot PC. 2006. Compatibility of intervention to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato, using three biological methods, pp. 56. (Third International Conference on Non Chemical Crop Protection Methods, Lille, France, 2006/03/13-15). (conférence invitée)

- C17. Decognet V, Nicot PC, Bardin M, Trottin-Caudal Y. 2005. SSR-typing of *Botrytis cinerea* reveals rapid evolution of population structure following introduction of marked isolates in tomato greenhouses. *In*: Technische U, ed. (Proceedings of the 1<sup>st</sup> *Botrytis cinerea* Genome Workshop, Kaiserslautern, Germany pp.17).
- C18. Bardin M, Fargues J, **Couston L**, Troulet C, Philippe G, Nicot PC. 2004. Compatibility of intervention to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato, using three biological methods. (Meeting of the IOBC/WPRS working group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, Integration", S. Michele all'Adige, Italy, 2004/06/9-13).
- C19. Perchepied L, Bardin M, Pitrat M. 2004. Hérité de la résistance à l'oïdium et au mildiou dans une lignée de melon, (5<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie Aussois, France, p. 119).
- C20. Nicot PC, Decognet V, Bardin M, Romiti C, Trottin Y, Fournier C, Leyre JM. 2003. Potential for including *Microdochium dimerum*, a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*, into an integrated protection scheme of greenhouse tomatoes. (Colloque international tomate sous abri, protection intégrée - agriculture biologique, Avignon, France, 17-19/09/2003).
- C21. Trottin-Caudal Y, Fournier C, Leyre JM, Decognet V, Romiti C, Nicot P, Bardin M. 2003. Efficiency of plant extract from *Reynoutria sachalinensis* (Milsana) to control powdery mildew on tomato (*Oidium neolycopersici*). (Colloque international tomate sous abri, protection intégrée - agriculture biologique, Avignon, France. Paris France: Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) pp. 11-15.
- C22. Nicot PC, Decognet V, Fruit L, Bardin M, Trottin Y. 2002. Combined effect of microclimate and dose of application on the efficacy of biocontrol agents for the protection of pruning wounds on tomatoes against *Botrytis cinerea*. (Meeting of the IOBC/WPRS working group Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, Kusadasi, Turquie, 2002/05/22-25).
- C23. Nicot PC, Decognet V, Fruit L, Bardin M, Trottin-Caudal Y. 2002. La dépendance du micro-climat pour l'efficacité de la lutte biologique est-elle une fatalité? L'exemple de la protection de la tomate contre *Botrytis cinerea*. (4<sup>ème</sup> Rencontres de mycologie-phytopathologie, Aussois, France).
- C24. Bardin M, Daubèze AM, **Suliman ME**, Romiti C, Lefebvre V, Mohamed YF, Palloix A and Nicot PC. 2001. An artificial inoculation method to test the resistance of pepper to *Leveillula taurica* on detached organs, p. 288-292. *In* K. Abak, S. Buyukalaca, and Y. Dasgan (ed.), (Xith EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. University of Cukurova, Antalya-Turkey).
- C25. Bardin M, Decognet V, Fruit L, Romiti C, Morison N, Trottin-Caudal Y, Fournier C, Leyre JM, Mermier M, Boulard T, Nicot PC. 2000. Stratégie de lutte contre la pourriture grise et l'oïdium de la tomate. (3<sup>èmes</sup> Rencontres de Mycologie-Phytopathologie, Aussois, France).
- C26. Nicot PC, Bardin M, Morison N, Mermier M, Romiti C, Fruit L. 2000. Lutte contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) sous abri: perspectives d'utilisation de matériaux de



- couverture absorbants les rayonnements ultra-violet proches. (3<sup>ème</sup> Rencontres de Mycologie-Phytopathologie, Aussois, France).
- C27. Bardin M, Leonard KJ. 2000. Selection against unnecessary virulence in *Puccinia coronata*. (10th Cereal Rusts & Powdery Mildews Conference, Budapest, 2000/08).
- C28. Morris CE, Bardin M, Bergé O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H, Guinebretière MH, Lebaron P, Pierrat JC, Thiery J, Troussellier M, Balandreau J. 2000. Tracing the progress of research in microbial biodiversity: 1975 to present. (4<sup>ème</sup> Rencontres de Phytobactériologie, Aussois, France).
- C29. Nicot PC, Decognet V, Bardin M. 2000. Control of *Botrytis cinerea* in greenhouse tomato: an integrated approach. (XIth International Botrytis Symposium, Reims (FRA), 2000/07/03-07).
- C30. Bardin M, Dogimont C, Nicot P, Pitrat M. 1999. Genetic analysis of resistance of melon line PI124112 to *Sphaerotheca fuliginea* and *Erysiphe cichoracearum* studied in recombinant inbred lines. (1<sup>st</sup> International Symposium on Cucurbits, ISHS, Abak K. and Büyükalaca S. Eds).
- C31. Leonard KJ and Bardin M. 1999. Selection in relation to virulence polymorphisms in cereal rusts. (APS annual meeting, Montreal, Canada, 1999/08/7-11).
- C32. Bardin M, Leonard KJ. 1998. Sélection stabilisatrice dans une population hétérogène de *Puccinia coronata*, agent de la rouille couronnée de l'avoine. (2<sup>ème</sup> Rencontres de Mycologie Phytopathologie, Aussois (FRA) (1998/09/27-10/1).
- C33. Nicot P, Decognet V, Bardin M. 1997. Stratégie climatique et lutte intégrée contre les maladies cryptogamiques des cultures sous serre. (Séminaire, Alénia (FRA), 1996/03/12-14. Baille A. (ed.), INRA, Délégation à l'Agriculture au Développement et à la Prospective, Paris (FRA). AIP intersectorielle Serres). Actes, p.232-241.

#### Communication par affiches (posters) dans un congrès national ou international

- C34. Bardin M, **Comby M**, **Lenaerts R**, Troulet C, Nicot PC. 2012. Diversité de la sensibilité de *Botrytis cinerea* à des stimulateurs des défenses naturelles des plantes. (9<sup>ème</sup> Rencontres de Mycologie Phytopathologie, Aussois (FRA) (2012/01/16-20).
- C35. Bardin M, Monteil C, Leyronas C, Troulet C, Duffaud M, Morris C. 2012. Sources potentielles d'inoculum de *Botrytis cinerea* en dehors du contexte agricole *sensu stricto*. (9<sup>ème</sup> Rencontres de Mycologie Phytopathologie, Aussois (FRA) (2012/01/16-20).
- C36. Nicot PC, Bardin M, Debruyne F, Duffaud M, Lecompte F, Neu L, Pascal M. 2012. Le niveau de nutrition azotée affecte la sensibilité de la fraise à *Botrytis cinerea* et l'efficacité de produits stimulant les défenses de la plante. (9<sup>ème</sup> Rencontres de Mycologie Phytopathologie, Aussois (FRA) (2012/01/16-20).
- C37. Bardin M, Schmitt A, Nicot PC. 2011. Diversity in the effect of an extract from *Fallopia sachalinensis* on isolates of cucurbit powdery mildews grown on melon. (OILB WPRS meeting on PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects, Neuchâtel, Suisse, 2011/09/04-08).

- C38. Kiss L, Pintye A, Kovacs GM, Jankovics T, Fontaine MC, Harvey N, Xu X, Nicot PC, Bardin M, Shykoff J, Giraud T. 2010. Temporal isolation in the fungal world: Isolation in time explains host-related genetic differentiation in a group of widespread mycoparasitic fungi, (*IMC9*, Edinburgh, Scotland, 2010/08/1-6).
- C39. **Ajouz S**, Bardin M and Nicot PC. 2008. Development of resistance in *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. Journal of Plant Pathology 90: 108 (ICPP2008, 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Torino, Italy, 2008/08/24-29).
- C40. Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y and Nicot P. 2008. Une analyse microsatellite de *Botrytis cinerea* révèle une évolution rapide des populations en culture de tomate sous serre, suite à l'introduction de souches, pp. 94. (7<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie, Aussois, France, 2008/01/20-24).
- C41. Decognet V, Bardin M, Walker AS, Fermaud M, Nicot P. 2008. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from tomato greenhouses in France. Journal of Plant Pathology 90, S2.83-S2.4. (ICPP2008, 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Torino, Italy, 2008/08/24-29).
- C42. Decognet V, Bardin M, Walker AS, Fermaud M and Nicot P. 2008. Structure génétique des populations de *Botrytis cinerea* dans les serres de tomate en France, pp. 105. 7<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie, Aussois, France, 2008/01/20-24.
- C43. Jankovics T, Bai Y, Kovacs GM, Bardin M, Nicot PC, Toyoda H, Matsuda Y, Niks RE and Kiss L. 2008. *Oidium neolycopersici*: intra-specific variability inferred from AFLP analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. Journal of Plant Pathology 90: 87 (ICPP2008, 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Torino, Italy, 2008/08/24-29).
- C44. Leyronas C, Fatnassi H, Bardin M and Nicot P. 2008. Modélisation de flux de spores de *Botrytis cinerea* en tunnels de tomate et laitue, pp. 88. (7<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie, Aussois, France, 2008/01/20-24).
- C45. Walker AS, Decognet V, Fermaud M, Bout A, Confais J, Leroux P, Gautier A, Martinez F, Roudet J, Nicot P, Bardin M, Robin P, Potron M and Fournier E. 2008. Genetic diversity and structuring factors for *Botrytis cinerea* French populations, pp. 101. (7<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie, Aussois, France, 2008/01/20-24).
- C46. **Ajouz S**, Bardin M and Nicot PC. 2007. Evolution of resistance of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological agents, pp. 83. (14th International Botrytis symposium, Cape Town, South Africa, 2007/10/21-26).
- C47. Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y and Nicot P. 2007. Genetic analysis reveals a rapid evolution of population structures of *Botrytis cinerea* after the introduction of isolates in tomato glasshouses, pp. 57. (14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa, 2007/10/21- 26).
- C48. Decognet V, Bardin M, Walker AS, Fermaud M and Nicot P. 2007. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from vegetable greenhouses in France, pp. 35. (14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa, 2007/10/21-26).
- C49. Andurand D, Bardin M, **Ladvie P**, Buffière A, Troulet C, Nicot. PC. 2006. Recherche d'un marqueur moléculaire de la souche L13 de *Microdochium dimerum*, agent de lutte

- biologique contre *Botrytis cinerea* sur tomate. pp. 72. (6<sup>ème</sup> Rencontres de Phytopathologie/Mycologie, Aussois, France, 2006/01/15-19).
- C50. Decognet V, Bardin M, Troulet C and Nicot PC. 2006. Geographic structure of *Botrytis cinerea* populations from vegetable greenhouses in southern France, pp. 35. (2nd Botrytis cinerea Genome Workshop, Versailles, France, 2006/10/5-7).
- C51. Decognet V, Andurand D, Bardin M, Nicot PC. 2004. Répartition spatio-temporelle et diversité des souches de *Botrytis cinerea* sous serre de tomate. (5<sup>ème</sup> Rencontres de mycologie-phytopathologie. Aussois, France: 103).
- C52. Bardin M, Dogimont C, Pitrat M, Nicot PC. 1999. Virulence of *Sphaerotheca fuliginea* and *Erysiphe cichoracearum* on melon and genetic analysis of resistance of melon genotypes 'PI 1211' and 'PI 414723'. (1<sup>st</sup> International Powdery Mildew Conference, Avignon, 1999/08/29-1999/09/02). p.85.
- C53. Bardin M, Nicot PC. 1999. Long term conservation of powdery mildew of vegetable crops. (1<sup>st</sup> International Powdery Mildew Conference, Avignon, 1999/08/29-1999/09/02) p.12.
- C54. Kiss L, Cook RTA, Saenz GS, Pascoe I, Bardin M, Nicot PC, Hughes K, Rossman AY. 1999. *Erysiphe*-like anamorphs are responsible for the recent outbreak of tomato powdery mildew. (1<sup>st</sup> International Powdery Mildew Conference, Avignon, 1999/08/29-1999/09/02). p.4.
- C55. **Suliman ME**, Bardin M, Daubèze AM, Mohamed YF, Nicot PC. 1999. Aggressiveness of *Leveillula taurica* on peppers. (1<sup>st</sup> International Powdery Mildew Conference, Avignon, 1999/08/29-1999/09/02). p.57-58
- C56. **Suliman ME**, Bardin M, Daubèze AM, Mohamed YF, Nicot PC. 1999. Effect of temperature on germination and germ tube elongation of *Leveillula taurica*. (1<sup>st</sup> International Powdery Mildew Conference, Avignon, 1999/08/29-1999/09/02). p.58
- C57. Bardin M, **Fine C**, Lemaire JM, Nicot PC. 1995. Phenotypic diversity of isolates of *Sphaerotheca fuliginea* causal agent of powdery mildew of cucurbits: resistance to fungicides. (6th International Symposium of Microbiology of aerial plant surfaces, Bandol (FRA), 1995/09/11-15). p.63.
- C58. Bardin M, Lemaire JM, Nicot PC. 1995. Diversité de la virulence et polymorphisme de l'ADN chez *Sphaerotheca fuliginea*, agent de l'oïdium des cucurbitacées. (Congrès de génétique et biologie moléculaire des champignons filamenteux, Villeurbanne, 10-12/07/1995).

# Synthèse des activités de recherche : durabilité des méthodes de protection contre les champignons phytopathogènes

## 1. Résumé du parcours scientifique et contexte général des travaux de recherche

J'ai intégré l'unité de Pathologie Végétale de l'INRA PACA (UR407) en novembre 1992 en tant qu'Attaché Scientifique Contractuel pour y réaliser une thèse de doctorat sous les responsabilités scientifiques conjointes de Jean-Marc Lemaire et de Philippe Nicot. Ce travail a concerné l'étude de la diversité phénotypique et génétique des oïdiums des cucurbitacées. Dès la fin de ces travaux, j'ai effectué un séjour de 15 mois (octobre 1996 - décembre 1997) dans l'équipe de Kurt Leonard au laboratoire des maladies des céréales de l'USDA à St-Paul dans le Minnesota (Etats-Unis). Au cours de ce séjour, j'ai étudié l'évolution des populations de rouille couronnée de l'avoine sous différentes pressions sélectives. En août 1997, j'ai été recruté par l'INRA en tant que CR2 sur le profil "maladies cryptogamiques des cultures maraîchères: connaissance de la biologie des pathogènes et mise au point de méthodes de lutte" avec un retour effectif au laboratoire en janvier 1998. J'ai alors poursuivi les activités que j'avais engagées sur l'oïdium des cucurbitacées au cours de ma thèse et j'ai développé de nouveaux travaux sur les oïdiums des solanacées maraichères. Entre 1992 et 2000, mes travaux ont ainsi essentiellement concerné **l'évaluation de l'efficacité et de la durabilité de la lutte génétique** contre des champignons biotrophes obligatoires à dissémination aérienne. Depuis 2001, mes travaux de recherche se sont focalisés sur **l'évaluation de l'efficacité et de la durabilité de la protection biologique** contre *Botrytis cinerea*. Ce changement de modèle d'étude découle d'abord d'une volonté personnelle de m'inscrire dans un projet de recherche plus originale et innovant. Cette évolution est également liée aux limites inhérentes aux parasites obligatoires (difficulté de culture et de conservation, peu d'outils de biologie moléculaire disponibles...). Enfin, il découlait d'une volonté collective de recentrer les activités de recherche de la petite équipe de mycologie autour d'un pathosystème modèle, *Botrytis cinerea* / tomate sous abris et de stimuler le renforcement des liens entre les chercheurs de l'équipe vers un objectif commun.

L'ensemble des travaux que j'ai réalisés a été développé en étroite collaboration avec Philippe Nicot, animateur du laboratoire de mycologie. Ces travaux ont pu bénéficier de

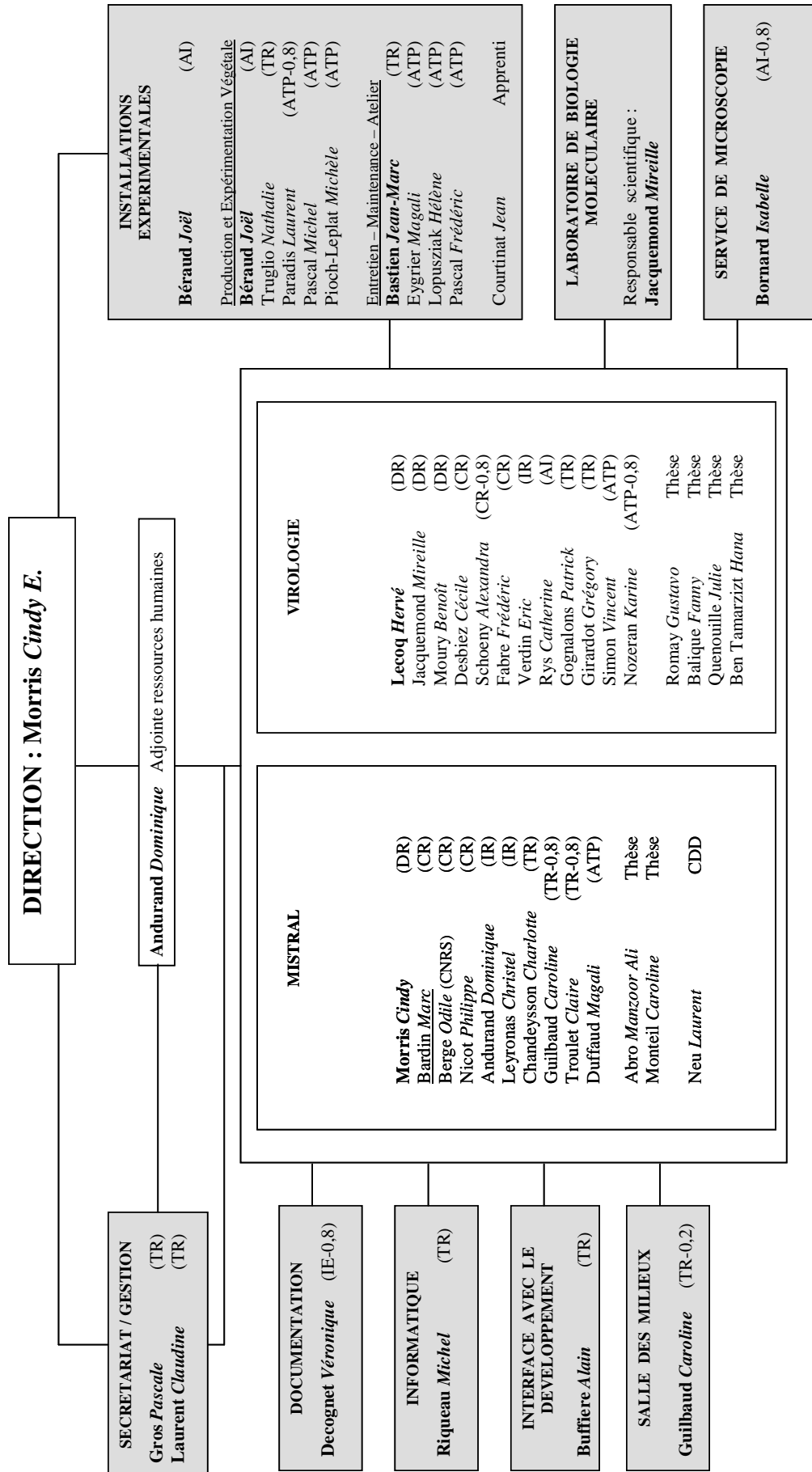
l'aide technique des différents agents permanents ou non titulaires (dont de nombreux étudiants) ayant travaillé dans cette équipe. Ils m'ont permis de développer des collaborations nationales et internationales qui seront détaillées dans la suite du rapport. Mes questions de recherche ont toujours été fortement motivées par des objectifs finalisés liés à la protection intégrée des cultures, soutenus par la profession. Ces travaux m'ont tout naturellement conduit à la production de connaissances académiques et d'outils de recherche, ainsi qu'à contribuer au développement de produits ou de démarches destinés à une application directe par la profession.

Je fais cette demande d'Habilitation à Diriger des Recherches afin de diriger des étudiants en thèse de doctorat sur mes sujets de recherche propres sans avoir recours à un co-encadrement. Cette démarche est une évolution logique de la carrière d'un chercheur et vaut reconnaissance de ma capacité à encadrer de jeunes chercheurs. C'est également, de la part de mes pairs, une reconnaissance globale de mes travaux scientifiques, complétant ainsi celle obtenue lors de l'acceptation pour publication d'articles scientifiques dans des revues à comité de lecture ou celles obtenues lors des évaluations individuelles et collectives. Elle me permettra également d'endosser la responsabilité de rapporteurs dans des jurys de thèse. A moyen terme, cette HDR me permettra de postuler au grade de Directeur de Recherches de l'INRA. En outre, le nombre d'HDR est un critère important du dynamisme d'une unité, utilisé lors des évaluations collectives par l'Agence d'Evaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. L'obtention de cette HDR contribuera également au Pôle de Recherche avignonnais, en augmentant le nombre de scientifiques susceptibles d'encadrer des doctorants au sein de l'école doctorale 536 'Sciences et Agrosociétés' (SAS) de l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (<http://ed536.univ-avignon.fr/>), à laquelle notre équipe est affiliée depuis 2011.

L'unité de Pathologie Végétale d'Avignon dans laquelle je travaille depuis ma thèse dépend du centre de recherche PACA né en janvier 2010 de la fusion des centres d'Avignon et de Sophia-Antipolis (<http://www.paca.inra.fr/>), et est rattachée au département Santé des Plantes et Environnement de l'INRA (SPE, <http://www4.inra.fr/sante-plantes-environnement/>). Cette unité regroupe actuellement 38 agents titulaires (Fig. 1) et ses projets de recherche visent principalement à la création de connaissances et d'outils nécessaires pour la mise au point de méthodes et de stratégies de protection des cultures respectueuses de l'environnement contre les maladies virales, bactériennes et fongiques des

cultures maraîchères essentiellement, et d'en estimer leur durabilité ([http://www4.paca.inra.fr/pathologie vegetale/](http://www4.paca.inra.fr/pathologie_vegetale/)). Cette démarche passe par une meilleure compréhension des interactions plantes/agents phytopathogènes et par l'étude de la variabilité et de la dynamique des populations de ces agents. Depuis janvier 2012, notre équipe a fusionnée avec l'équipe de bactériologie pour donner naissance à l'équipe MISTRAL (Microbiology of agroeco-Systems : TRANslational research from pathogen Life histories). L'objectif majeur de l'équipe est d'approfondir les connaissances de l'écologie des micro-organismes phytopathogènes à dissémination aérienne et aquatique, et de l'épidémiologie des maladies qu'ils provoquent sur les cultures maraîchères et fruitières, en vue de concevoir des dispositifs innovants de protection durable. Les modèles d'étude sont des agents phytopathogènes à fort impact économique, à large spectre d'hôte et ayant des capacités de dissémination aérienne et aquatique sur de longues distances, *B. cinerea* et *Pseudomonas syringae*. Au sein de cette équipe, les objectifs principaux actuels du laboratoire de mycologie sont (i) de développer des outils tactiques pour la protection de la tomate sous abri et leur mobilisation dans des stratégies de protection intégrée, (ii) d'évaluer la durabilité de méthodes de protection biologique contre cet agent pathogène, et (iii) d'étudier les facteurs impliqués dans la dynamique de la pression d'inoculum de *B. cinerea* sous abri. Mes activités actuelles concernent ces 3 objectifs avec des implications différentes et s'inscrivent donc dans un ensemble de disciplines telles que l'écologie, l'épidémiologie et la génétique des populations.

Dans ce rapport, mon activité scientifique sera présentée en 3 parties : dans une première partie seront présentés assez succinctement les travaux réalisés entre 1992 et 2001 (évaluation de l'efficacité et de la durabilité de la lutte génétique contre les oïdiums des cultures maraîchères et la rouille couronnée de l'avoine) ; dans une deuxième partie, les travaux réalisés depuis 2001 sur l'évaluation des facteurs d'efficacité et de durabilité de la protection biologique contre *B. cinerea* et les perspectives qui en découlent seront d'avantages détaillés. Enfin dans une dernière partie, j'exposerai mes perspectives scientifiques pour les prochaines années.



**Figure 1.** Organigramme du personnel de l'UR 407 Pathologie Végétale

## 2. Durabilité de la lutte génétique contre les oïdiums et les rouilles

**Principales collaborations :** GAFL-Avignon (M. Pitrat, C. Dogimont, V. Lefebvre, A.M. Sage-Palloix) ; CIRAD Montpellier (J. Carlier) ; UMR Ecologie Microbienne, Université de Lyon (P. Normand) ; Université de la Gezira, Wad Medani, Soudan (Y.F. Mohamed) ; GEVES-SNES Angers (M. Guénard, V. Grimault) ; établissements semenciers PACA et LR ; Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary (L. Kiss, T. Jankovics) ; Université de Turin (M. L. Gullino, A. Minuto).

### 2.1. *Diversité phénotypique et génétique des oïdiums des cultures maraichères*

L'oïdium est une des maladies les plus fréquentes et les plus graves sur les cultures maraichères, et particulièrement sur cucurbitacées et solanacées. Sur variétés sensibles, des traitements fongicides fréquents sont nécessaires pour éviter des pertes de rendement ou de qualité graves. Des pertes d'efficacité de fongicides sont signalées et des souches résistantes ont été fréquemment décrites (Hollomon and Wheeler 2002). Pour certaines espèces maraichères (tomate, piment), il n'existe pas encore de variétés commercialisées résistantes. Pour le melon, les variétés résistantes (ou moins sensibles), quand elles existent, se révèlent parfois sensibles en culture. Cette situation suggère l'existence ou l'apparition au champ de races physiologiques contournant les résistances variétales, limitant ainsi leur durabilité. Sur le melon, le but de notre travail entre 1992 et 2000 a été de renforcer l'efficacité de la lutte contre cette maladie par une meilleure gestion des gènes de résistance. Les objectifs spécifiques de ces travaux ont été de (i) de connaître les différentes espèces et races d'oïdium présentes dans les populations naturelles, leur fréquence d'apparition et leur répartition, (ii) d'estimer le potentiel de variabilité des différentes espèces d'oïdium et (iii) d'évaluer l'efficacité des principales sources de résistance disponibles, en particulier vis à vis des différentes races identifiées. Sur les solanacées maraichères (tomate, piment), les objectifs concernaient essentiellement les points ii, iii. Comme préalable indispensable, la réalisation de ces travaux a nécessité le développement de techniques adaptées à ces parasites obligatoires pour leur culture et leur conservation.

Différentes sources de financement ont été obtenues pour réaliser ces travaux de recherche: contrat CTPS "méthodes de conservation à long terme des agents pathogènes"



(GEVES, INRA, Aventis, Vilmorin, 1998-2000), contrat CTPS "Stabilité des résistances du melon aux oïdiums" (INRA GAFL, sociétés privées de production de semences, 1998-2000) et bourse de thèse pour Muna E. Suliman (co encadrement INRA-Avignon, Université de Gezira, Soudan, 1997-1999).

### 2.1.1. Culture et conservation des oïdiums

La culture et la conservation des oïdiums, parasites obligatoires, nécessitent le repiquage régulier du champignon sur des organes végétaux en survie. La conservation à long terme de ces agents phytopathogènes est une priorité pour maintenir une collection de souches caractérisées phénotypiquement et génétiquement. Les études réalisées ont permis (1)



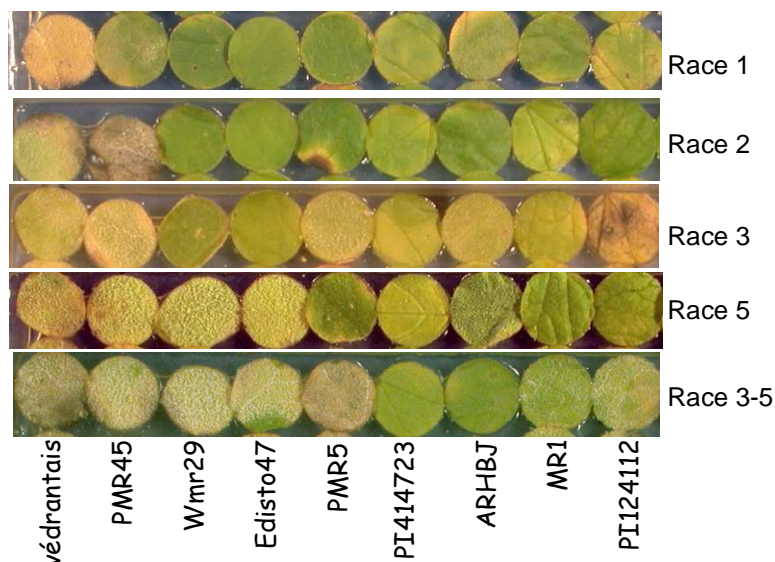
**Figure 2.** Culture de *Leveillula taurica* sur cotylédon de *Lagenaria* sp.

d'adapter la méthode de culture sur cotylédons détachés, développée préalablement pour *Podosphaera xanthi* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), *Golovinomyces cichoracearum* (syn. *Erysiphe cichoracearum*) et *Oidium neolycopersici*, à l'oïdium des solanacées *Leveillula taurica* (Fig. 2), (2) de maîtriser la production d'inoculum *in vitro* pour *P. xanthi*, *G. cichoracearum*, *L. taurica* et *O. neolycopersici* et (3) de développer un protocole de conservation à long terme dans l'azote liquide pour *P. xanthi*. Les résultats obtenus ont été valorisés dans un chapitre d'ouvrage [A37] et un article scientifique [A15]. Les travaux concernant *L. taurica* ont été

effectués dans le cadre de la thèse de Muna E. Suliman que je co-encadrais avec Philippe Nicot et qui a été réalisée en cotutelle avec l'Université de la Gezira (Wad Madani, Soudan). En outre, des collaborations ponctuelles ont été mises en place pour le développement de systèmes de culture *in vitro* et pour l'étude des possibilités de cryoconservation d'autres espèces d'oïdium avec des laboratoires de recherche français (INRA Angers, INRA Sophia-Fréjus), ou dans le cadre de convention d'échange international (BBSRC, Laboratoire de J. Turner, University of East Anglia, Royaume-Uni, 1999), de prestations de service ou de contrats de formation (avec des sociétés productrices de semences en France ou à l'étranger).

### 2.1.2. Diversité phénotypique et génétique des oïdiums

La plupart des travaux réalisés sur la diversité phénotypique et génétique des oïdiums concerne les espèces *P. xanthi* et *G. cichoracearum*, responsables de la maladie sur cucurbitacées. Sur plus de 600 échantillons de cucurbitacées infectés par l'oïdium et prélevés en France entre 1992 et 1996, *P. xanthi* apparaît comme l'espèce prédominante [A20, A38]. C'est également l'espèce prédominante en zone subtropicale, comme au Soudan [A22]. L'utilisation d'une gamme d'hôtes différentiels comprenant 9 génotypes de melon a permis d'identifier deux races chez *G. cichoracearum* et huit races chez *P. xanthi*. Un exemple des races de *P. xanthi* les plus fréquemment rencontrées en France jusqu'en 2002 est présenté dans la figure 3.



**Figure 3.** Virulence de 5 races de *Podosphaera xanthii* sur 9 génotypes de melon.

Alors que la race 2 représentait la race majoritaire avant 1996, les populations ont évolués vers la prédominance de souches de race 5 à partir de 1998. Des isolats de race 3 et de race 3-5 ont été isolés en 1999 en Espagne et dans le Sud-Est de la France. En termes d'agressivité, des tests menés sur variété sensible montrent que les souches comportant un grand nombre de virulences (race 3 ou 5) présentent une agressivité équivalente aux souches comportant peu de virulences (race 1 ou 2). L'étude de la diversité génétique à l'aide de marqueurs RAPD suggère des différences importantes dans la structure des populations de *P. xanthi* et de *G. cichoracearum*. Alors que les populations françaises de *G. cichoracearum* sur cucurbitacées se structurent en trois groupes partiellement corrélés avec

l'hôte d'origine et la virulence des souches [A20], aucun regroupement n'a pu être identifié chez *P. xanthi* [A21]. L'analyse des déséquilibres de liaison entre les allèles détectés dans les populations françaises de *P. xanthi* et de *G. cichoracearum* suggère un mode de reproduction essentiellement asexué pour *G. cichoracearum*, et probablement sexué et asexué pour *P. xanthi*. L'ensemble de ces résultats suggère que *P. xanthi* présente une variabilité importante et une forte capacité à surmonter des gènes de résistance majeurs chez les plantes. La création de variétés à résistances stables et durables chez le melon passe donc probablement par le cumul de différents gènes de résistance dans les variétés commerciales.

Dans le cadre de la thèse de Muna E. Suliman, les travaux menés sur *L. taurica* ont abouti à la démonstration d'une forte diversité phénotypique chez cette espèce avec des niveaux d'agressivité variables sur piment sensible [A35, C55] et une adaptation différentielle des souches à la température [C56].

Une collaboration scientifique avec l'équipe de Levente Kiss (Académie des Sciences de Hongrie, Budapest) a permis de progresser dans la connaissance d'autres oidiums. Ainsi, l'étude de la diversité génétique de l'oidium de la tomate a abouti à la définition d'une nouvelle espèce, *Oidium neolycopersici*, dont la forme sexuée n'est pas connue [A19]. Ces travaux ont révélé l'existence d'une forte diversité chez cette espèce suggérant l'existence de mécanismes génétiques maintenant un haut niveau de variabilité [A14]. Dans le cadre d'un programme de collaboration bilatérale avec l'Académie des Sciences de Hongrie, l'utilisation de marqueurs moléculaires a permis d'affiner l'étiologie d'un nouveau type d'oidium sur pêcher en Europe (le 'rusty spot disease') et de démontrer l'implication de *Podosphaera leucotricha*, connu en tant qu'agent de l'oidium du pommier [A3]. Enfin, ce même projet a permis de progresser dans la connaissance de la diversité moléculaire du champignon hyperparasite des oidiums, *Ampelomyces quisqualis* [A4].

### **2.1.3. Génétique de la résistance des plantes à l'oidium**

L'élucidation du déterminisme génétique de la résistance ainsi que la cartographie des facteurs de résistance à l'oidium a principalement été réalisé sur le melon. Ces travaux ont bénéficié d'une forte interaction avec l'unité GAFL d'Avignon. Ces travaux ont été réalisés à partir de croisements entre différents parents résistants et sensibles de melon, et différents types de descendants ont été analysés (principalement F2 et lignées recombinantes RIL).

Ces populations de plantes ont été testées vis à vis de différentes souches d'oïdium appartenant aux différentes races de *P. xanthi* et de *G. cichoracearum* et ont permis de mettre en évidence l'implication de gènes majeurs de résistance différents en fonction de l'espèce d'oïdium ou de la race physiologique considérées [A16, A34]. Des résistances partielles ont également été mises en évidence [C52].

Les travaux menés sur piment en collaboration avec l'unité du GAFL d'Avignon ont permis de mettre au point un test en conditions contrôlées sur organes détachés en survie, pour tester la résistance du piment à *L. taurica* [C24]. Des essais pluriannuels en conditions naturelles d'infestations et des tests en conditions contrôlées ont abouti à la mise en évidence de QTL de résistance à cet oïdium chez le piment [A17].

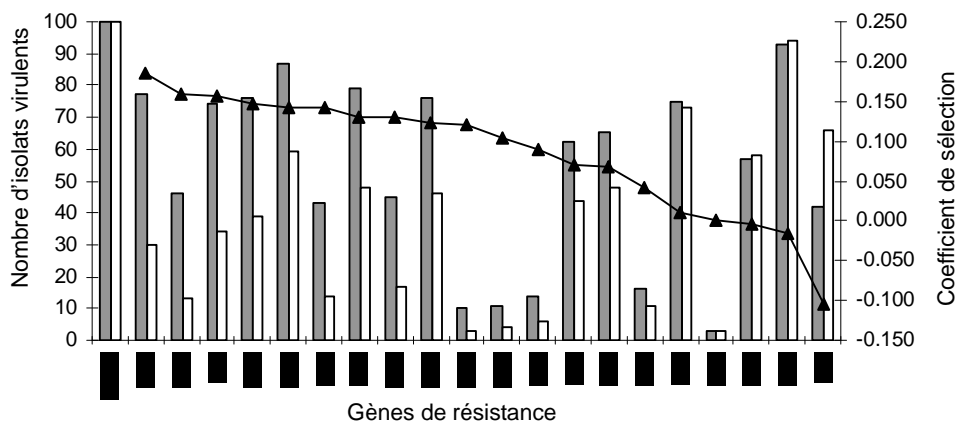
D'un point de vue agronomique, ces travaux ont essentiellement abouti à une meilleure prise en compte de la diversité des agents responsables de l'oïdium dans le travail de sélection variétale. Cela a permis de progresser dans le choix des combinaisons de gènes capables de conférer une résistance plus durable à l'ensemble des races d'oïdium connues, en particulier chez le melon.

## 2.2. Sélection stabilisatrice dans une population de *Puccinia coronata*

Les rouilles sont parmi les maladies les plus dommageables sur les céréales. *Puccinia coronata*, agent de la rouille couronnée, est la principale maladie fongique de l'avoine. Les tentatives pour contrôler cette maladie avec des cultivars possédant des résistances spécifiques se heurtent à de fréquentes modifications dans la composition raciale des populations pathogènes. En effet, la large diffusion de ces cultivars s'accompagne généralement d'une multiplication des races non contrôlées par ces résistances. Des stratégies ont été proposées pour prolonger l'efficacité des gènes de résistance, comme par exemple l'utilisation de multilignées (lignées quasi-isogéniques ne différant que pour leurs gènes de résistance) ou de mélanges variétaux. Mais le succès de telles stratégies est basé sur l'hypothèse selon laquelle un pathotype possédant des virulences multiples (*i.e.* mutations qui surmontent tous les gènes de résistance présents dans le mélange) aurait un désavantage compétitif par rapport à un pathotype ne présentant pas de telles mutations aux gènes d'avirulence (sélection stabilisatrice) (Crill 1977). Les objectifs des travaux réalisés

au cours de mon post-doc ont consisté à estimer l'évolution des virulences dans une population hétérogène de *P. coronata* en absence présumée de pression de sélection pour tester l'hypothèse de la sélection stabilisatrice.

L'évolution de la virulence dans une population hétérogène de *P. coronata* issue de la reproduction sexuée a été analysée après 10 générations successives de reproduction asexuée sur une variété d'avoine sensible, en absence présumée de pression de sélection. L'évolution de la population a été analysée sur 300 isolats issus des générations G1, G5 et G10. La diversité de la virulence a été estimée sur 21 lignées d'avoine possédant chacune un gène de résistance spécifique. L'analyse de la première génération (G1) a révélé une importante diversité phénotypique chez *P. coronata* (98 races différentes sur les 100 isolats testés) et la présence d'isolats capables de surmonter jusqu'à 17 gènes de résistance. Sur les 100 isolats G1, la moyenne de virulence par isolat, c'est à dire le nombre moyen de gènes de résistance surmontés pour la population testée, est de 12,4. Après 10 générations asexuées successives réalisées sur une variété d'avoine sensible, ce nombre a significativement diminué à 9,1 (ANOVA,  $P = 0,01$ ). Une analyse par gène de résistance révèle que sur les 20 lignées informatives, le nombre d'isolats capables de surmonter un gène de résistance diminue de façon significative entre la première et la dixième génération pour 11 d'entre elles (Fig. 4).



**Figure 4.** Evolution des virulences chez *P. coronata* vis-à-vis de gènes de résistance; nombre d'isolats virulents dans la population initiale (■) et après 10 générations successives sur avoine sensible 'Starter' (□). Coefficient de sélection contre des virulences non nécessaires calculé entre la population initiales et la population G10 (▲).

En outre, le coefficient de sélection contre des virulences non nécessaires calculé entre la population initiales G0 et la population G10 (Leonard 1969) est supérieur à 0 pour 16 lignées. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de la sélection stabilisatrice [A33, C27, C33].

### *2.3. Conclusion*

Les travaux réalisés durant la période 1992-2000 m'ont permis d'acquérir une expertise et une reconnaissance nationale et internationale dans le domaine d'étude des oïdiums. Cette reconnaissance peut se mesurer par exemple au nombre important de revues réalisées sur le sujet pour des journaux à comité de lecture, par l'expertise de projets scientifiques nationaux et internationaux sur le sujet, ainsi que par le nombre important de formations assurées par notre équipe sur les techniques d'étude de ces parasites obligatoires, pour un public large allant des instituts techniques, à des groupes privés français ou étrangers (semenciers essentiellement) et des chercheurs. Je continue de maintenir une veille scientifique sur les oïdiums des cultures maraîchères et un soutien aux travaux d'amélioration de la résistance variétale contre ces maladies menés par l'unité GAFL (maintien d'une collection de souches, participation au comité de pilotage de projets scientifiques...).

Mon séjour postdoctoral aux Etats-Unis a été capital pour la définition de mon projet de recherche actuel. Il m'a permis d'appréhender expérimentalement l'étude de l'évolution des populations soumises à des pressions de sélection. Il m'a en outre permis d'enrichir mes connaissances dans de nombreux domaines, de l'épidémiologie à la génétique des populations.

Ces expériences de recherche m'ont amenées à réfléchir sur les stratégies d'échantillonnage dans les études de diversité microbienne. Cette réflexion a été menée entre 1998 et 2002 dans le cadre d'un groupe de travail du 'réseau français d'écologie et de biodiversité microbienne' (coordination C. Morris). Un des principaux défis des études de biodiversité des écosystèmes microbiens est de rendre compte de la diversité de populations extrêmement grandes et hétérogènes avec des échantillonnages qui représentent uniquement une petite fraction de ces populations. Pour formuler un avis objectif sur les stratégies d'échantillonnage aussi bien que les dispositifs expérimentaux adaptés à l'étude

de la biodiversité microbienne, l'analyse systématique de 753 publications échantillonnées au hasard à partir de la littérature scientifique primaire publiée entre 1975 et 1999 (2200 références) et relatif à la biodiversité microbienne a été effectuée. Cette analyse a concerné 8 écosystèmes en rapport avec le sol, l'eau, les plantes et les aliments. Mon activité a spécifiquement concerné l'étude de l'agroécosystème 'champignons pathogènes des plantes'. Sept thèmes d'étude ont été identifiés dans ces publications: composition et structure des populations, impact de facteurs environnementaux sur la biodiversité microbienne, biodiversité microbienne comme outil épidémiologique, développement de marqueurs pour faciliter le diagnostic et l'identification des microorganismes, méthodes d'étude de la biodiversité microbienne, phylogénie et taxonomie microbienne et découverte de nouveaux taxons microbiens. Pour la plupart des écosystèmes étudiés, et en particulier pour l'écosystème 'champignons pathogènes des plantes', ces publications illustraient d'un intérêt considérable et croissant pour les questions concernant l'effet de facteurs environnementaux spécifiques sur la biodiversité microbienne, l'hétérogénéité spatiale et temporelle de cette biodiversité ainsi que les mesures quantitatives de structure des populations. Notre analyse a permis de révéler que la description de la stratégie d'échantillonnage ou toute autre information concernant la représentativité de l'échantillon étaient souvent absentes des publications, qu'il n'y avait qu'une utilisation très limitée des tests statistiques d'hypothèses et que seulement une très faible quantité d'articles rapportait des résultats basés sur des tests multiples d'hypothèses (répétitions). Un article de revue rassemblant l'ensemble des écosystèmes a été publié dans *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [A18]. L'apport de cette étude a été important tant au niveau humain que scientifique pour la suite de mes travaux ayant trait à l'étude de la diversité phénotypique et génotypique des champignons phytopathogènes.

### 3. Durabilité de la protection biologique contre *Botrytis cinerea*

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* constitue une menace économique récurrente sur de nombreuses cultures. Un manque ou des pertes d'efficacité des méthodes de lutte utilisées en pratique sont régulièrement observés. *Botrytis cinerea* est, par exemple, considéré comme un agent pathogène à 'haut risque' en terme de résistance aux fongicides (Leroux 2004). La forte diversité et le potentiel de variabilité des populations de ce champignon peuvent expliquer ce phénomène. La nature multinucléée et hétérocaryotique du champignon, la présence de transposons dans le génome, l'existence de particules "virus-like" et le possible recours à la parasexualité ou à la reproduction sexuée peuvent expliquer le haut niveau de variabilité de ce champignon (Beever and Weeds 2004). En considérant ces caractères génétiques, on peut craindre une répercussion possible sur la durabilité de l'ensemble des méthodes de lutte, et en particulier sur la durabilité des méthodes alternatives à la lutte chimique récemment développées ou en cours de déploiement contre cet agent pathogène. Ceci d'autant plus que la capacité rapide d'adaptation de ce champignon à diverses pressions sélectives est avérée (Nicot et al. 2001).

La protection biologique contre *B. cinerea* a été intensivement étudiée au cours des dernières décennies et un nombre élevé d'agents de protection biologique a été identifié [A36]. Certains de ces agents sont maintenant disponibles sur le marché (Decoin et al. 2002; Elad and Stewart 2004; Fravel 2005; Paulitz and Belanger 2001).

Au niveau scientifique, malgré la grande quantité d'articles publiés sur la protection biologique contre les maladies cryptogamiques des plantes, la diversité de sensibilité et le potentiel évolutif des bioagresseurs vis-à-vis des agents de protection biologique restent des domaines de connaissances très parcellaires (Duffy et al. 2003) et la plupart des études réalisées sur le domaine concernent des agents de protection biologique producteurs d'antibiotiques. Plusieurs études décrivent ainsi la tolérance d'agents pathogènes à des antibiotiques produits par des antagonistes bactériens et fongiques (Li and Leifert 1994; Mazzola et al. 1995; Schouten et al. 2004).

D'autre part, sur un plan socio-économique, le contexte est de plus en plus favorable à l'utilisation de méthodes innovantes 'non chimiques' de contrôle des maladies des plantes pouvant éventuellement s'associer à la lutte chimique dans une approche globale de protection intégrée des cultures. Des investissements scientifiques et industriels



considérables sont à l'origine de la mise au point de ces méthodes. Compte tenu de ces investissements, une connaissance de leur durabilité constitue un élément clé à leur développement.

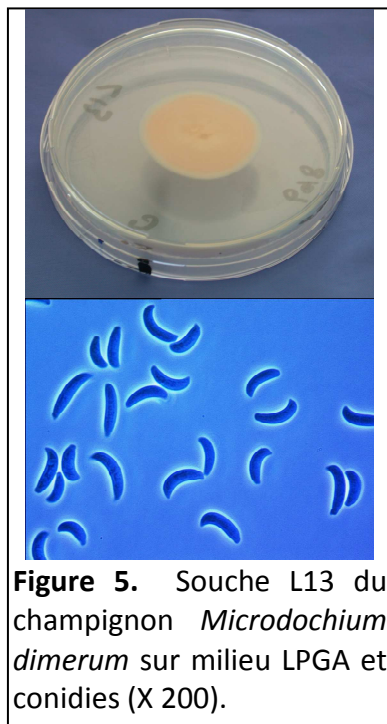
L'évaluation de la capacité de *B. cinerea* à contourner l'effet de la protection biologique a été réalisée selon deux approches complémentaires: (1) une approche d'épidémiologie et de biologie des populations pour étudier le contexte dans lequel s'exerce la pression de sélection et (2) une approche de biologie fonctionnelle pour évaluer le potentiel de contournement de méthodes de protection biologique par l'agent pathogène. Ces deux approches (populationnelle et fonctionnelle) étaient incluses dans le projet ANR-ADD Ecoserre (2005-2008). Des compléments de financement ont été obtenus, pour des aspects particuliers de l'étude de populations [SPE 2005-2007 'Diversité génétique et facteurs structurants des populations du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, à différentes échelles spatiales'], et pour l'aspect de biologie fonctionnelle [SPE 2007-2008 'Durabilité de la lutte biologique contre les maladies : résistance de *Botrytis cinerea* aux agents de lutte biologique' et bourse de thèse du gouvernement syrien pour Sakhr Ajouz (2005-2009)]. D'autre part un financement Européen a récemment été obtenu pour poursuivre ces investigations [FP7-KBBE-2010-4 PURE, 'Pesticide Use-and-Risk Reduction in European farming systems with Integrated Pest Management' (2011-2015)].

### *3.1. Développement d'outils tactiques et mobilisation dans des stratégies de protection intégrée*

**Principales collaborations :** GAFL-Avignon (J.L. Poessel) ; CBGP Montpellier (J. Fargues) ; CTIFL (Y. Trotin-Caudal) ; APREL (C. Taussig) ; Sociétés de production de biopesticides ; partenaires du projet ENDURE (INRA-UE 1254, Sophia; UMR1088, Dijon, CNR-Naples, IBMA, Rothamsted Research, Université de Lleida, Université de Wageningen) ; partenaires du projet USAGE (Université de Tours, Sileban, Invenio, GRAB).

Plusieurs activités complémentaires ont été développées en vue d'améliorer les stratégies de protection intégrée des cultures maraîchères sous abri et favoriser une réduction de l'utilisation d'intrants, notamment de pesticides. Les travaux que j'ai réalisés sur ce sujet ont été principalement focalisés sur la tomate du fait de son importance

économique et parce qu'elle constitue une plante modèle au sein de l'INRA. Pour la production du marché de frais, cette espèce est essentiellement cultivée sous abri. Dans ce système de culture intensif et techniquement sophistiqué, les conditions sont fréquemment favorables au développement de bioagresseurs dont la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. Il n'existe pas de variété résistante ni aucune méthode de lutte, qui utilisée seule, donne pleinement satisfaction. Le développement de méthodes alternatives à la lutte chimique et une approche de protection intégrée sont donc nécessaires.



**Figure 5.** Souche L13 du champignon *Microdochium dimerum* sur milieu LPGA et conidies (X 200).

Suite à des travaux précédemment réalisés dans l'équipe, une souche du champignon ascomycète *Microdochium dimerum* isolée en 1990 (souche L13, Fig. 5), a montré un fort potentiel antagoniste pour la lutte anti-*Botrytis* sur la tomate sous abris (Decognet et al. 1999) ; [A31, A42]) et sa valorisation industrielle est en cours. Afin d'optimiser son utilisation en conditions de culture de la tomate, sa compatibilité avec d'autres méthodes de protection contre les principaux bioagresseurs présents sur tomate de serre a été évaluée. Outre la pourriture grise, *Oidium neolycopersici* et *Bemisia tabaci* posent des problèmes récurrents sur la tomate cultivée sous serre. Parmi les méthodes alternatives à la lutte chimique, le champignon *Lecanicillium lecanii* a été

récemment commercialisé en tant que myco-insecticides (Mycotal) contre les aleurodes. Par ailleurs, l'extrait de la renouée de Sakhaline (*Reynoutria* (ou *Fallopia*) *sachalinensis*, nom commercial : Milsana) a montré une excellente efficacité pour contrôler les oïdiums des cultures maraichères [A42, C21, C37]. Dans le cadre des projets AIP PIC Serre et ANR-ADD Ecoserre, une étude a été conduite pour évaluer la faisabilité de combiner l'utilisation de L13 avec celles du Mycotal et du Milsana (collaboration J. Fargues, CBGP, Montpellier). Cette étude démontre que *M. dimerum*, *L. lecanii* et l'extrait de plante *R. sachalinensis* sont compatibles entre eux et peuvent donc être appliqués ensemble ou de façon alternée sur une culture de tomate. Ces résultats sont prometteurs pour envisager un contrôle efficace en protection intégrée de la tomate sous serre en complément d'autres méthodes de lutte, voir même en agriculture biologique [A13]. Ces résultats ont été repris par la Délégation aux Partenariat avec les Entreprises de l'Inra dans la lettre INRA aux entreprises 'en direct des

labos' :

[http://www.inra.fr/les\\_partenariats/collaborations\\_et\\_partenaires/entreprises/en\\_direct\\_des\\_labos/developpement\\_de\\_methodes\\_de\\_protection\\_biologique\\_pour\\_la\\_production\\_de tomates](http://www.inra.fr/les_partenariats/collaborations_et_partenaires/entreprises/en_direct_des_labos/developpement_de_methodes_de_protection_biologique_pour_la_production_de tomates).

En plus de ces travaux, la recherche de méthodes alternatives à la lutte chimique a été poursuivie dans le cadre de divers projets financés. Ainsi le projet européen Interreg-Alcofra 'VALORT' (collaboration APREL, CA06, Université de Turin, 2010-2012) a permis de tester en conditions contrôlées et en condition de production (pour la laitue) l'efficacité de divers extraits de plantes et préparations microbiennes contre les bioagresseurs cryptogamiques majeurs de la tomate et de la laitue [C3, C34, C36].

Dans le cadre du projet ANR-Emergence Bio "Hortibiopé" (collaboration GAFL, SQPOV, PSH – INRA Avignon, 2009-2010) une molécule d'origine végétale a été évaluée pour son efficacité contre un panel d'agents pathogène cryptogamiques des plantes maraichères et des arbres fruitiers. Une déclaration d'invention en vue de déposer un brevet est en cours de rédaction sur ce dernier point.

Enfin, en parallèle à ces activités, j'ai également été sollicitée pour participer à une synthèse collective dans le cadre du projet européen REX "ENDURE" qui a abouti à la rédaction d'un chapitre de livre sur l'état de l'art et les perspectives d'avenir de la protection biologique contre les ravageurs, maladies et adventices [A36]. En ce qui concerne les agents pathogènes à dissémination aérienne, des situations très contrastées ont été mise en évidence, avec par exemple très peu de références sur la protection biologique contre les rouilles et les mildious et comparativement un grand nombre de références contre *Botrytis* spp. De nombreux microorganismes antagonistes ont ainsi été identifiés pour contrôler *B. cinerea* (144 espèces différentes de bactéries, levures, champignons filamenteux ou oomycètes). La plupart des études ont été réalisées *in vitro* (tests de confrontation en boîtes de Petri) et sur plantes en conditions contrôlées et très peu d'études sont allées jusqu'à des essais en conditions de culture. Dans cette étude, il est apparu également que l'étude fine du mode d'action des agents de protection biologique et l'estimation de leur durabilité étaient encore assez peu étudiées malgré leur importance pour optimiser l'utilisation et assurer l'efficacité de ces microorganismes au champ.

### 3.2. *Evaluation fonctionnelle du risque de contournement de la protection biologique par Botrytis cinerea*

**Principales collaborations :** INRA Bioger, Versailles-Grignon (S. Fillinger, A.S. Walker); Université d'Avignon (M. El Maâtaoui).

L'approche de biologie fonctionnelle pour évaluer le potentiel de contournement de méthodes de protection biologique par l'agent pathogène *B. cinerea* est ma thématique de recherche majeure depuis 2005. L'objectif global est d'évaluer le risque potentiel de perte d'efficacité de la protection biologique vis-à-vis de *B. cinerea*. Une perte d'efficacité possible d'un agent de protection biologique au champ peut résulter de la sélection d'isolats de l'agent pathogène préexistant dans les populations naturelles, et ayant une sensibilité réduite à l'agent de protection biologique. Elle peut également survenir si l'agent pathogène a la capacité de produire des mutants ayant une sensibilité réduite à l'agent de protection biologique, sous la pression de sélection continue exercée par l'utilisation du produit.

Deux points majeurs ont été abordés: la fréquence et les mécanismes de contournement de la protection biologique par *B. cinerea* et le devenir des souches "contournantes". Nos efforts de recherche se sont focalisés sur la pyrrolnitrine, un antibiotique produit par divers antagonistes bactériens, dont certains sont efficaces contre *B. cinerea*. Ce choix a été fait pour des raisons agronomiques (mode d'action fréquemment rencontré chez les agents de protection biologique en particulier contre *B. cinerea*), scientifiques (mode d'action aisément identifiable et nombreuses références sur le domaine) et techniques (relative facilité de travailler avec ce mode d'action).

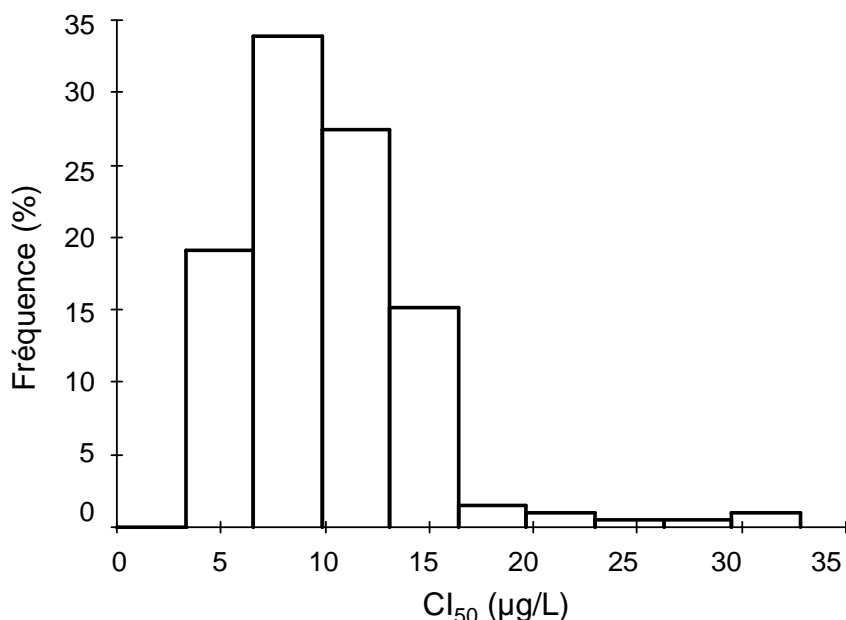
Ce projet a bénéficié de l'appui scientifique et technique d'un étudiant en thèse (Sakhr Ajouz, bourse du gouvernement Syrien) que j'ai encadré pendant la période 2005-2009.

#### **Fréquence et mécanismes de contournement**

Dans un premier temps, nous avons établi la sensibilité de base d'isolats de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine. Dans un second temps, nous avons estimé la possibilité d'évolution de la sensibilité de *B. cinerea* vis-à-vis de cet antibiotique. Les résultats obtenus ont été validés avec un antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine, *Pseudomonas chlororaphis* ChPhzS24 (Mazurier et al. 2009), souche fournie par Philippe Lemanceau (INRA – Dijon).

### Diversité de la sensibilité des agents pathogènes à des biofongicides

Assez peu d'études s'intéressent à la distribution de la sensibilité des agents pathogènes aux agents de protection biologique, alors que ce type d'étude est classiquement réalisé pour les fongicides, en particulier chez *B. cinerea* (Lennox and Spotts 2003; Myresiotis et al. 2008). L'étude *in vitro* de la sensibilité d'une large collection d'isolats de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine a révélé que les 204 isolats de *B. cinerea* testés ne sont pas affectés de la même manière par l'antibiotique [A2]. Ce champignon présente une large gamme de sensibilité à la pyrrolnitrine: un facteur de 8,4 sépare l'isolat le moins sensible de l'isolat le plus sensible sur la base de la germination des spores (Fig. 6).



**Figure 6.** Distribution de la sensibilité à la pyrrolnitrine chez 204 isolats de *Botrytis cinerea* collectés entre 1987 et 2008. La  $CI_{50}$  correspond à la concentration de pyrrolnitrine (en  $\mu\text{g/L}$ ) inhibant 50% de la germination des spores de *B. cinerea*.

Le niveau de sensibilité mesurée par les valeurs de concentration inhibant 50% de la germination des spores ( $EC_{50}$ ) de ces isolats ne suit pas une distribution normale. L'estimation du modèle de distribution le plus probable (par la méthode de 'model-based clustering') suggère que ces isolats sont subdivisés en 3 compartiments présentant des caractéristiques différentes de sensibilités. Il existe en particulier des isolats présentant une sensibilité significativement moindre à la pyrrolnitrine. *In vitro*, ces isolats produisent

environ 10 fois plus de spores que les isolats plus sensibles en présence de faibles doses de pyrrolnitrine ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). D'autre part, la moindre sensibilité de ces isolats ne semble pas associée à une perte d'agressivité sur tomate. Ces résultats démontrent que des isolats moins résistants à la pyrrolnitrine et présentant un niveau de 'fitness' équivalent aux souches sensibles préexistent dans les populations naturelles de *B. cinerea*.

La moindre sensibilité à cet antibiotique semble être associée à une résistance à de multiples fongicides, déjà impliqués dans le caractère de résistance multiple aux fongicides et à d'autres métabolites d'origine naturelle (De Waard et al. 2006; Kretschmer et al. 2009; Schoonbeek et al. 2001; Schoonbeek et al. 2002; Schouten et al. 2008). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent donc que les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) sont potentiellement impliqués dans la résistance modérée à la pyrrolnitrine. Des travaux sont envisagés pour déterminer le lien entre la moindre sensibilité à la pyrrolnitrine et le caractère MDR (Multi Drug Resistant) des isolats moins sensibles sur un plus grand nombre d'isolats de *B. cinerea* et d'étudier le rôle des transporteurs ABC dans cette résistance modérée chez *B. cinerea*.

Malgré cette diversité dans la sensibilité des isolats à l'antibiotique, un niveau équivalent de protection est obtenu pour tous les isolats de *B. cinerea* avec l'antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine *P. chlororaphis* ChPhzS24 inoculé à  $10^8$  CFU/ml sur plants de tomate. Les résultats obtenus par des tests de confrontation *in vitro* entre *B. cinerea* et *P. chlororaphis* ChPhzS24, confirme que la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* est inhibée de façon identique, quel que soit leur niveau de sensibilité à la pyrrolnitrine. Ces résultats suggèrent que *B. cinerea* est efficacement contrôlé par cet antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine. Cependant, la mise en évidence de ces isolats pose la question de leur évolution possible vers une résistance plus grande à la pyrrolnitrine lorsqu'ils seront soumis à une forte pression de sélection.

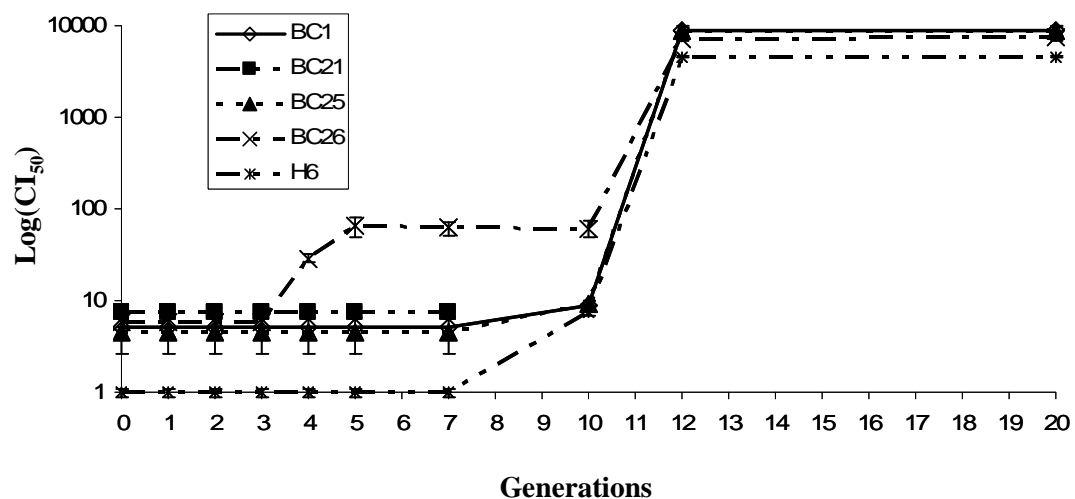
L'établissement d'une ligne de base ('baseline') de sensibilité à la pyrrolnitrine sera donc utile dans le futur, pour suivre les modifications éventuelles de la sensibilité à cet antibiotique, et aux agents de protection biologique le produisant, dans les populations naturelles de *B. cinerea*.

**Tableau 1.** Composition des milieux de culture utilisés pour la production de générations successives des différents isolats de *Botrytis cinerea*

Conditions de culture	Isolats testés	Nomenclature des générations <sup>a</sup>	Composition des milieux pour la production des différentes générations <sup>b</sup>							
			G0 <sup>c</sup>	G1-G10	G11-G12	G13-G14	G15-G16	G17-G18	G19-G20	
Milieu riche	BC1, BC25, BC26, H6	GnC	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA
Milieu pauvre	BC1, BC25, BC26, H6	GnN	PDA	Glucose 1 g L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-
Pyrrolnitrine	BC1, BC25, BC26, H6	GnP	PDA	10 µg L <sup>-1</sup>	100 µg L <sup>-1</sup>	500 µg L <sup>-1</sup>	1000 µg L <sup>-1</sup>	2000 µg L <sup>-1</sup>	4000 µg L <sup>-1</sup>	4000 µg L <sup>-1</sup>
Iprodione	BC1, BC25, BC26	GnI	PDA	5 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	20 mg L <sup>-1</sup>	40 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> n est le nombre de générations réalisées (de 0 à 20)

<sup>b</sup> pour pyrrolnitrine et iprodione, les doses utilisées ont été ajoutées à un milieu PDA.



**Figure 7** Evolution de la résistance à la pyrrolnitrine pour 5 souches de *B. cinerea* durant 20 générations successives sur un milieu PDA amendé de pyrrolnitrine. A partir de la souche parentale, 10 générations successives ont été produites en présence de 10 µg L<sup>-1</sup> de pyrrolnitrine. A partir de la génération G10P, 10 générations successives ont été produites sur des doses croissantes de pyrrolnitrine (de 100 µg L<sup>-1</sup> à 4000 µg L<sup>-1</sup>). La CI<sub>50</sub> correspond à la concentration de pyrrolnitrine (en µg L<sup>-1</sup>) inhibant 50% de la germination des spores de *B. cinerea*.

### *Evolution expérimentale sous pression de sélection*

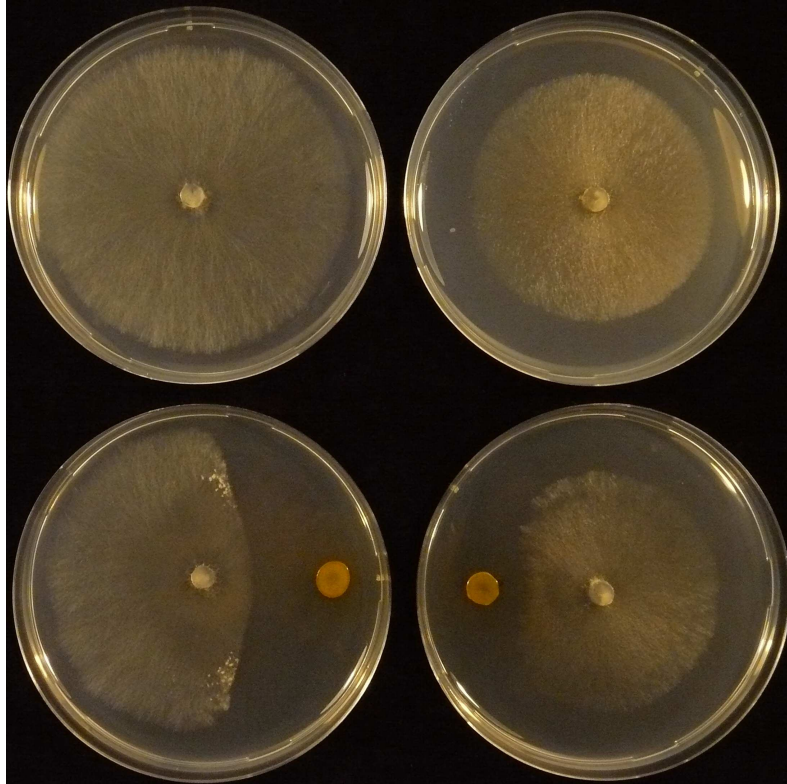
Afin d'évaluer une érosion possible de la sensibilité à la pyrrolnitrine chez *B. cinerea*, 10 générations successives ont été produites *in vitro* pour 5 souches en présence d'une dose sub-létale de l'antibiotique (dose inhibant plus de 90% de la croissance du champignon ; Tableau 1) [A8]. Parmi les 5 souches, deux ont évolué vers une moindre sensibilité à l'antibiotique, avec un facteur de résistance (FR) d'environ 10 entre la souche évoluée et la souche parentale dès la 10ème génération (Fig. 7). La production de 10 générations supplémentaires pour 4 de ces souches, avec des doses croissantes de pyrrolnitrine, a résulté dans le développement de variants (mutants) de *B. cinerea* ayant un fort niveau de résistance à l'antibiotique (FR > 1000).

Ce niveau de résistance paraît stable en absence de pression de sélection. Les 4 souches testés dans cette étude acquièrent un niveau semblable de résistance à la pyrrolnitrine quelque soit le phénotype des souches parentales d'origine (profil de résistance différents à divers fongicides). Ce résultat suggère que le développement d'une résistance à la pyrrolnitrine chez *B. cinerea* est indépendant du profil original de résistance aux fongicides des souches. Il serait maintenant intéressant de comparer l'évolution des souches MDR détectés dans les populations naturelles de *B. cinerea* à l'évolution des souches testées au cours de cette étude.

Ces mutants présentent également une sensibilité significativement réduite *in vitro* à l'antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine, *P. chlororaphis* ChPhzS24 (Fig. 8).

Ces travaux fournissent donc des évidences que *B. cinerea* est capable de développer rapidement et graduellement un haut niveau de résistance à la pyrrolnitrine et parallèlement une moindre sensibilité à un agent de protection biologique producteur de pyrrolnitrine [A8]. Même si la réalisation de repiquage en série *in vitro* est probablement différente de ce qui peut réellement se passer dans la nature, le nombre de générations réalisées est réaliste par rapport au nombre théorique de cycles que le champignon peut faire sur sa plante hôte pendant une saison de culture (Holz et al. 2004; Nicot et al. 2001).





**Figure 8.** Sensibilité *in vitro* de la souche BC1 de *Botrytis cinerea* (gauche) et de la souche évoluée BC1G20P résistante à la pyrrolnitrine (droite) à la bactérie productrice de pyrrolnitrine *Pseudomonas chlororaphis* ChPhzS24, après 4 jours de culture à 21°C.

Ces résultats ont ouverts des perspectives scientifiques intéressantes, en particulier pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de résistance de *B. cinerea* à cet antibiotique (collaboration UR BIOGER, Grignon). Les mutants résistants à la pyrrolnitrine sont résistants au fongicide iprodione, suggérant ainsi qu'une pression exercée par la pyrrolnitrine sur le champignon conduit à une résistance au fongicide. Réciproquement, la production de générations successives sur iprodione (Tableau 1) a conduit à une résistance de *B. cinerea* à l'antibiotique. Mais alors que les 4 souches sélectionnées sur la pyrrolnitrine présentent une résistance forte à l'iprodione, certaines souches sélectionnées sur l'iprodione ne présentent qu'une résistance modérée à la pyrrolnitrine. Ces résultats suggèrent que certains mécanismes de résistance vis à vis de ces molécules ne sont pas totalement similaires. Tous les mutants sélectionnés sur pyrrolnitrine ou sur l'iprodione au cours de cette étude présentent une sensibilité accrue à la pression osmotique suggérant une anomalie dans la voie de transduction des signaux d'osmosensibilité. Dans le cas d'études réalisées en laboratoire sur des mutants de *B. cinerea* dont la résistance a été induite artificiellement par l'action d'une pression de sélection ou par des traitements mutagènes, la résistance croisée entre les dicarboximides et les phenylpyrroles, analogues de structures de la pyrrolnitrine, a déjà été mise en évidence (Faretra and Pollastro 1993; Hilber et al. 1995; Leroux 2004; Ziogas et al. 2005). Les mécanismes de la résistance élevée de *B. cinerea* aux phenylpyrroles ont été étudiés chez *B. cinerea* (pour revue voir (Leroux 2004), révélant ainsi que la résistance à cette famille de fongicides est généralement associée à une résistance aux dicarboximides et aux hydrocarbures aromatiques. Des études moléculaires ont d'autre part montré qu'une histidine kinase osmosensible détermine la résistance à ces fongicides (Cui et al. 2004; Cui et al. 2002) et diverses mutations dans le gène *bos1* ont été mises en évidence chez des mutants résistants aux fongicides.

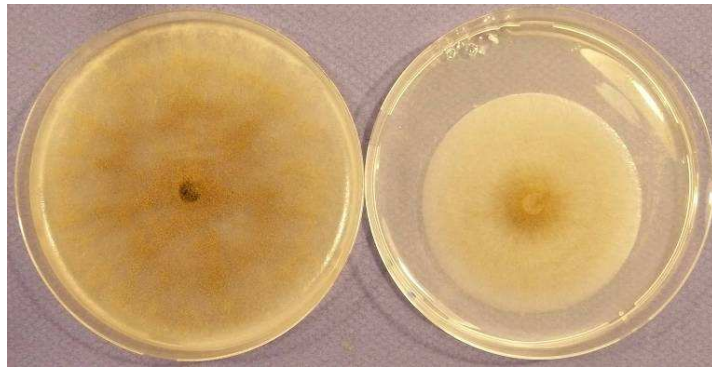
Afin d'étudier les déterminants moléculaires de la résistance de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine, le gène *bos1* codant pour une histidine kinase osmosensible de classe III a donc été séquencé chez les souches sensibles et les mutants résistants. La comparaison des séquences a mis en évidence que les résistances sont systématiquement associées à une mutation ponctuelle dans ce gène. La combinaison de différentes mutations et le type de modifications observées, semblent impacter de façon différente le phénotype de résistance à la pyrrolnitrine et aux fongicides. Ces mutations aboutissent à la fois à une résistance à la pyrrolnitrine et à l'iprodione. Certaines semblent aboutir à une forte résistance à l'iprodione

et une résistance modérée à la pyrrolnitrine. Enfin, des mutations similaires ont été mises en évidence dans différentes lignées d'un même isolat alors qu'elles sont systématiquement différentes entre isolats [Fillinger S., Ajouz S., Nicot P.C., Leroux P., Bardin M. Structural and Functional Comparison of Pyrrolnitrin- and Iprodione-induced Modifications in the Class III histidine-kinase *Bos1* of *Botrytis cinerea*, soumis]. Une conséquence pratique de ces résultats est que les traitements fongicides peuvent modifier le niveau de sensibilité de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine et par conséquent à des agents de protection biologiques producteurs de cet antibiotique. Ces traitements peuvent-ils également modifier le niveau de sensibilité de *B. cinerea* à des agents de protection biologique producteurs d'autres antibiotiques que la pyrrolnitrine ? La réponse à cette question constitue une perspective spécifique à ce travail.

Au delà de mutations ponctuelles constatées dans le gène cible, un aspect plus fondamental des perspectives ouvertes par ces résultats concerne la question des mécanismes impliqués dans l'adaptation rapide de *B. cinerea* à des pressions sélectives: quelles sont les autres modifications observées dans le génome de *B. cinerea* au cours de ce processus d'adaptation? Une première analyse a montré que la taille des allèles de 9 loci microsatellites globalement répartis sur l'ensemble du génome de *B. cinerea* n'est pas modifiée quelle que soit la pression de sélection appliquée sur le champignon [A7]. La compréhension des mécanismes d'évolution de *B. cinerea* nécessite d'étendre cette étude à l'ensemble du génome. La connaissance du génome complet (Amselem et al. 2011) et l'existence d'outils de génomique adaptés à l'étude du potentiel évolutif de *B. cinerea* font de ce champignon un modèle idéal pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation à des pressions sélectives. La mise en évidence de modifications dans le génome de *B. cinerea* devrait permettre d'expliquer la grande diversité génétique observée au sein des populations naturelles de ce champignon et les facteurs qui facilitent une adaptation rapide à des pressions sélectives. Ces résultats devraient aboutir à des informations factuelles permettant d'élaborer des stratégies d'utilisation optimale des méthodes de protection alternatives.

### Devenir des souches "contournantes"

La capacité d'isolats de *B. cinerea* résistants à la pyrrolnitrine à se développer dans une population naturelle dépend de la stabilité du caractère de résistance acquis et du coût adaptatif ('fitness') associé à cette résistance. Une bonne stabilité de la résistance à l'antibiotique, en absence de pression sélective, a été mise en évidence *in vitro* [A8]. La comparaison entre les mutants résistants à la pyrrolnitrine et leurs parents sensibles pour la croissance mycélienne, la sporulation et l'agressivité sur plantes a révélé que la résistance à la pyrrolnitrine est systématiquement associée à un fort coût adaptatif en absence de pression de sélection. Des différences significatives ont en effet été mises en évidence entre les générations résistantes à la pyrrolnitrine et les souches parentales sensibles, pour la croissance mycélienne (Fig. 9) et la sporulation mesurées *in vitro*, et l'agressivité sur pomme et sur plante de tomate [A8].



**Figure 9.** Croissance mycélienne sur milieu PDA de la souche parentale BC1 sensible à la pyrrolnitrine (gauche) et du mutant BC1G20P résistant à la pyrrolnitrine (droite) après 4 jours d'incubation à 21°C.

Cette réduction de 'fitness' laisse penser que ces isolats ne survivraient pas en conditions naturelles. Cette hypothèse est corroboré par le fait que des niveaux élevés de résistance au fludioxonil, analogue de structure de la pyrrolnitrine, sont rarement observés au champ chez *B. cinerea* (Baroffio et al. 2003; Vignutelli et al. 2002). D'autre part, en plus d'être impliqué dans la résistance, les gènes liés à la cascade MAP kinase semble aussi être impliquée dans la réduction de croissance mycélienne ou la diminution de pathogénicité chez *B. cinerea* (Liu et al. 2008; Viaud et al. 2006). Les gènes liés à la cascade MAP kinase ont également un rôle dans l'adaptation du champignon à des stress osmotiques et oxydatifs (Viaud et al. 2006).

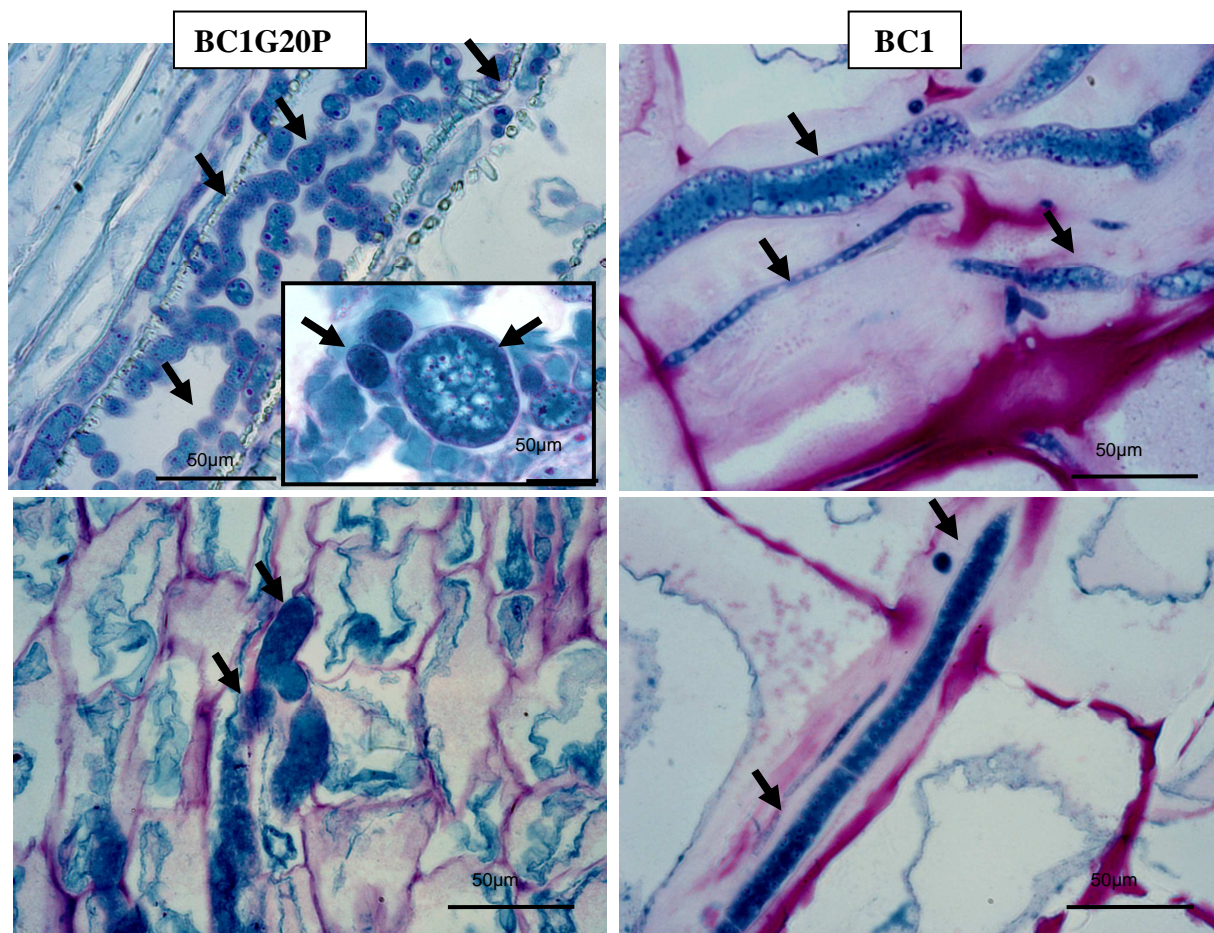


Figure 10. Structure mycélienne dans les tissus du pétiole de la tomate du mutant résistant à la pyrrolnitrine BC1G20P (cellules mycéliennes courtes et structures ressemblant à des chlamydospores) et de la souche parentale BC1 sensible à la pyrrolnitrine.

Des observations cytohistologiques menées sur tomates (collaboration Université d'Avignon) ont confirmé que la souche sensible à la pyrrolnitrine attaque le pétiole rapidement et envahit la tige, alors que le mutant résistant à la pyrrolnitrine ne s'étend pas au-delà du pétiole, suggérant que des mécanismes de défenses se mettent en place de façon efficace dans cette zone de la plante [A1].

Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une coloration brune apparaît au niveau de la zone d'abscision entre la feuille et la tige. De plus, le mutant résistant à la pyrrolnitrine forme dans la plante un mycélium anormal et des cellules ressemblant à des chlamydospores (Fig. 10). Ces différences morphologiques pourraient expliquer en partie les différences de croissance mycélienne observées entre le mutant résistant et la souche sensible dans la plante. Des études en microscopie électronique à transmission seront réalisées afin d'explorer les modifications cellulaires éventuelles entre les deux types de cellules, en présence et en absence de pyrrolnitrine.

Cette étude montre pour la première fois que l'acquisition d'une moindre sensibilité à un agent de protection biologique, par un champignon pathogène des plantes, est associée à un fort coût adaptatif en absence de pression sélective. En terme pratique, le développement d'isolats de *B. cinerea* avec une résistance élevée à la pyrrolnitrine dans les populations naturelles, si ça devait arriver, ne devrait donc pas nécessairement mettre en danger l'efficacité d'agents de protection biologiques producteurs de pyrrolnitrine.

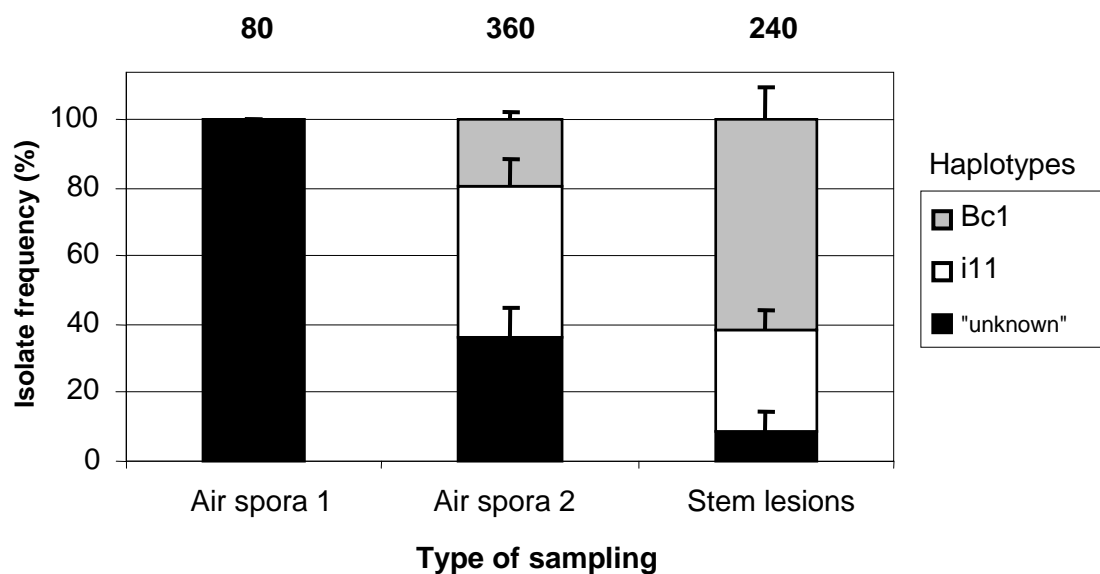
### 3.3. Dynamique de la pression d'inoculum de *Botrytis cinerea*

**Principales collaborations :** INRA Bioger, Versailles-Grignon (A.S. Walker) ; INRA URIH, Sophia-Antipolis (C. Poncet, T. Boulard) ; INRA Santé Végétale, Bordeaux (M. Fermaud) ; INRA Alenya (G. Ridray) ; INRA BioSP, Avignon (R. Senoussi) ; CTIFL, Balandran (Y. Trottin-Caudal).

Les études de dynamique des populations de *B. cinerea* ont été essentiellement menées dans des serres de tomate. L'inoculum aérien présent au dessus des plantes dans une serre peut provenir de la sporulation sur les plantes malades (inoculum endogène). Il peut également inclure des spores exogènes de diverses provenances géographiques et de divers types de substrats (dont les 200 espèces hôtes de *B. cinerea*). Selon son abondance et ses

propriétés biologiques, l'arrivée d'inoculum exogène peut affecter directement l'efficacité de méthodes de lutte. Par ailleurs, les flux de spores entre l'intérieur et l'extérieur de la serre influencent la proportion relative de chacun des deux types d'inoculum et peuvent modifier l'effet de la pression sélective exercée sur les populations dans la serre par les interventions phytosanitaires. Une approche de biologie des populations pour étudier la structuration des populations de *B. cinerea* à différentes échelles géographiques, et élucider les facteurs qui régissent la dynamique de son évolution à des échelles temporelles différentes a donc été réalisée. Ce travail collaboratif a essentiellement été conduit dans l'équipe de Mycologie par V. Decognet (Ingénieure de l'équipe). Mon implication dans ces travaux a d'abord consisté à préciser les questions de recherche, participer à la construction du projet de recherche, définir la stratégie expérimentale à déployer pour y répondre, contribuer à certaines expérimentations (en particulier dans le cadre des campagnes d'échantillonnage) et participer à l'analyse des résultats (en particulier lors de réunions régulières avec les personnes concernées par ce projet). Mon implication s'est accrue depuis le retrait progressif depuis 2008 de V. Decognet de l'équipe, en particulier pour la valorisation scientifique des résultats obtenus. D'autre part, afin de compléter ma formation dans le domaine de la génétique des populations, j'ai participé à l'école chercheur 'génétique des populations' organisée par l'INRA (Montpellier, 2002).

Ces travaux ont permis de mettre en évidence un rôle épidémiologique déterminant de l'inoculum secondaire produit sur les plantes malades (inoculum endogène) par rapport à l'inoculum exogène qui pénètre dans la serre. L'importance épidémiologique de l'inoculum endogène pour la pourriture grise a d'abord été mise en évidence dans quatre compartiments d'une serre expérimentale (collaboration Y. Trottin-Caudal, Ctifl-Balandran), par la caractérisation génotypique, à l'aide de microsatellites (Fournier et al. 2002), d'isolats, prélevés dans l'air ou sur des plantes malades à plusieurs dates avant et après l'inoculation de quelques plantes avec deux souches connues [A9]. Rapidement après inoculation, ces deux souches ont remplacé les isolats initialement présents dans la sporée aérienne (Fig. 11).



**Figure 11.** Evolution de la fréquence d'haplotypes de *Botrytis cinerea* (profils SSR – 9 microsattellites) observés en culture de tomate, 4 jours avant ("Air spora 1"), puis 14 jours ("Air spora 2") et 60 jours ("Stem lesions") après inoculation localisée de quelques plantes à l'aide de deux souches de référence (Bc1 et i11). Les barres indiquent l'erreur standard de la moyenne pour 4 compartiments de 60 m<sup>2</sup>. Les nombres indiquent les effectifs d'isolats prélevés à chaque date.

Cette étude expérimentale a été complétée par la caractérisation génotypique, à l'aide des mêmes microsattellites, des populations de *B. cinerea* dans un contexte de serres de production commerciale sur des sites représentant deux zones de production importante de la tomate dans le sud de la France. L'analyse a montré sur chaque site à la fois une grande diversité sur une fraction de la population, et un niveau global élevé de clonalité lié à la très forte prédominance de quelques haplotypes particuliers [C41, C48, C50]. Un manuscrit est en cours de rédaction sur ce thème [Bardin, M., Decognet, V., Nicot P.C. Unexpected predominance of a small number of haplotypes in greenhouse populations of *Botrytis cinerea*]. Ces résultats obtenus sur des effectifs importants (environ 700 isolats pour chaque étude) contrastent avec l'absence ou le faible niveau de clonalité décrit chez *B. cinerea* pour d'autres agrosystèmes (Tableau 2), notamment en plein champ (Fournier and Giraud 2008; Karchani-Balma et al. 2008; Vaczy et al. 2008). Ils confortent l'hypothèse d'un développement épidémique polycyclique sous serre, lié à la production d'inoculum endogène, combiné à des intrusions d'inoculum exogène dans la serre.



Tableau 2. Proportion d'haplotypes différents entre populations de *Botrytis cinerea* caractérisées à l'aide des marqueurs microsatellites décrits par (Fournier et al. 2002).

Lieu de l'étude	Origine des isolats	Nombre de microsatellites utilisés	Nombre de populations échantillonnées	Nombre d'isolats	Nombre d'haplotypes distincts	Proportion d'haplotypes distincts entre isolats <sup>b</sup>	Référence
France	Tomate, air	9	8	712	112	0.16	notre étude
Bangladesh	Pois chiche	9	4	146	69	0.47	(Isenegger et al. 2008)
Hongrie	Vigne	5	12	109	55	0.50	(Vaczy et al. 2008)
Tunisie	Tomate, vigne, fraise, pois	9	13	153	120	0.78	(Karchani-Balma et al. 2008)
France	Vigne, ronce	8	15	184	180	0.98	(Fournier and Giraud 2008)

Cette hypothèse a ensuite été confortée par une analyse spatiotemporelle du développement des épidémies et des changements de la structure de populations dans plusieurs serres commerciales de tomate du sud de la France, avec des échantillonnages mensuels. La cartographie du développement des épidémies de *B. cinerea* a mis en évidence une répartition aléatoire de la maladie ou en foyer selon les serres étudiées (collaboration unité de Biostatistique et Processus Spatiaux, Avignon). Le génotypage de centaines d'isolats a permis de mettre en évidence de manière détaillée la mise en place de clonalité dans les serres au cours de saisons de culture successives. La rédaction de deux manuscrits est en cours sur ces aspects.

Par ailleurs, les données de trois années d'étude sur la diversité génotypique de *B. cinerea* dans les serres de tomate du Sud-est de la France concordent pour suggérer que les serres sont approvisionnées (à un pas de temps et par des mécanismes qui restent à déterminer) par des spores issues d'une population extrêmement diversifiée, dont la taille et l'étendue géographique sont inconnues mais présumées très larges. La très grande majorité de ces spores ne contribue que de façon marginale au développement épidémiologique de la pourriture grise sur la tomate. Se pose donc la question d'une spécificité d'hôte éventuelle chez ce champignon considéré comme très polyphage, une hypothèse renforcée par l'observation de successions de populations différentes entre souches 'tomates sous serres' et 'vigne' [C48] ou au cours d'une rotation culturale tomate-laitue en 2002-2004 [C50]. Cette

problématique liée à l'aérobiologie de *B. cinerea* est maintenant développée par Christel Leyronas, ingénieure arrivée dans l'équipe en 2005 et a abouti à la rédaction de deux articles cosignés [A5, A10].

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les pressions de sélection exercées par les interventions phytosanitaires des serristes constituent potentiellement un facteur essentiel de l'évolution des populations attaquant la tomate à l'intérieur de la serre. Il serait maintenant intéressant de tester l'impact de pratiques phytosanitaires telles que l'utilisation d'agents de lutte biologique sur l'évolution de la structure des populations de *B. cinerea* dans une serre de tomate.

### 3.4. Conclusion

Les travaux menés sur la durabilité de la protection biologique représentent la première étude de ce type sur le sujet au niveau international. Les travaux d'évolution expérimentale ont permis de démontrer la capacité rapide d'adaptation de souches de *B. cinerea* à un antibiotique produit par des agents de protection biologique. Cette acquisition de résistance s'accompagne chez *B. cinerea* d'un fort coût adaptatif ('fitness'). Le haut niveau de résistance de *B. cinerea* à cet antibiotique est systématiquement accompagnée d'une résistance à certains fongicides et semble lié à des mutations ponctuelles dans le gène *bos1* codant pour une histidine kinase osmosensible. Ces travaux m'ont, en outre, permis de suivre toutes les étapes de l'encadrement d'un étudiant en thèse. Cette thèse a abouti à la publication de 4 articles scientifiques (un dernier vient d'être soumis pour publication). Les perspectives concernant ces travaux seront détaillées dans mon projet scientifique car elles constituent l'essentiel de mes activités prévues pour les années à venir.

L'approche de biologie des populations a apporté des réponses quand au contexte dans lequel s'exerce la pression de sélection pour une culture sous abri. Cette approche a en particulier montré que les populations de *B. cinerea* évoluent vers une prédominance d'un nombre restreint d'haplotypes, suggérant la sélection de quelques souches par la plante hôte et un fort impact de l'inoculum endogène. Ce résultat a une implication notable pour la durabilité des méthodes de lutte contre ce champignon dans ces conditions de culture.

En parallèle à ces études centrées sur la serre de tomate, j'ai démarré en collaboration avec Cindy Morris des travaux portant sur les sources potentiellement non agricole

d'inoculum de *B. cinerea* Ces travaux s'inscrivent parfaitement dans un des objectifs du projet de l'UR407 qui est de comprendre l'écologie évolutive des agents pathogènes au cours de leur cycle de vie, y compris en dehors des habitats agricoles. Dans ce cadre, j'ai participé à la rédaction d'un article qui légitime cette approche et montre sa pertinence pour la Pathologie Végétale [A11]. Du fait du caractère polyphage présumé de *B. cinerea* et de sa capacité de développement saprophyte, la question de sources potentielles d'inoculum en dehors du contexte agricole classiquement considéré se pose. Une étude préliminaire réalisée dans le cadre du projet SPE 'Identification d'habitats originaux et non agricoles de microorganismes phytopathogènes' (2005-2006), a permis de détecter *B. cinerea* sur des substrats aussi divers que la neige, l'eau de pluie, des plantes sauvages asymptomatiques (*Primula*), des déchets végétaux urbains ou des plumes d'oiseaux (mésanges, collaboration J. C. Bouvier, PSH - Avignon). L'identification de ces sources nous a incité à renforcer notre effort de collecte de souches, en particulier dans les précipitations, la neige, l'eau douce, les plantes sauvages et la litière. Pour ceci, nous avons bénéficié en 2010 des échantillonnages réalisés dans le cadre de la thèse de Caroline Monteil (ASC dans l'équipe) sur 3 sites de montagne dans la haute vallée de la Durance et un site sur Montfavet. A partir de 235 échantillons, nous avons ainsi pu mettre en collection 142 souches de *B. cinerea* [C35]. Après avoir confirmé l'implication de ces substrats comme réservoirs potentiels de *B. cinerea* en dehors du contexte agricole, nous nous posons la question de la contribution de cet inoculum en termes épidémiologiques et en termes de sélection de génotypes particuliers. Ce travail constitue une autre perspective majeure des mes travaux.

## Projet de recherche

Le contexte socio-économique actuel est particulièrement favorable au développement de méthodes de protection des cultures plus durables et alternatives au 'tout chimique'. Ainsi, le parlement européen a approuvé en janvier 2009, une nouvelle législation en matière de pesticides pour la protection des cultures en Europe<sup>1</sup> en remplacement de la directive EC-91/414. Ces directives vont conduire à des réductions marquées du type de produits phytosanitaires utilisables et à des restrictions sévères sur la façon de les utiliser. Parallèlement, le ministère français de l'agriculture a lancé le plan Ecophyto-2018<sup>2</sup> visant à promouvoir une agriculture plus durable, en réduisant de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires dans les cultures d'ici 2018. Une des conséquences significatives de cette demande est une augmentation probable des besoins en outils tactiques de protection des cultures. Au cours des prochaines années, mes efforts de recherches sur le développement d'outils de protection alternatifs à la lutte chimique contre les agents phytopathogènes et leur mobilisation dans des stratégies de protection intégrée vont donc se poursuivre.

Compte tenu des investissements considérables nécessaires à la mise au point de tels outils tactiques, un des objectifs prioritaires concernera l'évaluation de la durabilité de leur efficacité. Ces travaux restent très originaux au niveau international et seront essentiellement réalisés vis-à-vis de l'agent pathogène *B. cinerea*. Ils seront réalisés dans le cadre de contrats dont la durée s'étend au-delà de 2012 (Projet Européen 'PURE' 2011-15, Projet Ecophyto2018, ONEMA, MAAP 'USAGE' 2012-2015) ou dans le cadre de nouveaux contrats. Ces projets pourront bénéficier des réseaux de collaboration entre chercheurs et avec la profession récemment mis en place (réseau SPE-INRA 'IndRes', RMT 'Elicitra').

D'autre part des travaux originaux et novateurs seront réalisés afin d'estimer la faisabilité d'appliquer une stratégie de protection biologique par conservation contre *Botrytis cinerea*. L'objectif est de modifier l'agro-système, ses alentours ou les pratiques culturales afin de protéger et favoriser la présence d'ennemis naturels indigènes. Une des approches envisagée consiste à caractériser et prendre en compte l'impact des environnements non

---

<sup>1</sup> Directives 2009-127-EC and 2009-128-EC, and Regulations EC-1107-2009 and EC-1185-EC

<sup>2</sup> Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. PLAN ECOPHYTO 2018 de réduction des usages de pesticides 2008-2018 ([http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/PLAN\\_ECOPHYTO\\_2018-2-2.pdf](http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/PLAN_ECOPHYTO_2018-2-2.pdf))

agricoles sur les traits de vie des agents pathogènes et sur l'abondance de souches hypo-agressives de l'agent pathogène.

## **1. Durabilité de la protection biologique contre les agents phytopathogènes**

L'évaluation de la durabilité de l'efficacité d'une méthode de lutte est très difficile à prédire et très peu d'outils sont disponibles pour l'estimer. Il est donc délicat de prétendre qu'une méthode de lutte est non contournable. Les études que j'envisage de réaliser devraient toutefois faciliter le choix de solutions qui minimisent l'apparition et le maintien dans les populations de souches responsables de perte d'efficacité. Différents niveaux d'action seront envisageables pour favoriser la durabilité de méthodes de protection biologique : le choix du mécanisme d'action de l'agent de protection biologique, sa gestion spatio-temporelle et les conditions de son utilisation. D'autre part, les travaux de recherche que j'envisage de réaliser devraient permettre d'orienter les efforts de sélection de nouveaux agents de protection biologique vers ceux présentant des modes d'actions (ou des combinaisons de modes d'action) les plus efficaces et les moins sujets à contournement par les agents pathogènes.

### *Mode d'action des agents de protection biologique*

L'optimisation de l'efficacité des agents de protection biologique passe par l'acquisition de connaissances précises sur leur mode d'action. Parmi les principaux modes d'action impliqués dans la protection biologique de la plante contre l'infection par un agent pathogène, on peut citer l'antibiose, l'hyperparasitisme, la compétition nutritive ou pour l'espace et l'induction des mécanismes de défense de la plante (Fig. 12). L'implication de deux ou plusieurs mécanismes a été démontrée pour plusieurs agents de protection biologique (pour revue, voir (Elad et al. 2004; Jacobsen 2006). Cependant pour certains agents de protection biologique, leur mode d'action n'est pas précisément défini. Au niveau scientifique, l'élucidation fine des mécanismes d'action des microorganismes antagonistes non producteurs de toxines reste encore un domaine de connaissance très parcellaire.

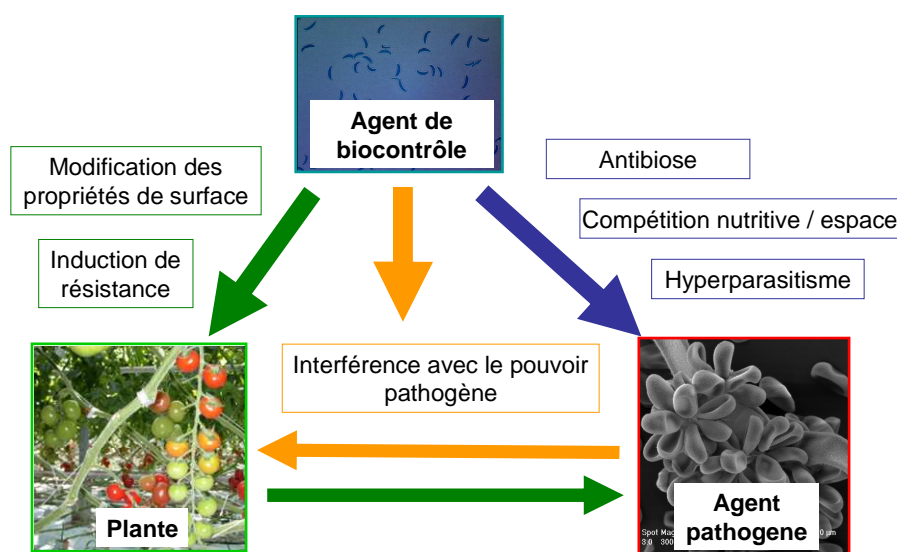


Figure 12. Principaux modes d'action des agents de protection biologique contre les agents pathogènes de plantes.

Des travaux menés au laboratoire depuis plus de 10 ans sur la souche L13 du champignon *Microdochium dimerum*, antagoniste de *B. cinerea* sur la tomate, n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse d'une relation d'hyperparasitisme et aucune toxine n'a été mise en évidence *in vitro*. Ce microorganisme étant proche d'une utilisation commerciale et son mode d'action n'étant pas encore totalement élucidé, l'étude va se poursuivre et différentes hypothèses seront testées.

Une des hypothèses privilégiées pour expliquer l'efficacité de la protection des plaies d'effeuillage de la tomate par ce champignon antagoniste de *B. cinerea* est la compétition nutritive. Du fait du peu de réserves énergétiques endogènes présentes dans les conidies de *B. cinerea*, les nutriments sont nécessaires à la germination des spores et au développement du mycélium. Certains microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) peuvent ainsi inhiber la germination des conidies de *B. cinerea* via la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro-éléments présents dans le milieu. La réduction de la concentration en nutriments dans le milieu conduit généralement à un taux réduit de spores germées chez *B. cinerea* et à un ralentissement de la croissance mycélienne, réduisant ainsi le nombre d'infections et l'expansion des lésions.

Dans le cas de la tomate, les plaies d'effeuillage ou d'ébourgeonnage sont les voies préférentielles d'infection de la tige par *B. cinerea* (Nicot et al. 1996). L'eau et les nutriments nécessaires à la germination des spores sont apportées par les cellules lésées sur la partie superficielle des plaies de taille ou par le phénomène d'exsudation de sève ou guttation. Ce phénomène est fréquemment observé en conditions de production commerciale. L'utilisation d'un système *in vitro* permettant de s'affranchir de la plante hôte et de séparer les deux champignons (Janisiewicz et al. 2000) permettra d'étudier l'interaction directe entre *B. cinerea* et *M. dimerum* et de tester l'hypothèse d'une compétition nutritive entre les deux champignons.

L'hypothèse d'une interférence de l'agent de protection biologique avec le pouvoir pathogène de *B. cinerea* sera également testée. Parmi les différents modes d'action possibles, l'implication d'une modification du pH du milieu par l'agent de protection biologique sera évaluée. Plusieurs études suggèrent en effet qu'une alcalinisation du milieu affecte l'activité de certaines enzymes lytiques et la sécrétion d'acides organiques responsable de la pathogénèse chez *B. cinerea* (Manteau et al. 2003). Des tests *in vitro* en boîte de Pétri ont confirmé qu'il existait un effet du pH du milieu sur la germination et la croissance mycélienne de *B. cinerea*. Les pH basiques réduisent la germination et ralentissent la croissance mycélienne. Cet effet est plus marqué sur milieu carencé en éléments nutritifs. Enfin, l'agressivité de *B. cinerea* sur les plaies d'effeuillage de plants de tomate tend à diminuer avec l'augmentation de la valeur de pH du tampon de suspension des spores.

Enfin, l'hypothèse d'une induction des mécanismes de défense de la plante par cet agent de protection biologique au niveau des plaies d'effeuillage sera testée. Aucune évidence d'une induction systémique des mécanismes de défense n'a été décrite et les travaux se focaliseront dans un premier temps sur une induction locale au niveau de la plaie d'effeuillage. Des études préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence une induction forte de la production de chitinase et de glucanase dans des pétioles de tomate traités avec *M. dimerum* (collaboration EA 2069 - Stress, Défenses et Reproduction des Plantes - Université de Reims). Des études plus fines de biologie moléculaire (activation de gènes impliqués dans les mécanismes de défense de la tomate) et de biochimie (analyse de métabolites secondaires produits par la tomate) seront réalisées pour compléter ces

premiers résultats (collaboration UMR ISA, Sophia-Antipolis). Des études complémentaires seront ensuite réalisées sur la feuille de tomate.

### *Impact du mode d'action des agents de protection biologique sur la durabilité de leur efficacité*

L'étude menée jusqu'à présent sur la capacité d'adaptation de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine sera élargie à des agents de protection biologique produisant d'autres antibiotiques (ou des combinaisons d'antibiotiques), ou ceux agissant par d'autres modes d'action que l'antibiose.

**Antibiose** : dans le cas de la résistance à la pyrrolnitrine, nous avons observé un fort coût adaptatif en absence de pression de sélection chez les mutants de *B. cinerea* résistants à l'antibiotique. Ce coût adaptatif est-il un phénomène stable, considérant, en particulier, les possibilités de recombinaison génétique du champignon? Cette question est importante pour évaluer la capacité des mutants résistants à se multiplier et ainsi à réduire l'efficacité d'une méthode de protection. Un gain de 'fitness' a par exemple été observé pour des souches du champignon filamentueux *Aspergillus nidulans* résistantes au fludioxonil après des repiquages successifs en absence de pression de sélection (Schoustra et al. 2006). Pour *B. cinerea*, des expériences similaires seront réalisées avec les mutants résistants à la pyrrolnitrine. Le rôle de la parasexualité ou de la reproduction sexuée dans le potentiel regain de fitness des mutants résistants sera évalué. Pour la reproduction sexuée, bien que les apothécies soient rarement observées en conditions naturelles au champ, de récentes études de génétique des populations semblent indiquer que c'est un phénomène plus important que généralement admis dans le cycle de développement de *B. cinerea* (Beever and Weeds 2004). L'étude de descendants issus de croisements entre un mutant résistant à la pyrrolnitrine et une souche à agressivité élevée permettrait par exemple d'estimer le lien génétique entre fitness et résistance et donc d'évaluer la capacité de souches résistantes à retrouver un niveau de fitness proche de leurs souches parentales.

Les agents de protection biologique peuvent produire d'autres antibiotiques ou toxines anti-*Botrytis* que la pyrrolnitrine. La résistance à ces molécules toxiques sera évaluée dans les populations naturelles ou à partir de souches obtenues par évolution expérimentale. La résistance croisée à différentes molécules sera également explorée.



**Autres modes d'action** : aucune étude ne fait état de résistance en pratique à des agents de protection biologique agissant par d'autres modes d'action que l'antibiose. Dans un premier temps, nous focaliserons nos travaux sur la compétition nutritive, mode d'action complexe donc à priori plus durable que l'antibiose et identifié chez de nombreux agents de protection biologique anti-*Botrytis*.

La capacité germinative des spores de différentes souches de *B. cinerea* sera évaluée en conditions de stress nutritif (milieu minimum pauvre en nutriments). Des générations successives seront réalisées *in vitro* dans ces conditions pour simuler la pression de sélection qu'exercerait un agent de protection biologique agissant par compétition nutritive. La comparaison de paramètres de développement tel que la germination et la croissance du filament germinatif des souches évolués et des souches parentales pourra être évaluée *in vitro*. Une dernière étape consistera à valider ces résultats sur plantes avec un agent de protection biologique agissant par compétition nutritive. La relation entre la capacité de germination en conditions de stress nutritif et la moindre sensibilité à cet agent de protection biologique sera alors estimée.

À plus long terme, la durabilité d'agents de protection biologique anti-*Botrytis* agissant par d'autres modes d'action (induction des mécanismes de résistance des plantes, interférence avec le pouvoir pathogène, hyper-parasitisme...) ou par la combinaison de différents modes d'actions sera également évaluée.

Un lien éventuel entre la résistance à l'agent de protection biologique et le coût adaptatif associé (fitness) sera systématiquement recherché. Le coût adaptatif sera estimé par l'estimation de la cinétique de croissance mycélienne sur milieu nutritif, l'agressivité sur organe végétal et la capacité à assurer une descendance conidienne en absence de pression de sélection. La fitness des isolats d'origine sera comparée à la fitness des lignées évoluées identifiées.

Dans un deuxième temps, ce type d'étude pourra être étendu à d'autres agents pathogènes afin de dégager des hypothèses génériques sur la durabilité de la protection biologique selon le type de bioagresseur à contrôler. La comparaison de différents bioagresseurs présentant des cycles de développement très différents (biotrophes vs. nécrotrophes ou gamme d'hôte étroite vs. large par exemple) est par exemple envisagée.

### *Impact des pratiques phytosanitaires sur l'évolution des populations de B. cinerea*

Les travaux engagés au laboratoire sur la durabilité de la lutte biologique ont été jusqu'à présent centrés sur des souches particulières de *B. cinerea*. Au cours des prochaines années, nous envisageons d'étendre ces études au niveau des populations de *B. cinerea* afin d'estimer l'impact du mode de protection utilisé dans une parcelle (biologique vs. chimique par exemple) sur l'évolution des populations de *B. cinerea*. La démarche envisagée est de réaliser un suivi et une comparaison des caractéristiques phénotypiques (sensibilité à l'agent de protection biologique utilisé) et génotypiques (profils microsatellites) de souches échantillonnées, par exemple dans des serres de tomate, en absence de traitement ou en présence respectivement d'une protection biologique et d'une protection chimique. L'analyse phénotypique des isolats dans ces parcelles permettra de suivre l'évolution au cours du temps de la sensibilité des isolats par rapport à la ligne de base de sensibilité à un agent de protection biologique. L'analyse génotypique des isolats dans ces parcelles et la comparaison avec des parcelles non traitées ou traitées avec des fongicides, permettra de savoir si le traitement favorise l'émergence et la sélection d'isolats spécifiques. Ces travaux permettront à terme d'élaborer des modèles réalistes établissant l'impact de traitements phytosanitaires 'non chimiques' sur l'évolution des populations de *B. cinerea* afin d'en gérer leur durabilité.

## **2. Perspectives de protection biologique par conservation**

Historiquement, l'étude des agents pathogènes des plantes – leur cycle de vie, leur écologie, leur adaptation à des stress, l'évolution de la structure des populations - a été presque exclusivement centrée sur leur interaction avec les plantes. Hors les systèmes agricoles sont généralement des systèmes ouverts, et la plupart des agents phytopathogènes (à l'exception des biotrophes obligatoires) sont susceptibles de survivre et de se multiplier sur d'autres substrats que les plantes cultivées. De plus, la période pendant laquelle un agent pathogène provoque une maladie sur une plante ne représente vraisemblablement qu'une petite partie de son histoire de vie complète. L'origine des travaux que j'envisage de réaliser repose sur l'hypothèse que la structure et la dynamique des populations de certains agents phytopathogènes sont déterminés en grande partie dans

des contextes non agricole en dehors de leur interaction directe avec les plantes. Cette hypothèse est corroborée par le fait que chez beaucoup d'agents pathogènes (bactéries ou champignons), la persistance dans l'environnement de souches non pathogènes sur les plantes a été décrite. L'avantage écologique et les conditions qui favorisent la persistance de ces souches ne sont généralement pas connus. Dans certains cas, l'étude de l'interaction de ces souches avec des souches pathogènes de la même espèce a abouti au développement de stratégies de protection biologique (par exemple *Fusarium oxysporum*, *Cryphonectria parasitica*). Les travaux que nous proposons de réaliser ambitionnent d'identifier les conditions qui favorisent la survie et le développement de souches peu agressives de l'agent pathogène. À terme ce projet vise à exploiter ces connaissances pour concevoir des dispositifs de culture et des pratiques culturales qui limiteront la capacité des populations agressives de cet agent pathogène à dominer la flore microbienne des plantes cultivées ou qui favoriseront le développement de populations peu agressives.

Les travaux réalisés sur ce thème seront focalisés sur le champignon *B. cinerea*. Ce champignon est considéré comme très polyphage avec une gamme d'hôte très large, de plus de 200 espèces végétales (Jarvis 1980). À part sur plantes, des études exploratoires réalisées ces dernières années au laboratoire ont permis d'isoler ce champignon dans des habitats non agricoles comme de la neige, des précipitations, des plantes sauvages. *B. cinerea* a également été isolé dans des nuages (Amato et al. 2007) et il peut également survivre dans le sol (Jarvis 1977). Ces résultats suggèrent que ce champignon a une vie saprophytique mais l'importance de cette phase dans son cycle de vie n'est pas connue. Les populations de *B. cinerea* sont constituées de souches dont le pouvoir pathogène est très variable. L'existence de souches hypo-virulentes dans les populations naturelles de ce champignon (Castro et al. 2003; Wu et al. 2007) suggère qu'elles ont un avantage sélectif dans des conditions particulières. Enfin (Weeds et al. 2000) ont mis en évidence une protection significative de feuilles de haricot contre une souche agressive de *B. cinerea*, par une souche non agressive.

Les objectifs agronomiques de cette partie vont donc s'atteler à (i) évaluer la capacité de souches hypo-agressives naturellement présentes dans l'environnement à protéger la plante contre des attaques par des souches agressives de l'agent pathogène, (ii) caractériser la fitness de telles souches et identifier des contextes écologiques et des conditions environnementales favorisant ces souches au détriment des souches agressives, (iii) démontrer que des souches peu agressives peuvent vivre sur des substrats en dehors du

contexte agricole *sensu stricto* et identifier des substrats et des conditions qui favorisent le développement de ces souches, et (iv) traduire les conditions environnementales favorables aux souches hypo-agressives et les contraintes adaptatives des souches agressives en pratiques de production végétale.

En plus de ces objectifs agronomiques, ces travaux permettront de progresser dans la connaissance de l'écologie de *B. cinerea*, afin en particulier d'évaluer l'impact des conditions rencontrées en dehors du contexte agricole *sensu stricto* sur l'émergence et la sélection d'isolats. Enfin, un aspect plus fondamental des perspectives ouvertes par nos résultats est la question des mécanismes impliqués dans l'adaptation rapide de *B. cinerea* à des pressions sélectives.

#### *Cadre d'histoire de vie de B. cinerea*

L'objectif sera d'établir un cadre d'histoire de vie plus complet pour *B. cinerea* à travers une analyse de la structure génétique et phénotypique des populations associées à différents habitats identifiés pour cet agent pathogène. L'analyse de la structure génétique sera réalisée par une approche de phylogénie en comparant à l'aide de marqueurs moléculaires (gènes impliqués dans des processus cellulaires de base, microsatellites, SNP) des souches provenant d'habitats non agricole avec des souches isolées sur plante. La proximité génétique entre ces souches sera évaluée par des outils de phylogénie et de génétique des populations (Fournier et al. 2005; Staats et al. 2005). Les souches seront regroupées sur la base de leur ressemblance génétique en utilisant des méthodes de 'clustering' telles que des algorithmes Bayésien et des analyses multivariées. Ces travaux permettront en outre d'identifier des substrats pouvant avoir un impact sur la diversification et l'évolution de ce microorganisme.

#### *Compromis évolutifs entre le pouvoir pathogène et la fitness écologique chez B. cinerea*

Les souches de *B. cinerea* seront classées selon leurs niveaux de fitness et des corrélations avec d'autres caractères phénotypiques et génotypiques seront recherchées. Les caractères testés concerneront le pouvoir pathogène (gamme d'hôte et agressivité), la capacité de survie en conditions de stress (croissance mycélienne, sporulation, production de sclérotées...), l'adaptation à des propriétés physico-chimiques de l'environnement (quantité et qualité de la lumière, disponibilité de l'eau, tolérance à des températures et à des pH

extrêmes, utilisation de sources de carbone, production d'enzymes pectinolytiques...), et d'autres propriétés biologiques liées à la compétition avec des agents biotiques (production de toxines, résistance à des composés toxiques...). Ainsi, nous chercherons à différencier les traits liés à sa vie saprophyte de ceux favorables à l'expression de son pouvoir pathogène.

La mise en place de dispositifs d'évolution expérimentale permettra de tester des hypothèses concernant l'adaptation de *B. cinerea* à des conditions particulières de l'environnement et d'évaluer l'impact de cette adaptation sur le pouvoir pathogène et la fitness de ces souches. Les conditions favorisant l'émergence et la multiplication de souches à faible pouvoir pathogène seront particulièrement recherchées. Ce travail devrait aboutir à l'acquisition de connaissance concernant les mécanismes d'adaptation des champignons à des stress variés qu'ils subissent dans leur environnement en culture ou hors du contexte agricole et les liens éventuels entre l'évolution du cout adaptatif (dont le pouvoir pathogène) et l'adaptation des souches de *B. cinerea*.

#### *Mécanismes d'adaptation de B. cinerea*

Les mécanismes de modification du génome aboutissant à l'acquisition de résistance à des composés toxiques ou à l'adaptation à des changements environnementaux ne sont pas bien connus chez *B. cinerea*. Un haut niveau de diversité génétique est observé chez ce champignon : des génotypes identiques sont rarement observés dans les populations naturelles d'isolats (quelque soit les marqueurs moléculaires utilisés) suggérant que le nombre total de variants dans les populations est très fort. La mutation et la recombinaison constituent les forces évolutives majeures pour la création d'une variabilité génétique sur laquelle s'exerce ensuite la sélection et la dérive. Si les taux de mutation sont relativement bien estimés chez les principaux agents phytopathogènes eucaryotes, l'importance de la recombinaison pour l'évolution des populations ainsi que les facteurs susceptibles d'influer sur l'émergence de recombinants restent mal connus. Pour *B. cinerea*, le paradoxe d'une absence d'observation de reproduction sexuée dans la nature et d'une recombinaison significative dans les populations naturelles de souches isolées de plantes (Fournier and Giraud 2008) font penser que de la parasexualité pourraient être à l'origine de ces recombinaisons. Pour ce champignon, un des enjeux scientifique est d'estimer les fréquences d'émergence de souches recombinantes avec des propriétés nouvelles (sans passer par la reproduction sexuée) et d'identifier les contextes qui favorisent cette

émergence sans se limiter au milieu agricole. Les objectifs spécifiques sont d'examiner quelques marqueurs d'intérêt permettant d'évaluer l'effet du milieu de vie (plante hôte ou autres substrats liés à l'histoire de vie de *B. cinerea*) (1) sur la fréquence de recombinaison et (2) sur l'impact phénotypique de celle-ci.

A plus long terme, nous prévoyons d'examiner, au cours de procédure d'évolution expérimentale de différentes souches (ou de mélanges de souches) de *B. cinerea* sous pression sélective, (i) l'évolution du nombre de noyaux, (ii) l'existence et la dynamique des réarrangements chromosomiques (altération du nombre de chromosomes, du nombre de copies de gènes) et extrachromosomiques (présence, charge et type d'ARN doubles brins en particulier), (iii) les modifications génomiques (présence et dynamique de mutations adaptatives) et (iv) les changements dans l'expression de certains gènes d'intérêt (par exemple liés à la résistance à certains composés toxiques). Afin de réaliser ces travaux dans un laboratoire spécialisé en biologie évolutive, une demande de financement a été effectuée auprès de l'Europe dans le cadre du programme Marie Curie (FP7-PEOPLE-IOF) en 2010 et 2011 en collaboration avec le département d'écologie et de biologie évolutive de l'université de Toronto au Canada (laboratoires de Linda Kohn et de James Anderson). En absence de financement européen à ce jour, un séjour plus court est envisagé en 2012, grâce à un financement du département SPE de l'INRA, dans le laboratoire de Corbin Jones (Chapel Hill, University of North-Carolina, Etats-Unis) pour apprendre à utiliser les données de génomique disponible pour *B. cinerea* (Amselem et al. 2011) et à maîtriser les outils de bioinformatique.



## Références

1. Amato P, Parazols M, Sancelme M, Laj P, Mailhot G, Delort A-M, 2007. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 242-254.
2. Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier J-M, Quivillon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anthouard Vr, Beever RE, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, Brault B, Chen Z, Choquer M, Collomare Jr, Cotton P, Danchin EG, Da Silva C, Gautier Al, Giraud C, Giraud T, Gonzalez C, Grossetete S, Gidener U, Henrissat B, Howlett BJ, Kodira C, Kretschmer M, Lappartient A, Leroch M, Levis C, Mauceli E, Neuvoglise Cc, Oeser B, Pearson M, Poulain J, Poussereau N, Quesneville H, Rasclé C, Schumacher J, Sogurens Ba, Sexton A, Silva E, Sirven C, Soanes DM, Talbot NJ, Templeton M, Yandava C, Yarden O, Zeng Q, Rollins JA, Lebrun M-H, Dickman M, 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 7: e1002230.
3. Baroffio CA, Siegfried W, Hilber UW, 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxyanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease* 87: 662-666.
4. Beever RE, Weeds PL, 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 29-52.
5. Castro M, Kramer K, Valdivia L, Ortiz S, Castillo A, 2003. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 228: 87-91.
6. Crill P, 1977. An assessment of stabilizing selection in crop variety development. *Annual Review of Phytopathology* 15: 185-202.
7. Cui W, Beever RE, Parkes SL, Templeton MD, 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology* 94: 1129-1135.
8. Cui W, Beever RE, Parkes SL, Weeds PL, Templeton MD, 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology* 36: 187-198.
9. De Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek HJ, Stergiopoulos I, Zwieters L-H, 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science* 62: 195-207.
10. Decognet V, Trottin-Caudal Y, Fournier C, Leyre JM, Nicot P, 1999. Protection of stem wounds against *Botrytis cinerea* in heated tomato greenhouses with a strain of *Fusarium* sp. *Bulletin OILB/SROP* 22: 53-56.
11. Decoin M, Whipps JM, Nicot P, Gullino ML, Spadaro D, 2002. Micro-organismes contre agents pathogènes. *Phytoma- La Défense des végétaux* 549: 32-36.
12. Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM, 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41: 501-538.
13. Elad Y, Stewart A, 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 223-241.
14. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-8.
15. Faretra F, Pollastro S, 1993. Isolation, characterization, and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research* 97: 620-624.
16. Fournier E, Giraud T, 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.
17. Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y, 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251-1267.
18. Fournier E, Giraud T, Loiseau A, Vautrin D, Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Brygoo Y, 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* 2: 253-255.
19. Fravel DR, 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.



20. Hilber UW, Schwinn FJ, Schuepp H, 1995. Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Journal of Phytopathology* 143: 423-428.
21. Hollomon DW, Wheeler IE, 2002. Controlling powdery mildews with chemistry. In: Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, (eds) (eds), *The powdery mildews, a comprehensive treatise*. APS press, St-Paul, Minnesota, pp. 249-255.
22. Holz G, Coertze S, Williamson B, 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 9-27.
23. Isenegger DA, Macleod WJ, Ford R, Taylor PWJ, 2008. Genotypic diversity and migration of clonal lineages of *Botrytis cinerea* from chickpea fields of Bangladesh inferred by microsatellite markers. *Plant Pathology* 57: 967-973.
24. Jacobsen BJ, 2006. Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents. In: Bailey MJ, Lilley AK, Timms-Wilson TM, Spencer-Phillips PTN (eds), *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. Atheneum Press, Gateshead, UK, pp. 133-147.
25. Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Sharer C, 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90: 1196-1200.
26. Jarvis RW, 1977. *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. A guide to the literature*. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
27. Jarvis WR, 1980. Epidemiology. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR (eds), *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, pp. 219-250.
28. Karchani-Balma S, Gautier A, Raies A, Fournier E, 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* 98: 1271-1279.
29. Kretschmer M, Leroux P, Mosbach A, Walker AS, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek HJ, Pradier JM, Leroux P, De Waard MA, Hahn M, 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Plos Pathogens* 5: e1000696.
30. Lennox CL, Spotts RA, 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 87: 645-649.
31. Leonard KJ, 1969. Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology* 59: 1851-1857.
32. Leroux P, 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195-222.
33. Li H, Leifert C, 1994. Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101: 414-418.
34. Liu WW, Leroux P, Fillinger S, 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.
35. Manteau S, Abouna S, Lambert B, Legendre L, 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Fems Microbiology Ecology* 43: 359-366.
36. Mazurier S, Corberand T, Lemanceau P, Raaijmakers JM, 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *The ISME Journal* 3: 977-991.
37. Mazzola M, Fujimoto DK, Thomashow LS, Cook RJ, 1995. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2554-2559.
38. Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS, 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92: 1427-1431.
39. Nicot PC, Decognet V, Bardin M, 1996. Stratégie climatique et lutte intégrée contre les maladies cryptogamiques des cultures sous serre, *Actes du séminaire de l'AIP Serres*, Alénya, France, pp. 232-241.
40. Nicot PC, Morison N, Mermier M, 2001. Optical filters against grey mould of greenhouse crops. In: Vincent C, Panneton B, Fleurat-Lessard F (eds), *Physical Control Methods in Plant Protection*. Springer Verlag, Paris, pp. 134-145.
41. Paulitz TC, Belanger RR, 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.

42. Schoonbeek H, del Sorbo G, de Waard MA, 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 562-571.
43. Schoonbeek H, Raaijmakers JM, De Waard MA, 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1165-1172.
44. Schoustra SE, Debets AJM, Slakhorst M, Hoekstra RF, 2006. Reducing the cost of resistance; experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1115-1127.
45. Schouten A, Berg Gvd, Edel-Hermann V, Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C, Vos CHd, Lemanceau P, Raaijmakers JM, 2004. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1201-1211.
46. Schouten A, Maksimova O, Cuesta-Arenas Y, van den Berg G, Raaijmakers JM, 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 10: 1145-1157.
47. Staats M, van Baarlen P, van Kan JAL, 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22: 333-346.
48. Vaczy KZ, Sandor E, Karaffa L, Fekete E, Fekete E, Arnyasi M, Czeglédi L, Kovics GJ, Druzhinina IS, Kubicek CP, 2008. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology* 98: 1312-1319.
49. Viaud M, Fillinger S, Liu W, Polepalli JS, Le Pecheur P, Kunduru AR, Leroux P, Legendre L, 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1042-1050.
50. Vignutelli A, Hilber-Bodmer M, Hilber UW, 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 106: 329-335.
51. Weeds PL, Beever RE, Long PG, 2000. Competition between aggressive and non-aggressive strains of *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) on French bean leaves. *Australasian Plant Pathology* 29: 200-204.
52. Wu MD, Zhang L, Li GQ, Jiang DH, Hou MS, Huang HC, 2007. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 97: 1590-1599.
53. Ziogas BN, Markoglou AN, Spyropoulou V, 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology* 113: 83-100.



## **Annexe: quelques publications**