

Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon

19-2.2-06-PHYTO

DURÉE DU PROJET : AVRIL 2019 / DÉCEMBRE 2024

Revue de littérature

Réalisé par :

Anne Piuze-Paquet, Phytodata

Hervé Van der Heyden, Phytodata (2019-2023)

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

Table des matières

Table des matières.....	2
Liste des tableaux.....	4
Liste des figures.....	5
Introduction générale.....	6
Avant-propos	6
Quelques définitions importantes	8
Quelques mots sur la FRAC.....	9
Les mécanismes théoriques de résistance.....	10
Modification au niveau de la cible	10
Surexpression de la cible	11
Exportation (transporteurs à efflux).....	11
Détoxification.....	12
Métabolisation.....	12
Réduction de l'absorption	12
Production d'une enzyme alternative	13
Les facteurs liés au développement de la résistance aux fongicides.	13
Risque associé à l'agent pathogène.....	13
Risque associé aux fongicides.....	15
Risque combiné.....	16
Gestion de la résistance aux fongicides au champ	17
Modes d'action des fongicides à risque élevé pour le développement de la résistance	19
Strobilurines (Groupe FRAC 11).....	19
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (Groupe FRAC 7).....	22
Dicarboximides (Groupe FRAC 2).....	25
Méthyl benzimidazoles carbamates (Groupe FRAC 1)	27
Inhibiteurs de la C-14 déméthylase (Groupe FRAC 3)	29
Inhibiteurs de la kéto réductase (groupe FRAC 17)	31
Phénylamides (Groupe FRAC 4)	32
Anilinopyrimidines (groupe FRAC 9).....	33
Phénylpyrrole (groupe FRAC 12).....	33
Résistance MDR ou multidrug-resistant	34

Méthodes de détection	37
Méthodes <i>in vitro</i>	37
Courbe dose-réponse et dose discriminante.....	37
Milieux de cultures et bioessais	40
Formule commerciale et matière active.....	41
Parasites obligatoires.....	42
Méthodes moléculaires	42
PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	43
PIRA-PCR (Primer-Introduced Restriction Analysis Polymerase Chain Reaction)	44
PCR et qPCR allèle-spécifique et sondes spécifiques.....	44
LAMP-PCR (Loop-mediated isothermal amplification polymerase chain reaction).....	45
Séquençage.....	46
Portrait de la résistance des champignons phytopathogènes au Québec	47
Moisissure grise	49
Brûlure de la feuille.....	53
Anthracnose.....	55
Blanc de la vigne	58
Mildiou de la vigne.....	62
Tavelure de la pomme	65
Mildiou du concombre.....	69
Mildiou de la pomme de terre.....	71
Tache alternarienne.....	74
Champignons soupçonnés de résistance au Québec.....	75
Bibliographie	78

Liste des tableaux

Tableau 1. Apparition du premier cas de résistance pratique aux fongicides en fonction de leur nombre d'années d'utilisation ^a .	7
Tableau 2. Agents pathogènes classés dans la catégorie de risque élevé pour le développement de résistance aux fongicides selon la FRAC.	15
Tableau 3. Grille d'estimation des risques de développement de résistance aux fongicides en fonction des risques associés à l'agent pathogène, au fongicide et au risque agronomique.	16
Tableau 4. Exemples de champignons phytopathogènes résistants aux strobilurines.	21
Tableau 5. Comparaison des méthodes de phénotypage et de génotypage (tiré de Sierotzki et al. 2019).	43
Tableau 6. Liste des champignons confirmés pour leur résistance aux fongicides au Québec.	47
Tableau 7. Résistance aux fongicides chez <i>B. cinerea</i> .	50
Tableau 8. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>B. cinerea</i> .	52
Tableau 9. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>B. cinerea</i> .	52
Tableau 10. Résistance aux fongicides chez <i>B. squamosa</i> .	55
Tableau 11. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>B. squamosa</i> .	55
Tableau 12. Résistance aux fongicides chez <i>C. acutatum</i> .	57
Tableau 13. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>C. acutatum</i> .	58
Tableau 14. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>C. acutatum</i> .	58
Tableau 15. Résistance aux fongicides chez <i>E. necator</i> .	60
Tableau 16. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>E. necator</i> .	61
Tableau 17. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>E. necator</i> .	61
Tableau 18. Résistance aux fongicides chez <i>P. viticola</i> .	64
Tableau 19. Méthodes par bio essais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>P. viticola</i> .	64
Tableau 20. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>P. viticola</i> .	64
Tableau 21. Résistance aux fongicides chez <i>Venturia inaequalis</i> .	67
Tableau 22. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>V. inaequalis</i> .	68
Tableau 23. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>V. inaequalis</i> .	68
Tableau 24. Résistance aux fongicides chez <i>P. cubensis</i> .	70
Tableau 25. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>P. cubensis</i> .	71
Tableau 26. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>P. cubensis</i> .	71
Tableau 27. Résistance aux fongicides chez <i>P. infestans</i> .	73
Tableau 28. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez <i>P. infestans</i> .	73
Tableau 29. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez <i>P. infestans</i> .	74
Tableau 30: Liste des champignons soupçonnés de résistance aux fongicides au Québec.	76

Liste des figures

Figure 1. Schématisation des mécanismes de résistance aux fongicides rencontrés chez les champignons et oomycètes (adapté de Acero et al. 2011).	11
Figure 2. Patrons de résistance croisée chez <i>B. cinerea</i> pour quatre fongicides appartenant au groupe FRAC 11. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.	22
Figure 3. Complexe de la succinate déshydrogénase (SDH) (Avenot et Michailides, 2010).	23
Figure 4. Exemples de CI_{50} pour quatre fongicides du groupe 7 et pour six génotypes de <i>B. cinerea</i> . Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.	25
Figure 5: Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de <i>B. cinerea</i> résistants ou sensibles à l'iprodione. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.	27
Figure 6. Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de <i>B. cinerea</i> résistants ou sensibles au thiophanate-méthyle. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.	29
Figure 7. Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de <i>B. cinerea</i> résistants ou sensibles au fenhexamide. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.....	32
Figure 8. Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de <i>B. cinerea</i> résistants (MDR1 et MDR1h) ou sensible (S) au fludioxonil, cyprodinil et pyriméthanol. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.	36
Figure 9. Exemple de courbe dose-réponse obtenue pour l'azoxystrobine pour deux souches de <i>B. cinerea</i> , une sensible (wt) et une résistante (G143A). Les points A et B représentent la CI_{50} et CMI pour la souche sensible et les points C et D représentent la CI_{50} et CMI pour la souche résistante. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.....	38
Figure 10. Schématisation des patrons bimodal et unimodal caractéristiques des résistances discrètes et continues. Figure tirée de (Brent and Hollomon 2007b).....	39
Figure 11. Exemples d'essais en milieux solides et liquides.	41
Figure 12. Exemple de résultats obtenus à l'aide d'une méthode de PCR-RFLP utilisée pour détecter une mutation responsable de la résistance de <i>B. squamosa</i> aux dicarboximides. Les échantillons contenus dans les puits 2 et 6 à 11 n'ont pas été digérés, ce qui indique la présence de la mutation I365S (tiré de Van der Heyden et al. 2013).	44
Figure 13. Exemple de résultats d'analyse pour la résistance au fenhexamide. A) Échantillon positif pour le phénotype sensible et B) échantillon résistant au fenhexamide.	45
Figure 14. Exemple de résultats de LAMP-PCR. Les puits jaunes sont positifs tandis que les puits roses sont négatifs.	46
Figure 15 : Comparaison des résultats des tests de résistance réalisés sur des échantillons recueillis en 2004-2005 et 10 ans plus tard en 2014-2015 (source Van der Heyden, non publiée)....	54

Introduction générale

Avant-propos

Bien que d'importants efforts soient faits de la part des ministères, des services-conseils et des producteurs pour réduire les risques liés à l'utilisation des fongicides chimiques en agriculture, ils occupent encore une grande place au cœur des stratégies de gestion intégrée implantées à la ferme. De plus, le retrait progressif des fongicides multisites, pour lesquels peu ou pas de résistance n'a été rapportée, augmente la pression de sélection exercée sur les fongicides unisites, plus à risque de développement de résistance. Ainsi, l'arsenal disponible pour les producteurs conventionnels contient plusieurs fongicides à risque modéré et élevé de développement de résistance.

Bien que certains cas de résistance aux fongicides aient été rapportés à la fin des années 60 pour les hydrocarbures aromatiques ou certains fongicides à base de mercure utilisés en traitement de semences, ceux-ci n'ont pas été pris au sérieux. En effet, comme ces fongicides avaient été utilisés pendant 20 à 40 ans avant que cette résistance ne soit rapportée, le problème a été considéré comme étant sans conséquence d'un point de vue économique (Stevenson et al. 2019). À la fin des années 60, la détection de cas de résistance à la dodine, homologuée dix ans plus tôt contre la tavelure du pommier causée par *Venturia inequalis*, a également suscité l'inquiétude (Köller et al. 1999; Szkolnik et al. 1969). À partir des années 70, les problèmes de résistance aux fongicides sont devenus de plus en plus préoccupants et les cas de résistance observés plus rapidement après l'homologation de ceux-ci. Le plus spectaculaire cas de résistance pratique a certainement été celui du fongicide bénomyl (appartenant aux benzimidazoles), pour lequel l'observation des premiers cas de résistance a été rapportée après seulement deux années d'utilisation (Stevenson et al. 2019). Par la suite, les premiers cas de résistance aux pyrimidines, aux phénylamides et aux strobilurines ont tous été rapportés après seulement deux ans d'usage (Brent and Hollomon 2007b) (Tableau 1).

Actuellement, plusieurs ouvrages de référence sont disponibles en ce qui concerne la résistance aux fongicides (Brent and Hollomon 2007a; Brent and Hollomon 2007b; Stevenson et al. 2019). L'objectif de cette revue n'est pas de répéter les publications précédentes, mais de discuter de l'état des connaissances liées à la résistance aux fongicides et de produire une synthèse accessible et informative s'adressant aux conseillers, agronomes et producteurs intéressés.

Tableau 1. Apparition du premier cas de résistance pratique aux fongicides en fonction de leur nombre d'années d'utilisation ^a.

Fongicide ou classe	Groupe FRAC	Année d'observation de la résistance	Nombre d'années d'utilisation	Agent pathogène ^b
Hydrocarbures aromatiques	14	1960	20	<i>Penicillium</i> spp.
Dodine	U12	1969	1	<i>Pyrenophora</i> spp.
Benzimidazole	1	1970	2	<i>Venturia inaequalis</i>
2-amino pyrimidines	8	1971	2	<i>Blumeria graminis</i> et <i>Podosphaera xanthii</i>
Kasugamycin	24	1971	6	<i>Pyricularia grisea</i>
Phosphoro- thiolates	6	1976	9	<i>Pyricularis grisea</i>
Tri-phenyl-tin	30	1977	13	<i>Cercospora beticola</i>
Phenylamides	4	1980	2	<i>Phytophthora infestans</i> et <i>Plasmopara viticola</i>
Dicarboximides	2	1982	5	<i>Botrytis cinerea</i>
Inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes	3	1982	7	<i>Podosphaera xanthii</i>
Carboxanilides	7	1985	15	<i>Ustilago nuda</i>
Strobilurines	11	1998	2	<i>Botrytis cinerea</i>
Inhibiteurs de la synthèse de la mélanine	16	2002	2	<i>Pyricularia grisea</i>
Amides de l'acide carboxylique	40	1994	n.d.	<i>Plasmopara viticola</i>

^a Adapté de (Brent and Hollomon 2007b)

^b L'organisme cité représente le premier pour lequel une résistance a été rapportée pour le fongicide ou la classe de fongicides correspondants.

Quelques définitions importantes

Les définitions fournies dans cette section sont adaptées au contexte de la résistance aux fongicides. Dans un autre contexte, les termes définis ici pourraient avoir un autre sens. Ces définitions sont adaptées du bulletin OEEP 18, 569-574 (Anonymous 1988). Ces définitions ont été élaborées pour donner suite à la conférence de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) sur la résistance aux fongicides de 1988 et sont toujours d'actualité. Une référence est fournie lorsqu'il en est autrement.

1. La **résistance aux fongicides** peut être définie comme une adaptation stable et héritable d'un champignon à un fongicide, entraînant une sensibilité réduite à ce fongicide. Le terme est généralement utilisé pour les souches d'une espèce sensible qui ont changé, généralement par mutation, pour être nettement moins sensibles à un fongicide. La croissance ou le développement de la souche de champignon résistante n'est pas contrôlé ou n'est que légèrement inhibé par le fongicide à des concentrations qui sont inhibitrices pour la population de type sauvage d'origine (WT).
2. Les souches résistantes obtenues au terme d'expériences de mutagenèse ou de sélection forcées appartiennent à la catégorie des **résistances de laboratoire**. Cette résistance peut s'avérer très utile pour déterminer par exemple les sites d'action d'une matière active, mais on ne les retrouve généralement qu'en laboratoire et elles ne représentent pas forcément ce que l'on retrouve dans l'environnement (Stevenson et al. 2019).
3. La **résistance individuelle** est un caractère stable et héréditaire qui se traduit par une réduction de la sensibilité d'un individu (souche) à un fongicide. La **résistance pratique** implique qu'il y a une réduction notable d'efficacité des traitements fongicides à l'échelle de la population visée et que la baisse d'efficacité soit attribuable à la présence d'individus résistants au sein de cette population.
4. Le **phénotype** fait référence à un trait observé. Lorsqu'on qualifie une souche de résistante, on parle de son phénotype. Le **génotype** fait quant à lui référence au gène ou à la séquence d'un gène qui confère à la souche son phénotype résistant.
5. La **CI₅₀** est la concentration de fongicide qui inhibe la croissance de l'agent pathogène de 50%. C'est l'unité de mesure de la résistance la plus courante. On peut rencontrer aussi la **CMI** ou concentration minimale inhibitrice. La CMI représente ainsi la plus petite concentration d'un produit chimique permettant d'inhiber la croissance d'un agent pathogène. La CI₅₀ pour une

population qui n'a jamais été exposée à un fongicide constitue le niveau de **sensibilité de base** pour ce fongicide.

6. On utilise également le **facteur de résistance (FR)** pour comparer les niveaux de résistance de différentes souches. Le **FR** est estimé en calculant le rapport de deux CI_{50} : CI_{50} de la souche à tester / CI_{50} de la souche sensible.
7. La **capacité d'adaptation** ou « **fitness** » d'une souche d'agent pathogène correspond à sa capacité à se développer, se reproduire et survivre au sein d'une population de ce même organisme. Lorsqu'une souche acquiert la capacité de survivre et de se reproduire en présence d'un fongicide, il est possible que cette souche résistante devienne moins performante pour certaines caractéristiques (agressivité, sporulation, survie, etc.). On dit alors qu'il y a un **coût d'adaptation** ou « **fitness cost** » associé à la résistance.
8. Lorsque la résistance à deux fongicides est conférée par le même gène, il s'agit de **résistance croisée**. Lorsqu'une même souche est résistante à plusieurs fongicides, on parle de **résistance multiple**.

Quelques mots sur la FRAC

À la suite de l'émergence et la recrudescence des cas rapportés de résistance aux fongicides au tournant des années 80, l'évaluation des risques de développement de résistance est devenue pratique courante chez les fabricants de produits phytosanitaires (Hahn 2014). Une autre répercussion de l'augmentation du nombre de nouveaux cas de résistance a été la création, en 1981, de la FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). À cette époque, l'organisme était composé uniquement de membres des principales compagnies agrochimiques et avait comme objectif de coordonner les stratégies de gestion de la résistance aux fongicides afin d'optimiser la durée de vie utile des fongicides mis sur le marché. À ce jour, les principaux objectifs de la FRAC sont d'identifier les problèmes de résistance courants et potentiels, de colliger et de diffuser l'information sur la fréquence, la distribution et les niveaux de résistance aux fongicides, de proposer des stratégies d'atténuation des risques, de recommander des protocoles uniformisés pour la conduite d'études et de favoriser les collaborations entre l'industrie et le milieu de la recherche, de la distribution, du conseil et de la production agricole (Stevenson et al. 2019).

L'une des principales contributions de la FRAC est sans doute l'évaluation et la compilation des modes d'action et du risque associé au développement des résistances aux fongicides. L'information contenue dans la liste de la FRAC (<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code->

list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2) présente le mode d'action, le site d'action, le groupe de résistance, le groupe chimique, le nom de la matière active et un code FRAC. Ce code FRAC sert notamment à regrouper les différents fongicides pour faciliter l'élaboration des stratégies de gestion. Par exemple, les strobilurines (QoI) ont été regroupées sous le groupe FRAC 11 et les carboxamides (SDHI) sous le groupe FRAC 7.

Les mécanismes théoriques de résistance

La cellule peut utiliser différents mécanismes pour limiter l'effet des fongicides sur les processus métaboliques. En résumé, elle peut altérer le site d'action du fongicide grâce à 1) la modification de la cible, 2) la surexpression de la cible, 3) l'exportation à l'extérieur de la cellule, 4) la détoxification, 5) la métabolisation du fongicide, 6) la réduction de l'absorption du fongicide ou 7) la production d'une enzyme alternative capable de substituer l'enzyme cible (Leroux et al. 2002; Ma and Michailides 2005) (Figure 1). Bien que la cellule puisse avoir recours à ces différents mécanismes pour survivre à l'action des pesticides, certains sont prédominants chez les champignons et oomycètes. Les trois principaux mécanismes sont la modification de la cible, la surexpression de la cible, l'exportation à l'extérieur de la cellule.

Modification au niveau de la cible

Le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les champignons et oomycètes est la modification de la cible causée par des mutations au niveau des gènes codant pour la protéine cible (Mair et al. 2016). Ces mutations se traduisent par une modification de la séquence d'acides aminés de cette protéine, ce qui peut induire un changement de conformation et, lorsque ce changement de conformation est suffisamment important, une diminution de l'affinité du fongicide pour sa cible. Ces mutations surviennent de façon aléatoire dans l'environnement et à une très basse fréquence (1 sur 100 millions), mais l'exposition aux fongicides induit une pression de sélection qui permet aux mutants résistants de persister dans l'environnement. Ces mutations peuvent cependant avoir un coût d'adaptation plus ou moins élevé, ce qui peut aussi affecter la capacité d'adaptation du mutant résistant. Ainsi, la persistance de ces mutations peut également varier en fonction de la fréquence d'utilisation des fongicides.

La résistance des champignons et oomycètes aux fongicides unisites est majoritairement conférée par ce mécanisme et c'est aussi le mieux documenté (Mair et al. 2016). C'est le cas

notamment des fongicides appartenant à la famille des strobilurines (QoI), des carboxamides (SDHI), des triazoles (DMI), des dicarboximides, des hydroxianilides et des amides de l'acide carboxylique.

Surexpression de la cible

La surexpression de la cible permet également à la cellule de diminuer l'effet du fongicide sur certaines voies métaboliques. Comme le fongicide est en compétition avec le substrat naturel de la cible, le fait de surexprimer celle-ci permet à la cellule de maintenir fonctionnelle la voie métabolique correspondante. Dans le cas des mécanismes de surexpression, il est possible de recouvrer l'efficacité du produit en augmentant la dose du fongicide. Cette option est cependant couramment limitée puisqu'il faut généralement utiliser des doses plus grandes que celles homologuées.

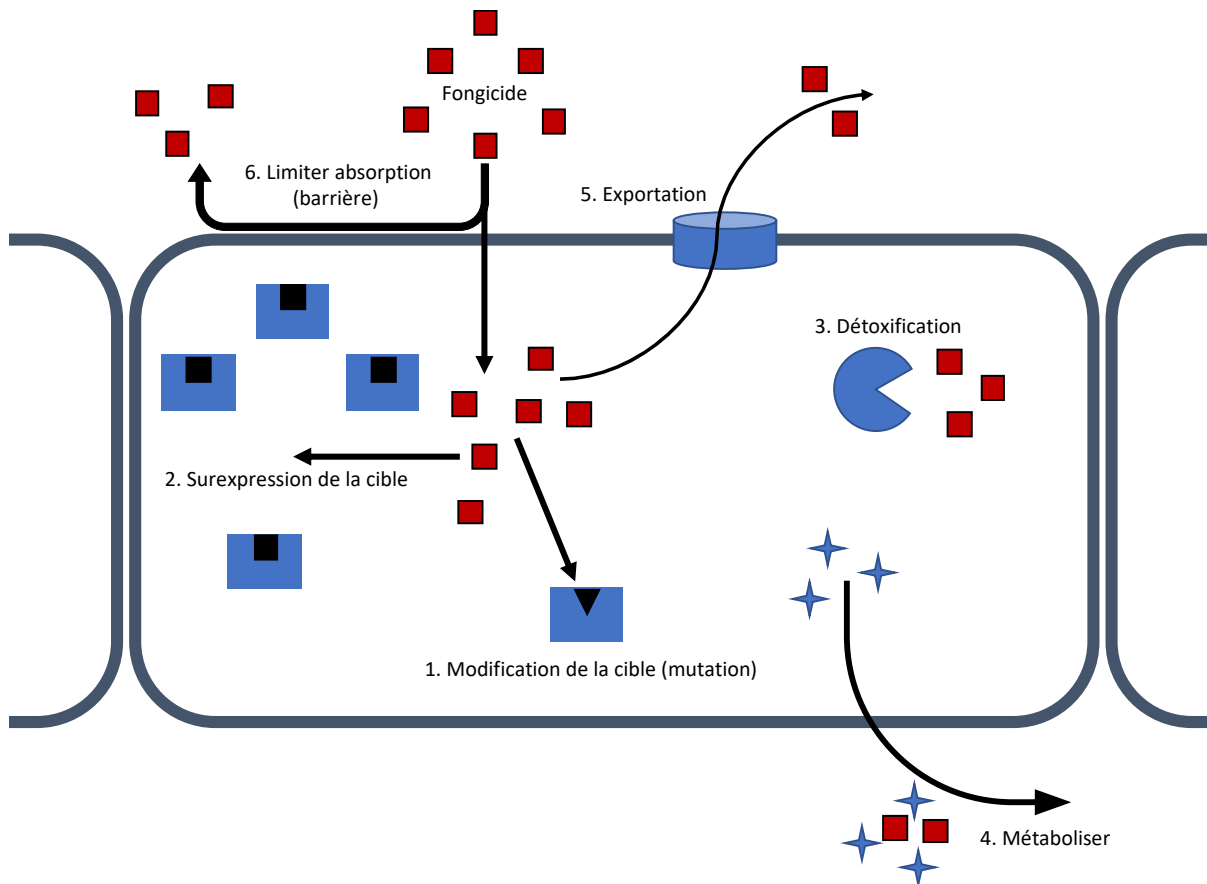


Figure 1. Schématisation des mécanismes de résistance aux fongicides rencontrés chez les champignons et oomycètes (adapté de Acero et al. 2011).

Exportation (transporteurs à efflux)

Les pompes à efflux permettent à la cellule d'exporter les molécules qu'elle considère toxiques à l'extérieur de celle-ci. Les champignons utilisent naturellement des pompes à efflux, notamment les

transporteurs ABC (ATP-binding cassette) ou les transporteurs MFS (major facilitator superfamily) (Kretschmer et al. 2009). Ces transporteurs permettent d'excréter plusieurs fongicides indépendamment de leurs groupes ou cibles, et sont donc généralement associés à des résistances multiples (MDR). Il a été démontré que des mutations conduisant à la surexpression de certains de ces transporteurs pourraient être liées à une résistance MDR pour différents pathogènes, incluant *Botrytis cinerea* (Kretschmer et al. 2009; Leroux et al. 1999).

Détoxification

La cellule d'un agent phytopathogène peut se détoxifier pour contrer l'effet d'un fongicide. En effet, celle-ci possède un vaste réseau métabolique nécessaire aux processus cellulaires normaux. Ce réseau métabolique peut transformer le fongicide en une forme non toxique, inoffensive pour la cellule. Certains fongicides sont d'ailleurs utilisés comme profongicides inactifs, nécessitant une métabolisation supplémentaire par la cellule fongique pour devenir actifs. Si le métabolisme fongique est altéré au point d'empêcher l'activation, la forme active du fongicide n'est pas produite (FRAC, <https://www.frac.info/>)

Métabolisation

Le métabolisme au sein de la cellule fongique est l'un des mécanismes utilisés par certains agents phytopathogènes pour détoxifier un composé étranger tel qu'un fongicide. Un champignon capable de dégrader rapidement un fongicide peut potentiellement l'inactiver avant qu'il n'atteigne son site d'action. Ainsi, la cellule du champignon peut métaboliser un fongicide pour contrer son effet en le modifiant chimiquement afin de le rendre inactif ou plus facile à excréter. Ce processus repose sur plusieurs types de réactions enzymatiques, telles que la dégradation enzymatique du fongicide impliquant les cytochromes P450, l'utilisation d'hydrolases qui cassent les liaisons chimiques du fongicide, entraînant sa fragmentation en composés inactifs, ainsi que sur la conjugaison avec des molécules protectrices, telle que la conjugaison avec le glutathion (Leroux et al. 2002).

Dans certains cas, la détoxification du fongicide suit une succession de réactions, incluant l'oxydation, la conjugaison et l'excrétion, formant un mécanisme de détoxification en trois phases : 1) Modification du fongicide par oxydation, réduction ou hydrolyse (via P450, hydrolases, etc.), 2) conjugaisons avec des molécules facilitant son élimination (glutathion, sucre, etc.) et 3) Transport et excrétion vers l'extérieur ou vers des compartiments de stockage intracellulaires (Leroux et al. 2002).

Réduction de l'absorption

La cellule d'un agent phytopathogène peut réduire l'absorption d'un fongicide par plusieurs mécanismes, principalement liés à des modifications de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique. Parmi ces modifications, on retrouve la modification de la perméabilité membranaire par la modification de la composition lipidique de la membrane et la modification ou la réduction de l'expression de transporteurs membranaires spécifiques qui facilitent normalement l'entrée du fongicide, l'altération de la paroi cellulaire, la sécrétion de substances protectrices et le changement du pH extracellulaire (Leroux et al. 2002).

Production d'une enzyme alternative

La production d'une enzyme alternative capable de remplacer l'enzyme cible d'un fongicide repose sur plusieurs mécanismes cellulaires et évolutifs. Parmi ces mécanismes, on retrouve la duplication génique et la divergence fonctionnelle où la cellule pathogène peut subir une duplication génique où une copie du gène codant pour l'enzyme cible est créée. Ensuite, par des mutations successives et la sélection naturelle, cette copie peut évoluer vers une enzyme ayant une fonction similaire, mais insensible au fongicide. Le recrutement d'une enzyme préexistante représente aussi un mécanisme par lequel une enzyme alternative est produite et confère de la résistance aux fongicides. Ainsi, dans certains cas, une enzyme ayant une fonction différente, mais proche peut être recrutée et surexprimée pour pallier l'inhibition de l'enzyme cible. Cette redondance métabolique permet à l'agent pathogène de contourner l'effet du fongicide (Leroux et al. 2002, Fernández Acero et al. 2011).

Les facteurs liés au développement de la résistance aux fongicides.

Les risques associés au développement de résistance aux fongicides varient principalement en fonction de l'agent pathogène et du type de fongicide. Dans leur ouvrage de référence, Brent et Hollomon (2007b) suggèrent en fait que le risque de développement d'une résistance soit le fruit d'une combinaison des deux risques (agents pathogènes X fongicides).

Risque associé à l'agent pathogène

Il existe une grande variation en ce qui a trait au risque, dépendamment de la classe, du genre et de l'espèce de l'agent pathogène. Une liste des agents pathogènes à haut risque de développement de résistance est présentée au tableau 2. Selon Brent et Hollomon (2007b), les critères de classification servant à classer les pathogènes selon les risques de développement de résistance sont déterminés par :

- La durée du cycle de vie de l'agent pathogène : plus la durée du cycle est courte et plus la fréquence d'utilisation des fongicides risque d'être élevée, donc plus le risque de sélection pour les résistants est élevé.

- L'abondance de la sporulation : comme le taux de mutation conduisant à un phénotype résistant est très bas, plus la quantité de spores libérées dans l'environnement est élevée, plus le nombre de génomes individuels pouvant être mutés est élevé. Ainsi, la sélection des phénotypes résistants est accélérée.

- La distance sur laquelle les spores peuvent se disperser (d'une plante à l'autre, d'un champ à l'autre, d'une région à l'autre). Par exemple, les spores qui sont principalement dispersées par les éclaboussures sont dispersées sur de courtes distances, ce qui ralentit la progression des souches résistantes. Au contraire, les espèces qui sont transportées principalement par le vent sont dispersées sur de plus grandes distances. La progression des souches résistantes est conséquemment plus rapide.

- La capacité d'infecter tous les stades phénologiques de sa plante hôte. Si l'agent pathogène représente une menace pour la culture pendant toute la durée de la production, le nombre d'applications de fongicides risque d'être plus élevé et la pression de sélection sera également plus grande.

- La capacité d'infecter plus d'une plante hôte. Lorsqu'une espèce pathogène est capable d'infecter plus d'une espèce de plante, le risque de dispersion des souches résistantes est plus important.

- La présence d'un cycle de reproduction sexuée. La recombinaison génétique qui a lieu lors de la reproduction sexuée peut autant favoriser le développement de résistance que le défavoriser.

- La capacité à muter et à exprimer les gènes mutés. D'une part, certains agents pathogènes semblent avoir une plus grande facilité à produire des mutants. Les organismes diploïdes (ou polyplloïdes) pourraient ne pas exprimer certaines mutations récessives. Enfin, certaines mutations ont un coût d'adaptation plus ou moins élevé chez différents organismes, ce qui peut influencer le maintien de ces mutations dans différentes populations. Par exemple, la mutation G143A ne semble pas avoir un coût d'adaptation puisque celle-ci est reconnue pour perdurer dans l'environnement malgré le retrait de la pression de sélection (Veloukas et al. 2014). Ce n'est toutefois pas le cas pour les mutations conférant la résistance au groupe 17, qui semblent avoir un effet négatif sur la croissance et le taux de survie. De plus, chez les mutants de laboratoire, une réduction de la sporulation et de la virulence a été observée (Billard et al. 2011).

Tableau 2. Agents pathogènes classés dans la catégorie de risque élevé pour le développement de résistance aux fongicides selon la FRAC.

Agent pathogène	Culture	Maladie
<i>Alternaria alternata</i>	diverses	taches alternariennes
<i>Botrytis cinerea</i>	diverses	moisissures grises
<i>Botrytis allii</i>	oignons	pourriture du col
<i>Botrytis elliptica</i>	lys	brûlure de la feuille
<i>Botrytis squamosa</i>	oignons	brûlure de la feuille
<i>Blumeria graminis</i>	blé/orge	blanc
<i>Corynespora cassiicola</i>	soya (et autres)	Corynesporiose
<i>Dydimella bryoniae</i>	cucurbitacées	chancre gommeux/pourri
<i>Plasmopara viticola</i>	vigne	mildiou
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	cucurbitacées	mildiou
<i>Pseudocercospora (Mycosphaerella) fijiensis</i>	bananes	Cercosporiose noire
<i>Ramularia collo-cygni</i>	orge	ramulariose
<i>Podosphaera xanthii</i>	cucurbitacées	blanc
<i>Venturia inaequalis</i>	pomme	tavelure
<i>Pyricularia oryzae</i>	riz, gazon	pyriculariose

Risque associé aux fongicides

Chaque classe de fongicides est caractérisée par des mécanismes spécifiques qui seront traités en détail dans les sections qui suivent. Il est cependant possible d’anticiper les risques de résistance en fonction des types de fongicides et de leur(s) mode(s) d’action. Par exemple, les fongicides du groupe M ou multisites, comme le mancozeb ou le chlorothalonil, n’ont que très peu de cas de développement de résistance, même après plus de trois décennies d’utilisation (Brent and Hollomon 2007a). Au contraire, d’autres fongicides ayant des modes d’action plus spécifiques ou unisites sont plus enclins à développer des résistances. C’est le cas par exemple de l’iprodione (Pommer and Lorenz 1982) ou encore des strobilurines (Gullino et al. 2000; Ma and Michailides 2005), pour lesquels des cas de résistance ont été rapportés après moins de 10 ans d’utilisation. Pour d’autres, et bien qu’ils s’agissent également de fongicides unisites comme certains azoles, le développement de résistance peut prendre plus de temps et être limité à un nombre restreint d’agents pathogènes. Ainsi, ces connaissances des fongicides et des cas de résistance répertoriés, permettent d’anticiper les risques d’apparition de résistance pour les autres fongicides du même groupe.

Tableau 3. Grille d'estimation des risques de développement de résistance aux fongicides en fonction des risques associés à l'agent pathogène, au fongicide et au risque agronomique.

Fongicides*	Risque	Risque combiné			Risque agronomique **
Élevé benzimidazoles, strobilurines, phenylamides, dicarboximides SDHI	3	3 1.5 0.75	6 3 1.5	9 4.5 2.25	Élevé = 1 Modéré = 0.5 Faible = 0.25
Modéré DMIs phénylpyrroles, phosphorothiolates, anilinopyrimidines, MBI-Ds	2	2 1 0.5	4 2 1	6 3 1.5	Élevé = 1 Modéré = 0.5 Faible = 0.25
Faible sulfates de cuivre, chlorothalonil, dithiocarbamates phtalimides, MBI-Rs probenazole	0.5	0.5 0.25 0.125	1 0.5 0.25	1.5 0.75 0.3	Élevé = 1 Modéré = 0.5 Faible = 0.25
<div>Risque associé au fongicide</div> <div>Risque associé à l'agent pathogène</div>	1		2	3	
	Faible Exemples : <i>Pythium</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		Modéré Exemples : <i>Alternaria solani</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Erysiphe necator</i>	Élevé Exemples : <i>Botrytis</i> spp. <i>Alternaria alternata</i> <i>Plasmopara viticola</i> <i>Venturia inaequalis</i>	

* Adaptés de Brent et Hollomon (2007b);

** Modifié à partir de Grimmer et al. (2014);

Risque combiné

Dans leur ouvrage de référence, Brent et Hollomon (2007b) suggèrent qu'une combinaison des risques liés à l'agent pathogène et aux fongicides puisse permettre d'anticiper le développement de résistance chez certains agents pathogènes. Puisqu'il est difficile de quantifier l'interaction des deux risques de développement des résistances, on suppose que les facteurs sont équivalents et que leur interaction est multiplicative. Ainsi, l'unité de mesure de cet indicateur est arbitraire et la catégorisation est approximative. Kuck et Russell (2006) ont raffiné la grille d'évaluation des risques en ajoutant les risques agronomiques en tant que troisième facteur. Le risque agronomique est défini comme ayant deux composantes : un environnement plus ou moins propice au développement et à la propagation de la maladie et un effet « producteur » qui comprend des facteurs tels que l'intensité de la culture (densité, espacement, etc.) et l'utilisation ou pas de cultivars résistants ou sensibles.

Cependant, la classification des risques agronomiques selon Kuck et Russell (2006) est relativement arbitraire et ne fait pas l'unanimité.

Cette grille de décision est largement utilisée lorsqu'il est question de classer les risques de développement de la résistance. Cependant, il est important de rester prudent lors de l'interprétation de cette grille puisqu'il a été démontré qu'elle comporte un certain biais en faveur des fongicides de la catégorie à faible risque (Grimmer et al. 2014). En effet, c'est à l'aide de 67 combinaisons fongicides/pathogènes que Grimmer et al. (2014) ont déterminé que la grille de risque à trois facteurs permettait d'expliquer 72.8% de la variation en ce qui concerne le temps de développement de la résistance aux fongicides. Cependant, lorsque les fongicides unisites plus récents étaient retirés de l'analyse, la grille de risque n'expliquait plus que 25.8% de la variation. Ainsi, cette grille devrait être adaptée aux nouveaux modes d'action et agents pathogènes. Cela dit, la FRAC met encore cette grille à jour annuellement et la diffuse pour des fins de comparaison (Tableau 3).

Gestion de la résistance aux fongicides au champ

La résistance aux fongicides survient principalement en raison d'une pression de sélection exercée par l'usage répété de produits antifongiques ayant le même mode d'action. Des facteurs, tels qu'un dosage inadéquat, des applications trop fréquentes ou l'utilisation de produits à spectre réduit favorisent également l'apparition de résistances. La gestion de la résistance aux fongicides est un enjeu crucial pour préserver l'efficacité des traitements phytosanitaires et assurer une production agricole durable. L'émergence de souches de champignons pathogènes résistantes aux fongicides compromet la lutte contre les maladies des cultures, augmentant ainsi les pertes de rendement et les coûts de production. La gestion de la résistance au champ passe impérativement par une utilisation judicieuse des différents groupes de fongicides par les producteurs afin de retarder son apparition, et ainsi prolonger la vie utile des produits. Il est donc nécessaire de minimiser l'utilisation des fongicides à risque élevé de développement de résistance chez l'agent pathogène ciblé, ce qui réduit son exposition aux fongicides et par conséquent la pression de sélection sur celui-ci.

Différentes stratégies peuvent être mises en place pour se faire : soit l'application de produits tôt dans le développement de la maladie en espérant qu'aucune mutation ne soit déjà présente dans la population, l'application de doses réduites ou au contraire de pleines doses selon la situation, l'application de produits en mélange ou l'application de produits en alternance afin de réduire la pression de sélection sur une seule cible biologique (Ishii and Hollomon 2015, Leadbeater et al. 2019). L'utilisation simultanée de matières actives appartenant à des groupes différents permet de contrôler les souches qui seraient résistantes à l'un des produits, mais pas à l'autre alors que l'utilisation de

produits de différents groupes en alternance permet de réduire l'exposition des souches à chaque matière active individuelle et ainsi réduire leur risque de développer de la résistance. De plus, faire une application raisonnée des fongicides, soit d'éviter les traitements systématiques et n'intervenir qu'en cas de nécessité, en fonction des seuils épidémiologiques et des conditions climatiques permettent de limiter l'exposition aux fongicides si ce n'est pas vraiment nécessaire. Utiliser des bonnes pratiques agricoles en intégrant des méthodes agronomiques telles que la rotation des cultures, le choix de variétés résistantes et l'amélioration des conditions de culture pour réduire l'incidence des maladies et donc diminuer le besoin de recourir aux fongicides fait aussi partie des stratégies de gestion de la résistance à adopter. Finalement, recourir à des solutions alternatives comme les agents de biocontrôle (bactéries, champignons antagonistes) et les stimulateurs de défense des plantes pour réduire la dépendance aux fongicides chimiques représente aussi une stratégie à envisager. Le choix de la stratégie doit se baser sur une bonne connaissance de la biologie de l'agent pathogène concerné, des mécanismes de résistances présents, des modes d'action des fongicides, de la présence de résistance croisée et de l'historique de résistance (McGrath 2001).

En cas de résistance soupçonnée aux fongicides, effectuer de la surveillance et du diagnostic de résistance par la mise en place d'un suivi régulier des populations de phytopathogènes pour détecter précocement l'apparition de résistances et adapter les stratégies de lutte en conséquence. Des tests *in vitro*, *in vivo* et/ou des tests moléculaires de détection de mutation(s) sur les souches présentes aux champs permettent de déterminer si elles sont bel et bien résistantes aux matières actives des produits appliqués, leur niveau de résistance s'il y a lieu et la proportion des souches d'un même champ ou d'une même ferme qui sont résistantes. En fonction des résultats de ces tests, des mesures peuvent être prises afin d'adapter la régie de traitement en fonction de ces nouvelles connaissances. Il peut ainsi être préférable d'éviter l'utilisation de produits contenant des matières actives qui favoriseraient le développement de la résistance ou de produits qui ne sont tout simplement pas efficaces à cause de la forte proportion de souches résistantes.

La gestion de la résistance aux fongicides nécessite une approche intégrée combinant des stratégies chimiques et non chimiques. Une utilisation responsable et diversifiée des moyens de protection des cultures permet de prolonger l'efficacité des fongicides.

Modes d'action des fongicides à risque élevé pour le développement de la résistance

Strobilurines (Groupe FRAC 11)

La classe des strobilurines (Qols) comprend une vingtaine de matières actives et une centaine de fongicides homologués contre différents agents pathogènes dans plus de 80 cultures (Sierotzki and Stammler 2019). L'activité antifongique des strobilurines a été rapportée au milieu des années 1970, à partir de dérivés de champignons tels que *Oudemansiella mucida* et *Strobilurus tenacellus*. Les premières matières actives synthétiques ont quant à elles été découvertes au milieu des années 1980, mais il faudra attendre 1996 avant que les premiers fongicides du groupe ne soient commercialisés par Syngenta (azoxystrobine) et BASF (krésosxim-méthyl) (Bartlett et al. 2002). C'est l'un des seuls groupes de fongicides permettant le contrôle d'agents pathogènes appartenant à toutes les classes, autant les ascomycètes, les oomycètes ou les basidiomycètes. Cette caractéristique des strobilurines vient du fait que leur action affecte la respiration cellulaire en inhibant l'oxydation du coenzyme Q situé sur la face externe du cytochrome *b* (cyt *b*) (Bartlett et al. 2002).

C'est grâce aux travaux de Becker en 1981 sur le myxothiazol que le mode d'action des strobilurines a été décrit. C'est plus précisément en empêchant le transfert des électrons au site d'oxydation externe des quinols (Qo) du cytochrome bc1 de la chaîne de respiration mitochondriale (Bartlett et al. 2002). Cette inhibition de la respiration mitochondriale se traduit par une diminution de l'ATP disponible pour les autres voies métaboliques et conséquemment un manque d'énergie. C'est aussi pour cette raison que les fongicides de ce groupe affectent tous les stades de développement de l'agent pathogène (germination des spores, croissance mycélienne, motilité des zoospores) (Stevenson et al. 2019). Le site de liaison des strobilurines peut être divisé en trois régions : le toxophore, une zone de jonction et une queue hydrophobe (Link et al. 2003). Le toxophore forme une cavité aromatique formée par six résidus incluant le résidu Phe129 (ou F129) (Link et al. 2003). La zone de jonction se situe quant à elle entre le toxophore et la queue hydrophobe. C'est à cet endroit que se lient les strobilurines et la stabilité de l'interaction entre le produit et sa cible est conférée par une interaction de Van der Waals entre ce dernier et quatre résidus, incluant le résidu Gly143 (ou G143) (Link et al. 2003). Ces deux régions sont particulièrement importantes pour le développement de la résistance aux strobilurines.

La résistance aux strobilurines est principalement conférée par une substitution d'une glycine pour une alanine à la position 143 du cyt *b*, ou mutation G143A (Gisi et al. 2002). Cette mutation induit un subtil changement de conformation en présence d'une strobilurine, qui rend difficile la liaison entre le fongicide et la cible (Link et al. 2003). Cependant, la mutation G143A ne semble pas occasionner de

perturbation en l'absence de strobilurines, ce qui ne réduit que très peu l'activité du *cyt b* (Link et al. 2003). En fait, toutes les autres substitutions évaluées à cette position réduisaient l'activité du *cyt b* de plus de 89% comparativement à la mutation G143A, qui réduisait l'activité du *cyt b* de moins de 38% par rapport aux souches sauvages (Link et al. 2003). En plus de la mutation G143A, la substitution d'une phénylalanine pour une leucine à la position 129 (F129L) est également possible, bien que moins fréquente et confère aux agents pathogènes un facteur de résistance moins élevé (Stevenson et al. 2019). Il est également possible de rencontrer chez plusieurs espèces une insertion (intron) de plusieurs centaines de paires de bases à la position G143. Toutefois, cet intron préviendrait l'apparition de la mutation G143A et diminuerait possiblement le développement de la résistance chez certaines espèces.

Les cas de résistance aux fongicides ont été rapportés rapidement après l'introduction de ces fongicides sur le marché et le nombre d'espèces résistantes ne fait qu'augmenter (Tableau 4). À elle seule, la mutation G143A confère une résistance croisée à plusieurs fongicides du groupe (Figure 2). La résistance croisée peut être révélée en comparant les CI_{50} de souches sensibles et résistantes pour différents fongicides du même groupe (Figure 2). C'est également en comparant les CI_{50} de souches mutantes et sauvages qu'on peut déterminer la dose de fongicides qui permet de discriminer les isolats sensibles ou résistants.

Tableau 4. Exemples de champignons phytopathogènes résistants aux strobilurines.

Agent pathogène*	Maladie	Plant hôte	Lieu	Mécanisme	Abondance
<i>Alternaria alternata</i>	Brûlure alternarienne	Pistache	E.U.	G143A	+++
<i>Alternaria alternata</i>	Brûlure alternarienne	Tomate, pomme de terre	Europe	G143A	+++
<i>Alternaria mali</i>	Tache alternarienne	Pomme	E.U.	G143A	+++
<i>Alternaria solani</i>	Brûlure hâtive	Pomme de terre	É.-U., Europe	F129L	+++
<i>Blumeria graminis</i>	Blanc	Blé, orge	Europe	G143A	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	Moisissure grise	Fraise, vigne, autre	Europe Canada É.-U.	G143A	+++
<i>Cercospora beticola</i>	Tache cercosporéenne	Betterave à sucre	E. U.	G143A	+++
<i>Cercospora soja</i>	Tache cercosporéenne	Soya	E.U.	G143A	+++
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Anthraxose	Fraise, bleuet	E.U. Canada	G143A G137R	+++
<i>Erysiphe necator</i>	Blanc	Vigne	É.-U., Europe	G143A	+++
<i>Plasmopara viticola</i>	Mildiou	Vigne	E.U., Europe	G143A et F129L	+++
<i>Podosphaera xanthii</i>	Blanc	Concombre	É.-U., Asie	G143A	+++
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Mildiou	Cucurbites	É.-U., Asie	G143A	+++
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Brûlure pythienne	Gazon	E.U.	G143A	+++
<i>Ramularia collo-cygni</i>	Ramularia	Orge	E.U.	G143A	+++
<i>Stemphylium vesicarium</i>	Tache stemphyllienne	Asperge, poire	E.U.	G143A	NA
<i>Venturia inaequalis</i>	Tavelure	Pomme	É.-U., Canada	G143A	+++
<i>Zymoseptoria tritici</i>	Septoriose	Blé	E.U.	G143A, F129L	+++

* Extrait de (Stevenson et al. 2019)

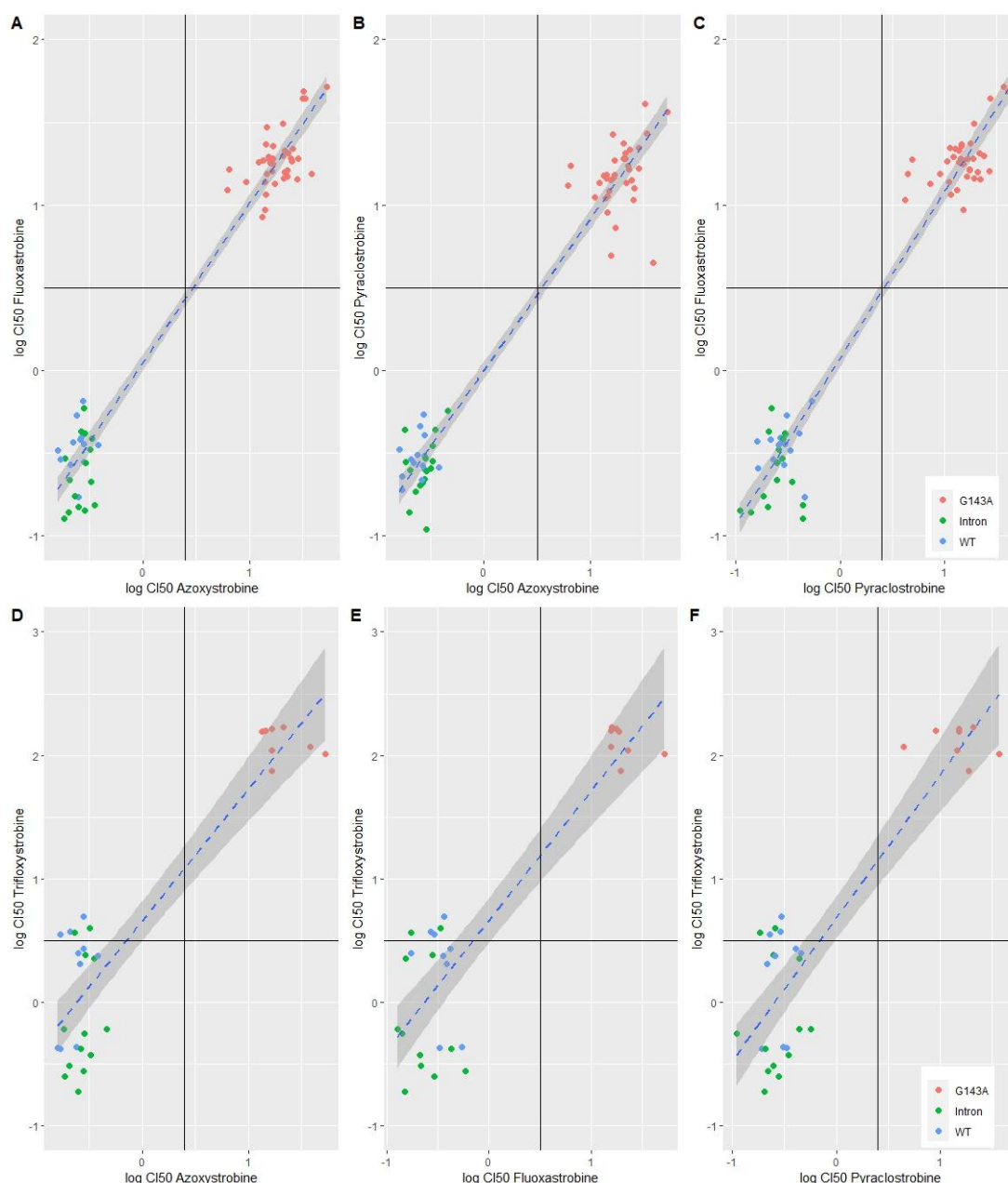


Figure 2. Patterns de résistance croisée chez *B. cinerea* pour quatre fongicides appartenant au groupe FRAC 11. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (Groupe FRAC 7)

Les premiers inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHIs) ont été homologués à la fin des années 1960. Les premières matières actives de cette classe de fongicides (carboxine et oxycarboxine) étaient utilisées principalement en traitement de semences et destinées au contrôle spécifique des basidiomycètes (Klappach and Stammler 2019). La seconde série de SDHIs homologués à la fin des années 1980 (i.e. mepronil, flutolanil, etc.) avait un spectre d'action un peu plus large, mais était toujours limitée aux basidiomycètes (Klappach and Stammler 2019). Il a fallu attendre jusqu'en 2003

pour qu'une nouvelle matière active soit homologuée : le boscalide. Cette nouvelle matière active surpassait en efficacité les autres fongicides du même groupe et procurait un contrôle des ascomycètes, en plus de celui des basidiomycètes. Au cours des quinze dernières années, une douzaine de nouvelles molécules appartenant à ce groupe ont été développées et homologuées dans différentes cultures et pour différents agents pathogènes (Sierotzki and Scalliet 2013). C'est probablement le groupe le plus intéressant et complexe en ce qui a trait à la résistance aux fongicides.

Tous les fongicides du groupe inhibent le complexe II de la chaîne de respiration mitochondriale ou complexe de la succinate déshydrogénase (Sdh). C'est le plus petit complexe dans la chaîne respiratoire et comprend quatre sous-unités nommées SdhA, B, C et D (Figure 3) (Avenot and Michailides 2010). Les sous-unités A et B sont à l'intérieur de la matrice mitochondriale, alors que les sous-unités C et D sont deux protéines membranaires qui permettent l'ancrage du complexe enzymatique à la membrane mitochondriale interne (Avenot and Michailides 2010; Yin et al. 2011). La SdhA est liée de manière covalente à un cofacteur d'oxydoréduction situé sur la SdhB, qui contient également trois centres fer-soufre organisés en une chaîne linéaire de transport d'électrons jusqu'au site de liaison à l'ubiquinone, site qui sert également à lier entre elles les sous-unités B, C et D. Le Sdh joue un rôle essentiel dans la voie du transport des électrons dans la mitochondrie, ainsi que dans le cycle de l'acide tricarboxylique. Il est responsable de l'oxydation du succinate en fumarate, suivie du transport des électrons à travers la chaîne de transport pour permettre la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol 3 (Avenot and Michailides 2010).

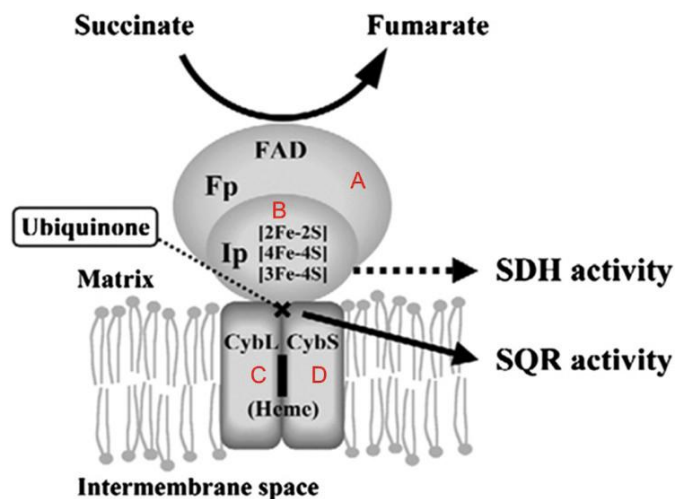


Figure 3. Complexe de la succinate déshydrogénase (SDH) (Avenot et Michailides, 2010).

Les SDHs s'attachent au site de liaison de l'ubiquinone et bloquent le transfert des électrons du succinate à l'ubiquinone. Ils affectent donc deux processus fondamentaux du cycle de Krebs, soit 1) la chaîne de transport des électrons au niveau de la mitochondrie en diminuant la quantité d'ubiquinones et 2) le cycle de l'acide citrique en inhibant la conversion du succinate en fumarate. Tous les SDHs partagent des caractéristiques similaires importantes pour l'activité antifongique : un groupe amine et un cycle aromatique (Klappach and Stammler 2019).

Les premières indications qu'une mutation pourrait être responsable des cas de résistance aux SDHs ont été rapportées pour *Ustilago Maydis* et *Aspergillus nidulans* dans les années 1970 (Sierotzki and Scalliet 2013). Ces mutants résistants avaient été sélectionnés en laboratoire suite à l'exposition aux UV de souches sur milieu amendé des matières actives. Depuis, il a été confirmé que des mutations sur les gènes codant pour les différentes sous-unités de la SDH confèrent un phénotype résistant aux souches mutées. L'étude de la résistance aux SDHs s'est accélérée avec l'homologation et l'augmentation de l'utilisation des SDHs de troisième génération et des cas de résistance ont été rapportés pour plusieurs agents pathogènes incluant entre autres *B. cinerea* et *A. alternata* (Avenot and Michailides 2019; Fernández-Ortuño et al. 2012; Kim and Xiao 2011; Leroy et al. 2011; Myresiotis et al. 2008; Veloukas et al. 2011; Veloukas et al. 2012; Yin et al. 2011). Jusqu'à présent, seule la mutation est identifiée comme mécanisme de résistance pour ce groupe de fongicides. Au total, plus de 27 mutations confèrent un phénotype de résistance aux SDHs, les principales étant situées sur le gène codant pour la SdhB. Quelques mutations sont également possibles sur les gènes codant pour les sous-unités C et D (Sierotzki and Scalliet 2013). Pour *B. cinerea* par exemple, les mutations situées aux positions 225 (P225F/L/T), 230 (N230I) et 272 (H272L/R/V/Y) du SdhB, 85 (A85V) du SdhC et 132 (H132R) du SdhD sont toutes possibles (Mair et al. 2016).

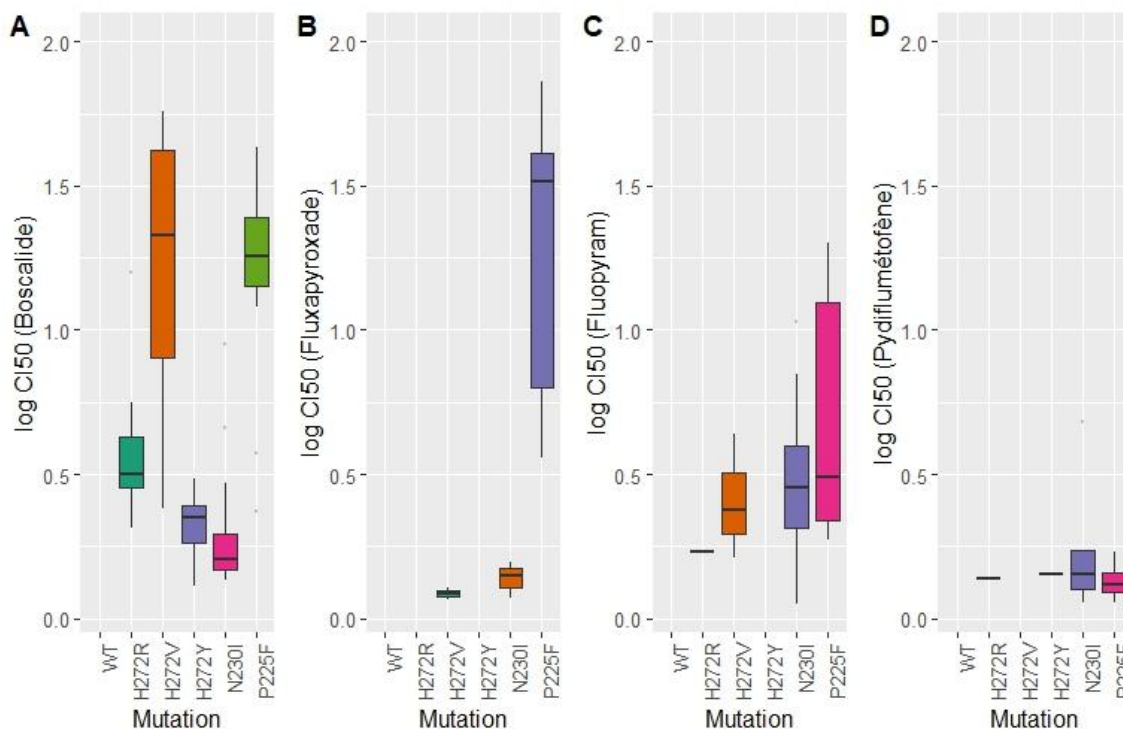


Figure 4. Exemples de CI_{50} pour quatre fongicides du groupe 7 et pour six génotypes de *B. cinerea*. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

Contrairement aux strobilurines, les différentes mutations associées à la résistance aux SDHIs ne confèrent pas nécessairement une résistance croisée. La résistance croisée, c'est-à-dire une résistance à deux fongicides conférés par un même gène, est donc possible, mais pas obligatoire (Figure 4). Dans le cas de *B. cinerea* par exemple, la mutation H272R qui est relativement abondante dans certains systèmes (Fernández-Ortuño et al. 2012; Veloukas et al. 2011; Veloukas et al. 2012; Yin et al. 2011) confère à *B. cinerea* une résistance au boscalide, mais pas au fluopyram ni au fluxapyroxad (Figure 4). La mutation N230I quant à elle confère une résistance modérée aux trois fongicides, tandis que la mutation P225F confère une résistance élevée aux trois fongicides (Figure 4). Ces patrons de résistance complexes rendent l'interprétation des résultats ardue et exacerbent l'importance de faire le suivi de la résistance dans les populations d'agents pathogènes à risque de développement de résistance.

Dicarboximides (Groupe FRAC 2)

Homologuées à la fin des années 1970, les trois plus importantes matières actives du groupe sont l'iprodione, le vinclozolin et la procimidone. Cela dit, seul l'iprodione est actuellement homologué au Canada. Les principaux agents pathogènes ciblés par les dicarboximides sont les *Botrytis* spp., *Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia* spp. et *Alternaria* spp.. Il s'agit d'un des trois premiers

groupes, avec les phénylamides et les benzimidazoles, pour lesquels une résistance pratique a été observée (Beever et al. 1989; Pommer and Lorenz 1982)

Les dicarboximides interfèrent avec la voie de transduction du signal osmotique (osmorégulation), conduisant à une augmentation létale de glycérol dans la cellule. Cette voie de transduction du signal osmotique comprend une histidine kinase et une série de protéines kinases organisées en cascade (Cui et al. 2002; Cui et al. 2004; Leroux et al. 2002; Oshima et al. 2006; Oshima et al. 2002). Les dicarboximides se lieraient à cette histidine kinase, homologue du gène *os-1* chez *Neurospora crassa*, et c'est cette histidine kinase qui a été proposée comme site d'action. Les mécanismes de résistance ont été étudiés principalement pour *B. cinerea*, mais le site d'action primaire des dicarboximides est encore à élucider. Cependant, des mutations sur le gène *os-1* aux positions 365 (I365S/N/R), 368 (V368F), 369 (Q369H), 447 (T447S) et 369 + 373 (Q369P + N373S) ont été identifiées chez les souches résistantes (Cui et al. 2004; Grabke et al. 2012; Grabke et al. 2013; Leroux et al. 2002). Chez *B. cinerea*, un second mécanisme de résistance a été rapporté à la fin des années 1990 (Leroux et al. 1999; Leroux et al. 2002). Les phénotypes de résistance multiple (MDR) ont été identifiés en fonction de leur patron d'insensibilité et nommés MDR1-2-3 et MDR1h. Ces mécanismes de résistance seront abordés dans les sections suivantes, particulièrement lorsqu'il sera question des groupes FRAC 9 et 12.

La proportion d'isolats résistants varie grandement d'une population à l'autre et d'un agent pathogène à l'autre, mais des cas de résistance sont rapportés pour la plupart des agents pathogènes pour lesquels le produit est homologué (*B. cinerea*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia minor*, *Alternaria assicae*, *Rhizoctonia solani*, *B. squamosa*), à l'exception de *S. sclerotiorum*, qui demeure sensible à l'iprodione malgré son usage (Beever et al. 1989; Campion et al. 2003; Carisse and Tremblay 2007; Grabke et al. 2013; Iacomini-Vasilescu et al. 2004; Ma et al. 2006a). Les facteurs de résistance aux fongicides varient généralement d'un facteur de 10 lorsque le mécanisme impliqué est une mutation (Figure 5) et entre 2 et 5 lorsqu'il s'agit d'un MDR (Walker et al. 2013).

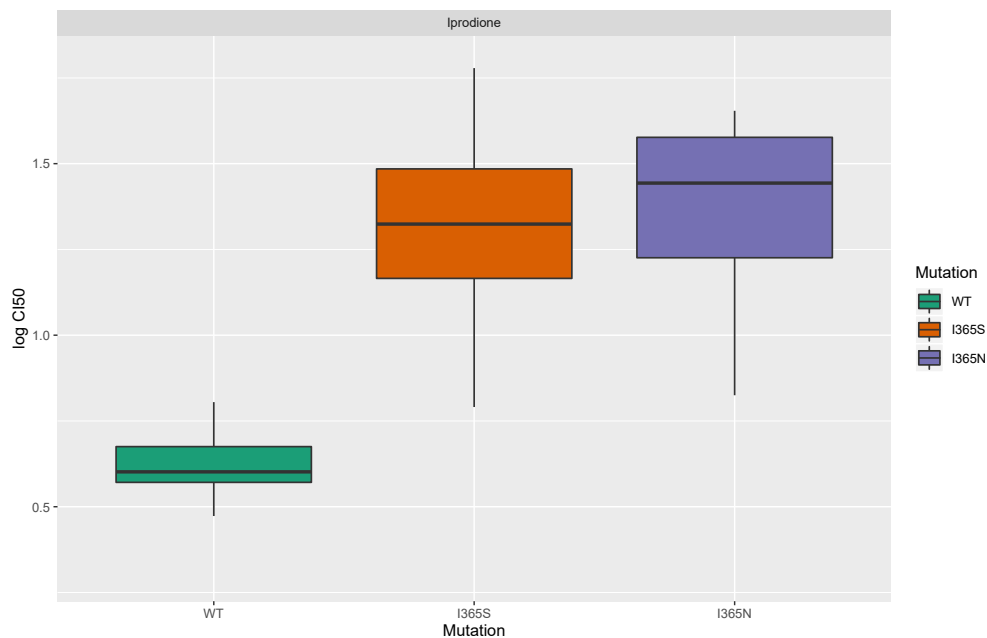


Figure 5: Exemples de CI_{50} pour trois géotypes de *B. cinerea* résistants ou sensibles à l'iprodione. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

Les mutants de *B. cinerea* très résistants aux dicarboximides sont facilement induits dans des conditions de laboratoire, mais sont également sensibles au stress osmotique. Cette caractéristique suggère que le maintien des souches résistantes au sein des populations peut être relativement instable. En effet, une étude réalisée dans les vignobles français a révélé qu'une brève interruption de l'utilisation de dicarboximides peut entraîner une forte diminution de la fréquence de la résistance, ce qui suggère que les souches résistantes subissent une pénalité d'adaptation élevée, comme démontré avec les mutants de laboratoire. Par conséquent, la résistance aux dicarboximides pourrait être facilement gérée en limitant le nombre d'applications et en organisant de longues rotations dans l'utilisation de ce fongicide (Walker et al. 2013).

Méthyl benzimidazoles carbamates (Groupe FRAC 1)

Les premiers méthyl benzimidazoles carbamates (MBCs) ont été homologués au courant des années 1960 pour le contrôle d'un large éventail d'agents pathogènes, dans plusieurs cultures, tant en applications foliaires qu'en traitements de semences et même en post-récolte. Les matières actives les plus connues de ce groupe sont certainement le bénomyle et le thiophanate méthyle. Le bénomyle ayant été retiré du marché par Dupont en 2001, il ne reste actuellement que le thiophanate méthyle d'homologué au Canada et ailleurs.

Les MBCs se lient spécifiquement à la β -tubuline prévenant l'assemblage des microtubules (Leroux et al. 2002). Les microtubules constituent l'une des principales composantes du cytosquelette. Ils sont

constitués de longs cylindres assemblés en dimers d'alpha et de bêta-tubuline qui s'assemblent en protofilaments. Ceux-ci s'attachent à d'autres protofilaments pour ainsi former un microtubule. Les microtubules s'assemblent et se défont constamment dans un processus d'instabilité dynamique essentiel à leurs différentes fonctions (Olaya and Geddens 2019). Pour tout organisme, le cytosquelette est essentiel pour l'organisation structurale de la cellule, la méiose, la mitose, la formation de vésicules, etc. (Olaya and Geddens 2019). Chez les champignons filamenteux, le cytosquelette est également impliqué dans la transduction du signal, l'adhésion, la croissance mycélienne et même la pathogénicité (Olaya and Geddens 2019).

Comme pour plusieurs groupes de fongicides, le mécanisme de résistance principal pour les MBCs est la présence de mutations. L'activité fongicide des MBCs est déterminée par l'affinité spécifique de l'inhibiteur sur la β -tubuline. Ainsi, la résistance aux MBCs résulte de mutations sur le gène codant pour cette dernière. Le phénotype résistant a été associé à des mutations à six différentes positions soit aux positions 6, 50, 167, 198, 200 et 240, mais les plus fréquentes sont aux positions 198 (E198A) et 200 (F200Y) (Ma and Michailides 2005). La mutation E198A confère une résistance élevée (facteur de résistance >100) tandis que la mutation F200Y un facteur de résistance modéré (facteur de résistance de +/- 10) (Figure 6) (Malandrakis et al. 2011). On estime à 115 le nombre d'espèces de champignons pathogènes résistantes aux MBCs (Olaya and Geddens 2019). De plus, l'expérience pratique a démontré qu'une fois la résistance implantée, elle demeure stable et persiste au sein des populations et même lorsqu'une baisse de la proportion de résistants est observée, les niveaux remontent rapidement suite à la réintroduction d'un fongicide du groupe dans la rotation des fongicides (Olaya and Geddens 2019).

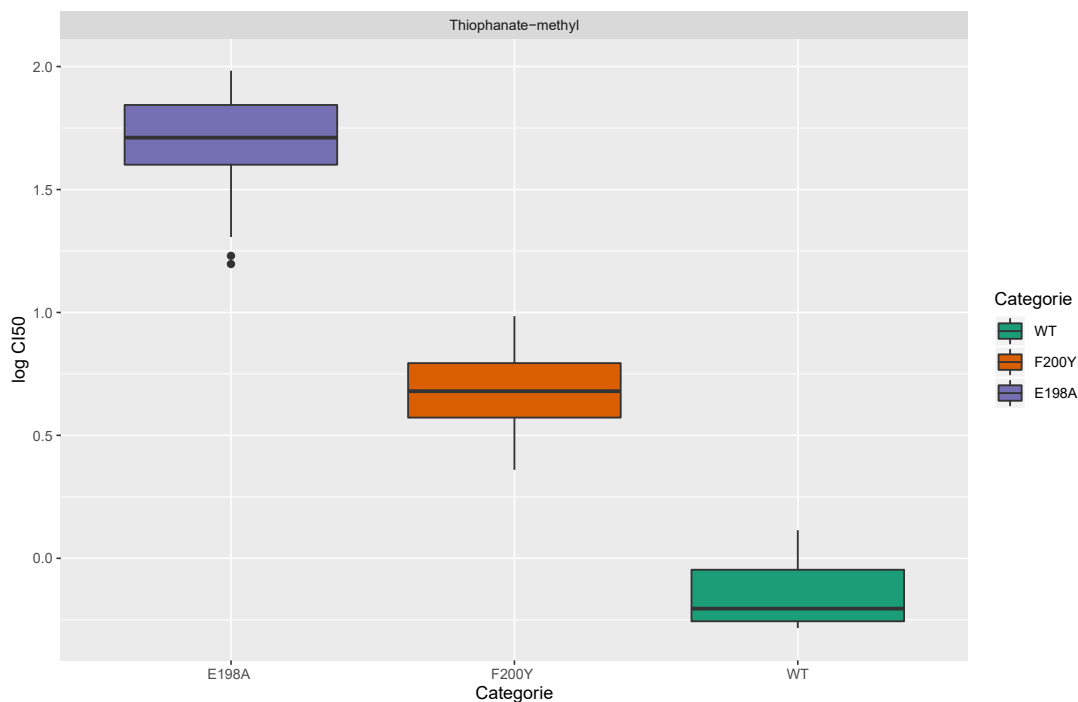


Figure 6. Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de *B. cinerea* résistants ou sensibles au thiophanate-méthyle. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

Inhibiteurs de la C-14 déméthylase (Groupe FRAC 3)

Les inhibiteurs de la C-14 déméthylase (DMIs) appartiennent à la famille des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (SBI). Les DMIs comptent le plus grand nombre de matières actives du groupe, soit : les triazoles, les imidazoles, les pipérazines, les pyrimidines et les pyridines (Ziogas and Malandrakis 2015). Ce sont des fongicides à large spectre homologués pour le contrôle des ascomycètes, deutéromycètes et basidiomycètes. Un peu plus de 40 molécules appartiennent à ce groupe, mais les principaux membres sont les dérivés de l'imidazole et du triazole (Ziogas and Malandrakis 2015). C'est en 1981, soit sept ans après l'introduction des premiers DMIs sur le marché, que les premiers cas de résistance pratiques ont été rapportés pour *B. graminis* F. sp. *hordei* et *Ustilago maydis* (Brent and Hollomon 2007b). Depuis, on rapporte des cas de résistance pour la plupart des agents pathogènes pour lesquels des DMIs sont homologués, incluant *B. cinerea*, *C. beticola*, *E. necator*, *P. xanthii* et *V. inaequalis* (Mehl et al. 2019).

Les DMIs inhibent la synthèse de l'ergostérol. Cette voie métabolique comprend 11 enzymes qui servent à convertir le squalène en ergostérol (Ziogas and Malandrakis 2015). Les DMIs inhibent l'étape de déméthylation du stérol C14 par la C-14 déméthylase, codée par le gène *cyp51*, pendant le processus de formation du stérol chez les champignons supérieurs. La déméthylation du lanostérol C14 (produit à l'étape précédente du cycle) est médiée par un cytochrome P450. Les DMI se lient au

fer hémique du cytochrome P450 avec un atome d'azote et inhibent la liaison de l'oxygène et son transfert au groupe méthyle du lanostérol C14, qui est la principale étape du processus de déméthylation du lanostérol C14 (Parker et al. 2011).

Plusieurs mécanismes biochimiques sont suggérés dans la résistance aux DMIs : 1) survie de cellules mutantes en présence de méthyl-stérois-C14 anormaux ou avec des quantités réduites dans la membrane plasmique; 2) Réduction de l'accumulation intracellulaire de fongicides, médiée par une pompe à efflux; 3) une modification de la cible dans le gène *cyp51* entraînant une diminution de l'affinité du fongicide pour sa cible; 4) la surexpression du gène *cyp51* pendant la formation d'ergostérol; et 5) la présence de multiples copies du gène *cyp51*, qui semblent réduire les coûts d'adaptation associés aux modifications de la structure de la C-14 déméthylase ou à la surexpression du gène codant (Ziogas and Malandrakis 2015). Une combinaison de ces mécanismes de résistance pourrait contribuer à la diminution de l'efficacité des DMIs sur le terrain.

La capacité de la cellule à survivre avec des quantités réduites de méthyl-stérois-C14 est relativement rare et a été rapportée seulement pour certaines levures (*Candida albicans*) et champignons levuriformes (*U. maydis*) (Pierce et al. 1978; Walsh and Sisler 1982). La résistance aux DMIs grâce à des pompes à efflux est plus fréquente et a été rapportée pour plusieurs agents pathogènes importants comme *B. cinerea*, *Mycosphaerella graminicola*, *Monilinia fructicola* ou *Sclerotinia homeocarpa* (Hulvey et al. 2012; Kretschmer et al. 2009; Leroux and Walker 2011; Luo and Schnabel 2008; Vijaya Palani and Lalithakumari 1999). La présence de mutations sur le gène *cyp51* est également possible chez plusieurs agents pathogènes, mais semble généralement liée spécifiquement à un ou à quelques fongicides du groupe, sans que les patrons de résistance croisée ne soient clairs. Ainsi, les différents mutants pour le *cyp51* sont souvent dépendants du fongicide utilisé dans la culture (Ziogas and Malandrakis 2015). La mutation la plus fréquente semble être une substitution de la tyrosine pour une phénylalanine à la position 136 (Y136F) du gène *cyp51* et cette dernière semble être associée, entre autres, à une résistance au propiconazole (Leroux and Walker 2011; Ma and Michailides 2005). Enfin, la surexpression du gène *cyp51* est également un important mécanisme de résistance aux DMIs. La surexpression du *cyp51* induit une surproduction de la protéine cible et une réduction de l'effet du fongicide sur la voie métabolique. La surexpression de l'ARNm est généralement associée à des insertions d'éléments transposables de longueur variable dans la région du promoteur en amont du gène *cyp51* (Ziogas and Malandrakis 2015). La longueur de cet élément transposable varie de par exemple 2 à 5 kb chez *Blumeria jaapii*, 1.3kb chez *B. cinerea* et 553 Pb chez *V. inaequalis* (Kretschmer et al. 2009; Ma et al. 2006b; Schnabel and Jones 2001).

Inhibiteurs de la kéto réductase (groupe FRAC 17)

Le second groupe d'importance au sein des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (SBIs), les inhibiteurs de la kéto réductase (KRIs), inhibent la déméthylation du stérole C-4, l'une des étapes du cycle de l'ergostérol, soit la 3-ketoreductase, codées par le gène *erg27*. À ce jour, les deux seules matières actives sont la fenhexamide dérivée de l'hydroxyanilide et la fenpyrazamine dérivée de l'aminopyrazolone. Ces deux fongicides ont des spectres d'action très restreints et sont particulièrement efficaces contre les *Botrytis* spp, *Monilinia* spp. et les *Sclerotinia* spp., mais ne sont généralement pas efficaces contre les agents pathogènes responsables des blancs ou des rouilles, ni des maladies causées par *Alternaria* spp. ou *Fusarium* spp. La déméthylation du stérol C-4 chez ces champignons fait intervenir trois enzymes: la C-4 méthyl-oxydase transforme d'abord le groupe 4 α -méthyle en alcool, puis en aldéhyde et enfin en acide carboxylique. Ensuite, une stérol déshydrogénase C-3 élimine l'hydrogène de 3 α , ce qui conduit à la décarboxylation de l'acide 3-cétocarboxylique stérol intermédiaire. Enfin, la 3-ketoreductase convertit le groupe 3-céto en un groupe 3 β -hydroxyle. Deux cycles consécutifs de déméthylation du C-4 sont nécessaires pour éliminer les deux groupes méthyle du C-4 (Bard et al. 1996; Debieu and Leroux 2015; Gachotte et al. 1998; Gachotte et al. 1999).

Les KRIs inhibent seulement l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne et n'affectent pas la germination des spores (Debieu and Leroux 2015). Le contenu du cytoplasme des cellules traitées avec le fenhexamid est caractérisé par une réduction de son contenu en ergostérol et une accumulation de stérones, un composé toxique pour la cellule (Debieu and Leroux 2015). Cette accumulation de stérones est la conséquence de l'inhibition de la 3-ketoreductase et le mécanisme de résistance serait donc lié à cette enzyme. Un des plus importants mécanismes de résistance aux KRIs, nommé HydR3 (Leroux et al. 2002), est la présence de mutations sur le gène *erg27*, aux positions F26S, T63I, V192L, L195F, I 199 L, N196T, I232M, P250S, V309M, A314V, S336C/A, N369D, L400F/S, Y408S, F427V et A461S, mais la substitution d'une phénylalanine pour une sérine à la position 412 (F412S) semble être la plus abondante (Billard et al. 2012a; Billard et al. 2012b; Esterio et al. 2011; Fillinger et al. 2008; Grabke et al. 2012). Cette mutation confère généralement un facteur de résistance élevé (Figure 7). Il est à noter que ce mécanisme de résistance peut être accompagné d'un coût d'adaptation élevé qui pourrait limiter la stabilité de la résistance au sein des populations (Billard et al. 2012a).

Il a également été démontré que certaines souches de *B. cinerea* étaient intrinsèquement partiellement résistantes au fenhexamide. Ces souches, initialement identifiées HydR1, étaient sensibles au fenhexamide pour l'élongation du tube germinatif, mais très résistantes en ce qui

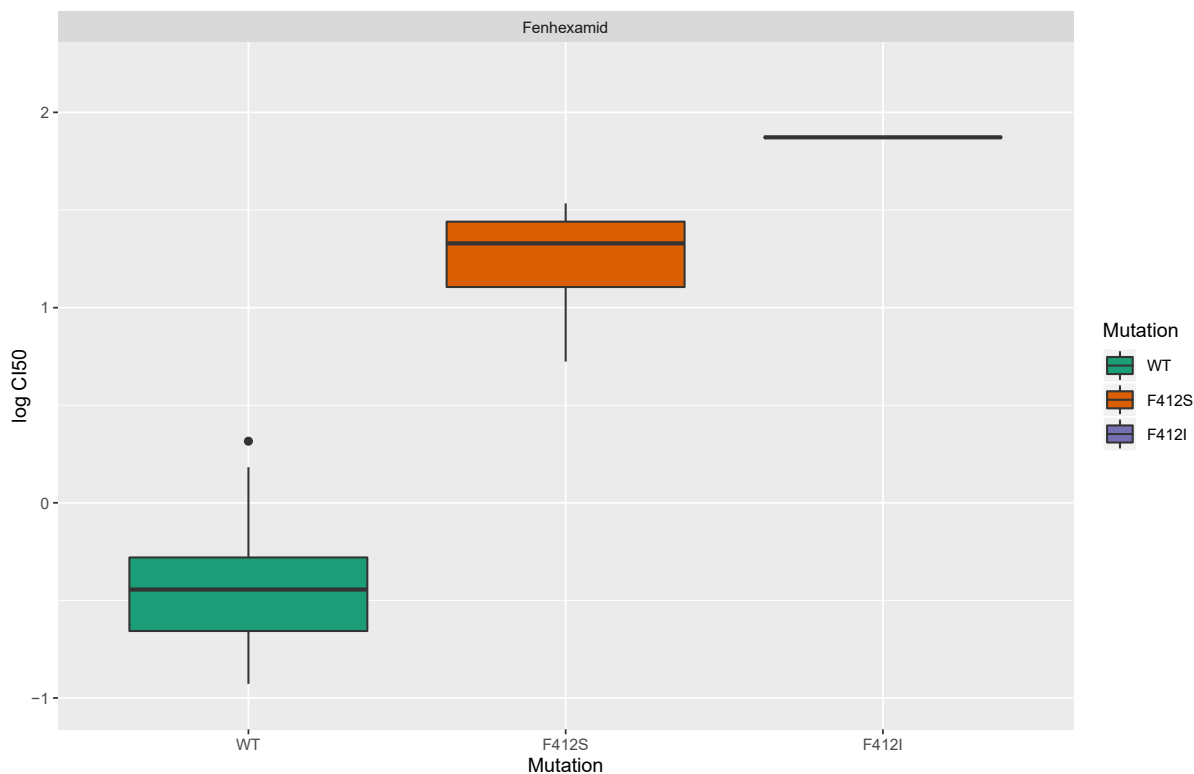


Figure 7. Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de *B. cinerea* résistants ou sensibles au fenhexamide. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

concerne la croissance mycélienne (Leroux et al. 1999; Leroux et al. 2002). Ces souches Hydr1 ont depuis servi à identifier la nouvelle espèce *Botrytis pseudocinerea* (Walker et al. 2011). La séquence protéique Erg27 de *B. pseudocinerea* diffère de celle de *B. cinerea* par 12 résidus d'acides aminés, mais ceux-ci ne sont pas situés aux mêmes endroits que pour les souches Hydr3 et ne seraient donc pas responsables du phénotype de résistance chez *B. pseudocinerea* (Albertini and Leroux 2004). La surexpression du gène *erg27* ou les mécanismes de réduction de l'affinité du fongicide pour la 3-kétoréductase ne semblent pas non plus être associés au phénotype résistant (Debieu and Leroux 2015). La résistance de *B. pseudocinerea* au fenhexamide pourrait donc être conférée par un mécanisme qui n'est pas lié à la cible, possiblement un mécanisme de détoxification lié à un cytochrome P450 codé par le gène *cyp684* (Leroux et al. 2002).

Phenylamides (Groupe FRAC 4)

Les phenylamides (PA) sont une classe de fongicides utilisés spécifiquement pour le contrôle des oomycètes. Le premier produit de cette classe, le métalaxyl, a été commercialisé en 1977. À l'heure actuelle, le métalaxyl et le méfénoxam (Métalaxyl-M) sont les principales matières actives contenues dans les produits commerciaux vendus au Canada. Ils possèdent des propriétés préventives et

curatives et sont utilisés comme traitements foliaires, de sol et de semences. Les phénylamides sont des inhibiteurs de la biosynthèse des ARN ribosomiaux. Plus précisément, ce sont des inhibiteurs de l'ARN polymérase I. Ils affectent ainsi la synthèse des acides nucléiques chez les oomycètes, ce qui a un impact sur plusieurs stades du cycle de vie de l'agent pathogène tels que la croissance des hyphes et la formation des sporanges. Ils n'affectent toutefois pas le relâchement des zoospores ni leur mobilité et ils n'affectent pas la germination des cytopores. Des souches de *Pseudoperonospora cubensis* et de *Phytophthora infestans* résistantes au métalaxyl ont été détectées aussi tôt que deux à trois ans après son introduction en Europe et en Israël (Hermann et al. 2015). De la résistance croisée a été observée parmi tous les phénylamides. Le mécanisme de résistance n'est pas encore tout à fait compris, il semble que la résistance soit due à un seul gène pour lequel la dominance est incomplète, mais plusieurs mutations ou mécanismes pourraient être impliqués dans son développement. (Hermann et al. 2015).

Anilinopyrimidines (groupe FRAC 9)

Les anilinopyrimidines (AP) ont été introduites entre 1992 et 1995 et comprennent le pyriméthanol, le cyprodinil et le mepanipyrim. Ces matières actives sont principalement homologuées pour le contrôle des ascomycètes comme *B. cinerea* et *V. inaequalis*. Les fongicides de ce groupe ciblent la biosynthèse de la méthionine. Le mode d'action a été déduit en laboratoire alors que des essais réalisés sur *B. cinerea* démontraient que la croissance du champignon était inhibée en présence du fongicide, mais pouvait recouvrer sa capacité à croître lorsqu'on y ajoutait une source externe de méthionine (Masner et al. 1994). Cela dit, le ou les modes d'action ne sont pas encore clairs. Une étude récente suggère que la cible des APs pourraient être la mitochondrie (Mosbach et al. 2017). Le gène *Bcpos5* codant pour une NADH-kinase chez *B. cinerea*, pourrait notamment être un bon candidat comme cible primaire des APs (Mosbach et al. 2017). Les modes d'action n'ayant pas été élucidés, les mécanismes de résistance sont aussi moins bien compris que pour certains autres groupes. Cependant, plusieurs études ont permis de démontrer qu'un mécanisme de résistance important pourrait être associé aux pompes à efflux MDR (Kretschmer et al. 2009; Leroy et al. 2011). Les mécanismes à MDR seront abordés un peu plus loin dans cette section.

Phénylpyrrole (groupe FRAC 12)

Les phénylpyrroles sont dérivés de la pyrrolnitrin, un métabolite secondaire produit par certaines bactéries, principalement du genre *Pseudomonas*. Les premiers analogues de la pyrrolnitrin, le fenpiclonil et le fludioxonil, ont été mis en marché en 1988 et 1990, respectivement. Le fenpiclonil,

homologué uniquement en traitement de semences, a été rapidement remplacé par le fludioxonil pour des usages tant en applications foliaires qu'en traitement de semences (Kilani and Fillinger 2016). Ce dernier est sans doute le seul représentant du groupe homologué pour le moment. Les phénylpyrroles ne sont pas systémiques et inhibent tous les stades de développement (germination des spores, élongation du tube germinatif et croissance mycélienne) de la plupart des ascomycètes et basidiomycètes (Kilani and Fillinger 2016). Le mode d'action précis des phénylpyrroles est encore incertain, mais plusieurs ont observé, suite à une exposition aux phénylpyrroles, une accumulation de glycérol intracellulaire médiée par l'activation d'une protéine kinase (MAPK Os2/Hog1), homologue à HOG1 chez *N. crassa* (Kilani and Fillinger 2016). Le mode d'action proposé suggère qu'en se liant au récepteur (une histidine kinase hybride ou HHK), le fongicide imite un stress osmotique qui active la transduction du signal via la MAPK Os-2/Hog1. Cette activation entraîne probablement de multiples réactions en aval, telle que la biosynthèse du glycérol, ce qui entraîne une augmentation de la turgescence intracellulaire et du potentiel membranaire (Lew 2010).

Bien que des mutants résistants soient facilement générés en laboratoire, très peu de cas de résistance liés à la cible ont été rapportés jusqu'à maintenant. Des souches ayant une résistance croisée aux dicarboximides et aux phénylpyrroles ont été rapportées pour *Alternaria* spp. (Avenot et al. 2005; Iacomini-Vasilescu et al. 2004), mais cette résistance semble peu fréquente au champ (Avenot and Michailides 2015; Malandrakis et al. 2015). Comme pour le groupe FRAC 9, un mécanisme de résistance important pourrait être associé aux pompes à efflux MDR (Kretschmer et al. 2009; Leroy et al. 2011).

Résistance MDR ou multidrug-resistant

Les résistances à MDR sont occasionnées par la surexpression de pompes à efflux, aussi appelés transporteurs ABC ou MFS. Ces transporteurs sont des protéines membranaires qui servent naturellement à exporter les substances toxiques, produites par la cellule ou non, à l'extérieur de celle-ci pour éviter qu'elles ne s'accumulent et deviennent toxiques. Les principaux transporteurs rencontrés chez les champignons sont les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et les transporteurs MFS (Major Facilitator superfamily) (Kretschmer et al. 2009). Ces transporteurs comprennent généralement deux parties, chacune comprenant six domaines transmembranaires et un site de liaison. Le site de liaison est situé dans le cytoplasme et sert à hydrolyser l'ATP pendant le transport. Une importante caractéristique de ces transporteurs est leur faible spécificité, les rendant aptes à transporter n'importe quel type de molécule hors de la cellule. Ces transporteurs sont généralement exprimés faiblement en temps normal, mais en présence d'un composé toxique,

l'expression de celui-ci est induite et augmente en quelques minutes, permettant de purifier la cellule rapidement (Schoonbeek et al. 2001). Chez *B. cinerea*, le transporteur *BcatrB* a été associé au transport de différents botryticides. Lorsque mutés, les isolats de *B. cinerea* étaient légèrement plus sensibles aux fongicides fenpiclonil et fludioxonil, suggérant que *BcatrB* et ce type de transporteurs pouvaient jouer un rôle dans la sensibilité de base de certains champignons pathogènes (Schoonbeek et al. 2001).

Dans les années 1990, l'étude des populations de *B. cinerea* dans les vignobles français révélait qu'en plus de la résistance liée au site d'action, d'autres phénotypes de résistance pouvaient être observés. Alors que certaines souches étaient très résistantes à certains fongicides spécifiques, d'autres présentaient des niveaux de résistance modérés à élevés à plusieurs matières actives (Chapeland et al. 1999). Le phénotype MDR1 était partiellement résistant à la fois au cyprodinil, au pyriméthanil et au fludioxonil alors que le phénotype MDR2 était partiellement résistant au cyprodinil, au pyriméthanil, à l'iprodione et au fenhexamide (Chapeland et al. 1999). Plus tard, un troisième phénotype MDR (MDR3) a également été décrit et présentait une résistance croisée aux fongicides des MDR1 et MDR2 combinés. L'implication d'un transporteur a été confirmée grâce à l'utilisation de fongicides marqués, qui s'accumulaient à l'intérieur de la cellule seulement chez les souches sensibles (Kretschmer et al. 2009). D'autres études ont démontré que le phénotype MDR1 était conféré par une mutation non pas de la cible, mais bien d'un facteur de transcription. Cette mutation, située dans la région *mrr1*, conduisait à l'activation permanente et à la surexpression du transporteur (Kretschmer et al. 2009).

Un phénotype MDR plus préoccupant a été décrit par Kretschmer et al. (2009), le MDR1h. Chez les souches ayant un phénotype MDR1h, la surexpression des transporteurs *atrB* était encore plus importante que chez les phénotypes MDR1 et une nouvelle mutation, une délétion de 3Pb, conduit à la perte d'un acide aminé sur le facteur de transcription MRR1 (Kretschmer et al. 2009). Comme c'était le cas de *B. pseudocinerea*, les souches de *B. cinerea* ayant un phénotype MDR1h se sont avérées être différentes de *B. cinerea* à divers endroits sur le génome, ce qui a conduit les auteurs à former un sous-groupe nommé *B. cinerea* group S (Leroch et al. 2013). Le phénotype MDR1h confère un facteur de résistance de 13 à 18X pour le Cyprodinil et de 15 à 20X pour le fludioxonil (Kretschmer et al. 2009; Leroux et al. 2010) (Figure 8).

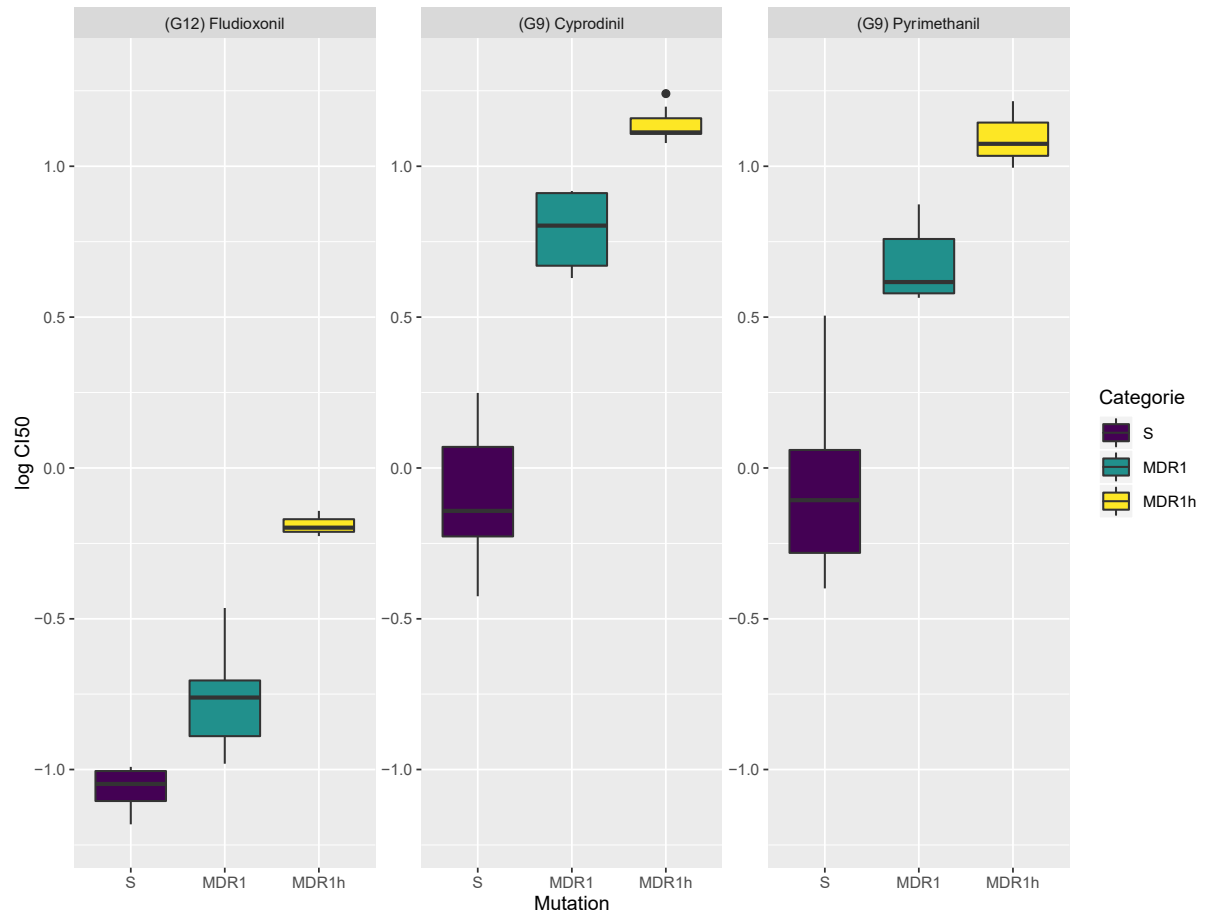


Figure 8. Exemples de CI_{50} pour trois génotypes de *B. cinerea* résistants (MDR1 et MDR1h) ou sensible (S) au fludioxonil, cyprodinil et pyriméthanol. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

Méthodes de détection

Le développement de méthodes et l'évaluation de la sensibilité des agents pathogènes aux fongicides est nécessaire d'abord pour évaluer le potentiel de nouvelles matières actives, puis pour suivre les changements de sensibilité au sein des populations. La gestion de la résistance passe donc par le suivi des populations dès l'homologation des fongicides. Différentes méthodes de détection de la résistance sont disponibles et envisageables, mais chacune comporte son lot d'avantages et d'inconvénients. La section suivante vise à décrire ces approches, leurs avantages et inconvénients. Nous souhaitons également rapporter un certain nombre d'autres facteurs à considérer lors de la planification d'essais visant la réalisation de tests de résistance aux fongicides.

Méthodes *in vitro*

Courbe dose-réponse et dose discriminante

Les méthodes *in vitro*, ou de phénotypage, sont les plus simples en principe. Elles consistent toutes à faire croître l'agent pathogène en présence de fongicide. La plus complète des approches de phénotypage consiste à utiliser plusieurs doses du fongicide à l'étude pour obtenir une courbe de type dose-réponse et permettre de déterminer précisément la concentration du fongicide nécessaire pour réduire la croissance de moitié par rapport à un témoin sans fongicide. L'utilisation d'une dose discriminante est moins laborieuse puisqu'il s'agit d'utiliser une ou deux doses seulement pour permettre, en théorie, de discriminer les souches sensibles des souches résistantes.

Courbe dose-réponse

Les résultats obtenus grâce à l'utilisation de courbes doses-réponses sont plus versatiles et permettent généralement de répondre à plusieurs questions. Par exemple, avant de pouvoir faire le suivi des populations résistantes, il est impératif de connaître les niveaux de sensibilité de base des populations d'agents pathogènes. Pour connaître cette sensibilité de base, il est nécessaire de déterminer la CI_{50} et la CMI des isolats recueillis (Figure 9), et ce grâce à l'utilisation d'une approche dose réponse. Habituellement, la sensibilité des populations naturelles doit être évaluée en fonction de l'origine géographique de ces populations ou isolats (Brent and Hollomon 2007a). Plus généralement, l'utilisation de courbes doses-réponses peut servir à comparer l'efficacité de différents fongicides pour une même souche, de comparer l'efficacité d'un seul fongicide sur plusieurs souches ou encore de déterminer si une matière active devient inactive à partir d'une certaine concentration (en se dissociant ou en formant des molécules composites) (Pasche and Gudmestad 2019).

Le choix des doses et de l'intervalle entre ces doses est important pour obtenir une réponse précise. Il n'est pas obligatoire que l'intervalle entre les doses du fongicide utilisé soit égal et celui-ci peut être plus rapproché aux extrémités du spectre utilisé (Iacomi-Vasilescu et al. 2004; Wang et al. 2016), mais l'utilisation d'un intervalle régulier facilite généralement l'analyse statistique subséquente (Myresiotis et al. 2008). Un intervalle logarithmique permet également de faciliter les analyses statistiques, surtout lors de l'utilisation d'un modèle probit (Gudmestad et al. 2013; Pasche et al. 2004; Pasche et al. 2005). Le choix de l'intervalle de doses implique également de sélectionner des concentrations qui n'ont aucun effet sur l'agent pathogène à l'étude jusqu'à des doses qui inhibent la croissance à 100% (Figure 9). Il est également important d'inclure plus de trois doses (idéalement plus de six), incluant une dose de 0 ppm (Pasche and Gudmestad 2019). Par la suite, il est également important de sélectionner le bon modèle permettant de calculer les valeurs de CI_{50} et autres. Le modèle à utiliser peut grandement influencer (surestimer ou sous-estimer) la valeur de CI_{50} estimée et le choix du modèle peut-être différent en fonction de l'agent pathogène et du fongicide à l'étude (Noel et al. 2017; Ritz et al. 2016).

L'utilisation de courbes doses-réponses est souvent la première étape de tout projet portant sur la résistance aux fongicides. Elle permet d'obtenir des valeurs précises de CI_{50} et c'est son principal avantage (Pasche and Gudmestad 2019). Toutefois, cette approche est coûteuse et nécessite beaucoup de temps, de matériel et d'espace (Köller et al. 1997). De plus, la sélection des différents paramètres à utiliser nécessite la réalisation d'essais préliminaires en amont de la planification et de la réalisation des tests de résistance.

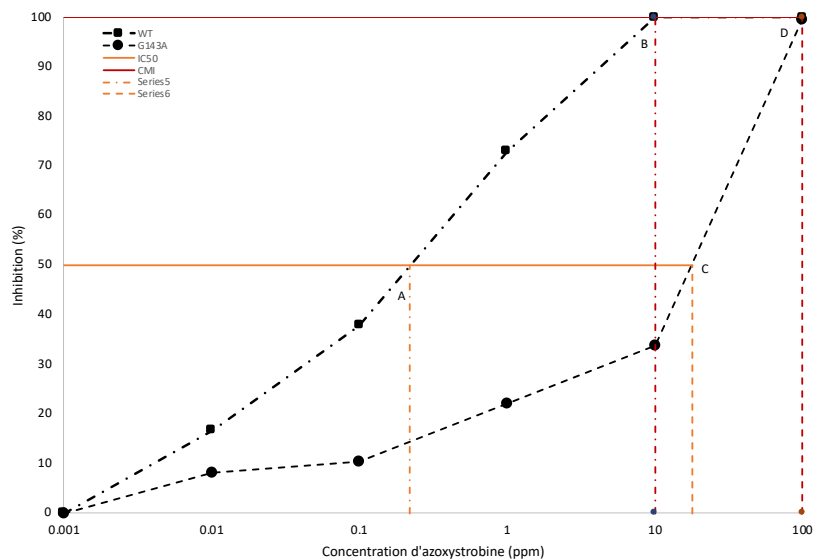
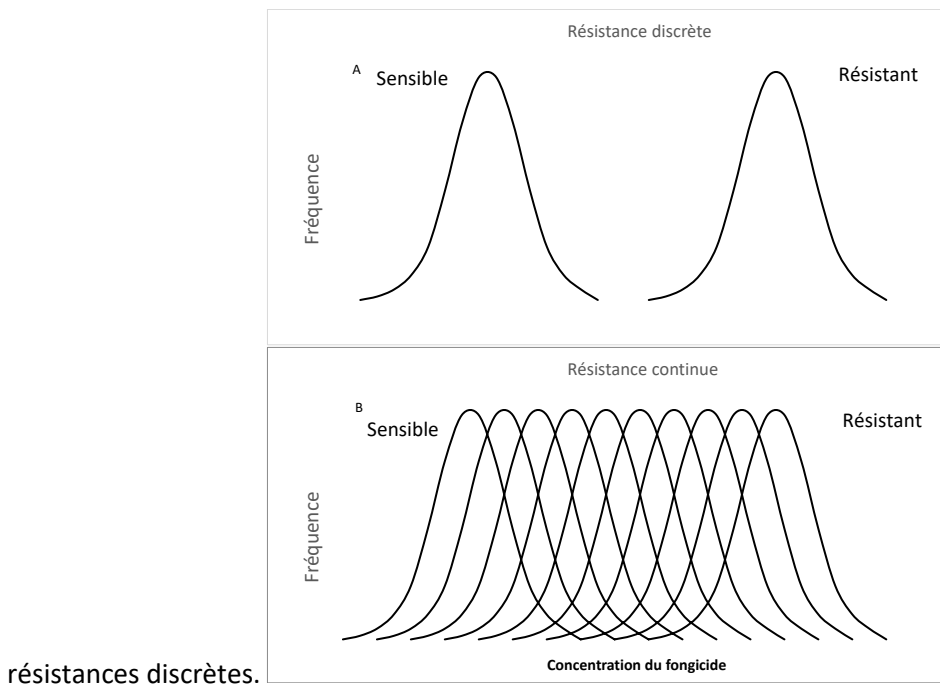


Figure 9. Exemple de courbe dose-réponse obtenue pour l'azoxystrobine pour deux souches de *B. cinerea*, une sensible (wt) et une résistante (G143A). Les points A et B représentent la CI_{50} et CMI pour la souche sensible et les points C et D représentent la CI_{50} et CMI pour la souche résistante. Résultats fournis par Phytodata, issus du projet 19-2.2-06-PHYTO.

Dose discriminante

L'utilisation de doses discriminantes est généralement possible seulement lorsque la sensibilité de base a été déterminée et lorsque la résistance a été définie et confirmée (Köller et al. 1997). Il est également nécessaire de savoir s'il est question de résistance discrète ou continue. Une résistance discrète est caractérisée par une distribution bimodale, lorsque la différence de CI_{50} est grande entre les isolats sensibles et résistants (Figure 10A) (Brent and Hollomon 2007a). C'est le cas par exemple lorsqu'une mutation dominante confère une résistance élevée, comme pour la mutation G143A conférant à *B. cinerea* (et à d'autres) le phénotype résistant. La dose discriminante pour les strobilurines se situe généralement autour de 1ppm, mais celle-ci doit être ajustée en fonction de l'agent pathogène et du fongicide. Au contraire, lorsque les niveaux de résistance sont plutôt graduels, la résistance est qualifiée de continue (Figure 10B) (Brent and Hollomon 2007a). C'est le cas par exemple lorsqu'une ou plusieurs mutations confèrent des niveaux de résistances différents, comme pour la résistance aux SDHIs, qui est conférée par plusieurs mutations qui n'ont pas le même facteur de résistance. Dans cette situation, le choix de la dose discriminante est plus ardu et il faut parfois avoir recours à plusieurs doses pour discriminer les résistances faibles, modérées et élevées (Gudmestad et al. 2013). Contrairement aux courbes doses-réponses, l'approche des doses discriminantes est beaucoup moins coûteuse et peut habituellement être faite sur un plus grand nombre d'échantillons. Cependant elle ne permet pas de déterminer avec précision la CI_{50} et elle est plus appropriée pour les



résistances discrètes.

Figure 10. Schématisation des patrons bimodal et unimodal caractéristiques des résistances discrètes et continues. Figure tirée de (Brent and Hollomon 2007b).

Une fois que l'approche à utiliser pour réaliser les tests de résistance est choisie, il est essentiel de choisir le milieu de culture qui sera utilisé pour l'exécution des essais. Ces essais peuvent être conduits en milieux solides ou liquides et on compte généralement trois types de bioessais : la germination des spores, l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne. Pour choisir entre ces trois types de bioessais, il est important de bien connaître le mode d'action des fongicides à l'étude. Par exemple, comme on sait que les strobilurines inhibent fortement la germination des spores, c'est un test de germination qui devrait être préconisé (Gudmestad et al. 2013; Leroux et al. 2010). C'est également le cas pour les SDHIs (Gudmestad et al. 2013; Pasche et al. 2004; Pasche et al. 2005), les dicarboximides, les phénilpyrroles et les DMI (Avenot et al. 2005; Iacomini-Vasilescu et al. 2004; Leroux et al. 2010). L'utilisation d'un bioessai inadéquat peut conduire à la surestimation ou à la sous-estimation des valeurs de CI_{50} .

Les milieux solides à base d'agar ont largement été utilisés pour ces trois types de bioessais (Esterio et al. 2011; Gudmestad et al. 2013; Latorre et al. 2002; Latorre and Torres 2012b; Leroux et al. 2011; Leroux et al. 2002; Leroux et al. 2010; Moyano et al. 2004; Walker et al. 2013). Cependant, la composition du milieu est très importante pour certains fongicides. La présence de méthionine dans un milieu de culture destiné au test de résistance aux APs contribue à surestimer le phénotype de résistance, puisque le champignon peut utiliser la méthionine pour contourner l'effet du fongicide (Pasche and Gudmestad 2019). Certains champignons, comme *B. cinerea*, peuvent également utiliser une voie métabolique alternative lorsqu'ils sont en contact avec un inhibiteur de la respiration comme les strobilurines. Dans ce cas, l'ajout d'acide salicylhydroxanique (SHAM) peut être nécessaire pour éviter qu'il y ait contournement de cette voie métabolique alternative (Liang et al. 2019; Pasche et al. 2004). Les milieux solides ont l'avantage de permettre l'observation directe de la croissance du champignon et sont relativement faciles à préparer. Cependant, lorsque des essais de type courbe dose-réponse sont envisagés, l'utilisation de milieux solides peut s'avérer très exigeant puisque la quantité de pétris à produire (Figure 11), l'espace qu'ils occupent, la durée du temps d'incubation et le temps d'observation peuvent devenir très élevés.

L'utilisation de milieux liquides dans des plaques microtitres permet entre autres de contourner les limitations imposées par les milieux solides et permet de mettre sur pied des plateformes de phénotypage plus performantes. Dans cette méthode, une suspension de spores est inoculée dans un milieu de culture liquide. La lecture de la turbidité (changement de densité optique lors de la croissance du champignon à l'étude) ou d'un changement de couleur (changement de couleur du bleu au rose par l'oxydation de la resazurine) à l'aide d'un lecteur de plaque, rend cette approche plus pratique. Les

mêmes considérations par rapport à la composition du milieu sont à prévoir. Par exemple, pour éviter la surestimation des CI_{50} causée par l'oxydation du glucose, le milieu liquide YBA (yeast bacto-peptone sodium acétate) est utilisé notamment pour les essais visant *B. cinerea* (Stammli and Speakman 2006).

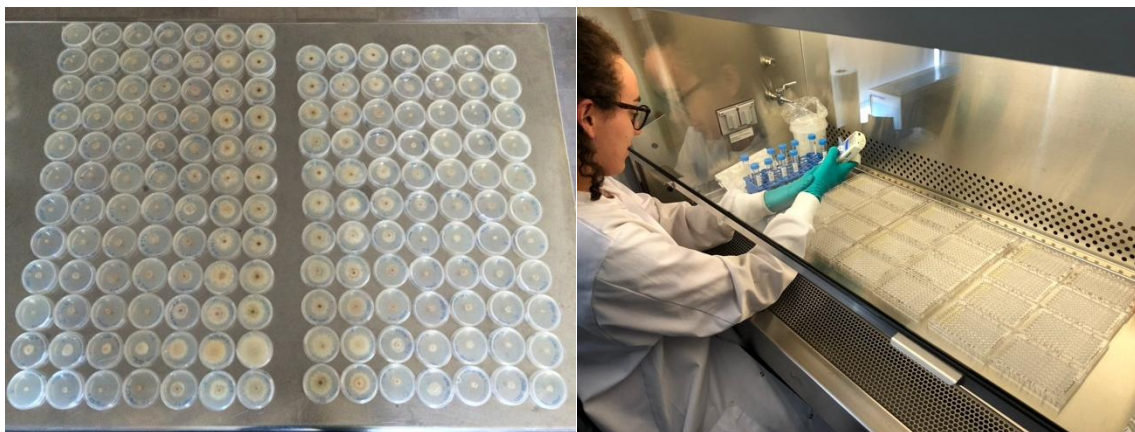


Figure 11. Exemples d'essais en milieux solides et liquides.

Formule commerciale et matière active

Lors des tests de phénotypage, il existe un certain débat quant au choix de la formulation du fongicide à utiliser. Certains utilisent la formule commerciale (Carisse and Tremblay 2007; Tremblay et al. 2003) mais la majorité préconise l'utilisation de la matière active (MA) pure (Alberoni et al. 2005; Gudmestad et al. 2013; Iacomini-Vasilescu et al. 2004; Kretschmer et al. 2009; Latorre et al. 2002; Latorre and Torres 2012a; Leroux et al. 2013; Leroux et al. 1999; Leroux and Clerjeau 1985). L'utilisation des formules commerciales a l'avantage d'être qu'elles sont plus solubles et pourraient se rapprocher davantage des conditions de production, mais elles contiennent également des ingrédients inertes qui peuvent eux-mêmes être cytotoxiques ou qui peuvent augmenter les performances du fongicide à l'étude. Au contraire, les MA pures sont souvent moins solubles et les solvants utilisés pour les solubiliser peuvent être cytotoxiques à haute concentration (Gudmestad et al. 2013). De plus, les résultats nécessitent plus d'interprétation pour lier l'information aux pratiques des producteurs. Cependant, il est important d'utiliser les MA lorsqu'il s'agit de comparer entre eux les fongicides appartenant au même groupe, sans le biais induit par les agents de remplissage qui pourraient être différents d'une formulation à l'autre. Il existe quelques études qui visent à comparer l'utilisation des formulations commerciales et des MA. Par exemple, les tests de résistances réalisés avec les fongicides donnaient des niveaux de résistance de *P. xanthii* aux strobilurines plus élevés qu'avec les matières actives. De plus, la relation entre la mutation G143A et le phénotype de résistance était également

plus claire avec la MA (Ishii et al. 2001). Ainsi, l'utilisation de la MA est généralement recommandée (Pasche and Gudmestad 2019).

Parasites obligatoires

Il existe très peu de données sur la résistance aux fongicides des parasites obligatoires, ceci est principalement dû à la difficulté de les réaliser en phénotypage puisque les parasites obligatoires ne survivent pas longtemps après l'échantillonnage, soit environ 24 heures. L'approche la plus fiable pour tester la résistance des parasites obligatoires est l'inoculation de plants (*in vivo*) ou de disques foliaires (*in vitro*) préalablement traités avec un fongicide (De Miccolis Angelini et al. 2015). La sensibilité est déterminée en fonction de la valeur de CI_{50} obtenue, soit la concentration de fongicide permettant d'inhiber 50% de l'infection, dans le cas présent, la surface symptomatique de la feuille comparativement au contrôle négatif (Massi et al. 2021). Des plants sains doivent être maintenus en continu pour la réalisation des tests de phénotypage et le taux de succès des tests de phénotypage des parasites obligatoires est généralement très bas.

Méthodes moléculaires

Dans les sections précédentes, les mécanismes de résistance ont été abordés pour un certain nombre de groupes de fongicides et il est clair, pour la majorité d'entre eux, qu'il est possible de faire des liens entre le phénotype et le génotype. Ainsi, les techniques moléculaires peuvent être utilisées lorsque les mécanismes de résistance ont été élucidés, comme c'est le cas pour les groupes FRAC 1, 2, 4, 7, 11, 40 et dans une moindre mesure les phénotypes MDR. Les deux approches (génotypage et phénotypage) ont chacune leurs avantages et inconvénients (Tableau 5) et devraient toujours être perçues comme étant des approches complémentaires. Plusieurs méthodes de détection basées sur les technologies de l'ADN ont été développées et sont accessibles à travers le corpus de littérature scientifique. Les principales méthodes sont les PCR-RFLP (ou CAPS), PCR classique, LAMP-PCR, PCR en temps réel (avec agent intercalant, sonde fluorescente) et les méthodes de séquençage (Sanger, Pyroséquençage, séquençage à haut débit). La section qui suit présente les principales méthodes de détection moléculaires.

Tableau 5. Comparaison des méthodes de phénotypage et de génotypage (tiré de Sierotzki et al. 2019).

	Méthode moléculaire	Phénotypage
Spécificité	Élevée (risque de faux positifs)	Faible
Coûts	Élevés	Modérés
Accessibilité des technologies	Développement coûteux	Accessible
Équipement	Coûteux	Accessible
Connaissance des modes d'action	Nécessaires	Accessoire
Connaissance de l'agent pathogène	Accessoire	Nécessaire
Capacité de traitement	Élevée	Faible modérée
Possibilité de combiner des échantillons	Oui	Non
Temps de réponse	Plus rapide	Long
Différentiation des patrons de sensibilité	Possible	Main-d'œuvre élevée
Possibilité de réaliser des études à l'échelle des populations	Possible	Main-d'œuvre élevée

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les enzymes de restriction reconnaissent de courtes séquences d'ADN doubles brins et coupent cet ADN selon un site de restriction spécifique. Cette technique est largement utilisée, car elle permet de détecter avec précision une mutation qui créerait ou supprimerait un site de restriction. Ainsi, après une étape de PCR permettant d'amplifier une région génique spécifique contenant la mutation, suivie d'une digestion enzymatique avec l'enzyme appropriée, le résultat peut être visualisé sur gel d'agarose (Figure 12). Cette méthode est hautement spécifique, permet d'identifier uniquement une mutation à la fois et nécessite plusieurs réactions lorsque le phénotype résistant est conféré par plusieurs mutations. Cette technique est fréquemment utilisée pour détecter la mutation G143A responsable de la résistance aux strobilurines, la mutation I365S associée à la résistance aux dicarboximides, la mutation E198A associée à la résistance aux benzimidazole et la mutation *PvCesA3* associée à la résistance au mandipropamid (De Artur Teixeira et al. 2015; Fournier et al. 2003; Malandrakis et al. 2011; Obuya and Franc 2016; Oshima et al. 2006; Rosenzweig et al. 2015; Saito et al. 2009; Ziogas et al. 2009). Cette approche est peu coûteuse et permet de traiter un grand nombre d'échantillons, surtout lorsqu'on s'intéresse à une seule ou quelques mutations. Cependant, lorsqu'il s'agit de plusieurs mutations associées au même phénotype ou pour étudier le statut de la résistance à plusieurs fongicides, cette méthode peut devenir laborieuse et nécessiter beaucoup de manipulations.

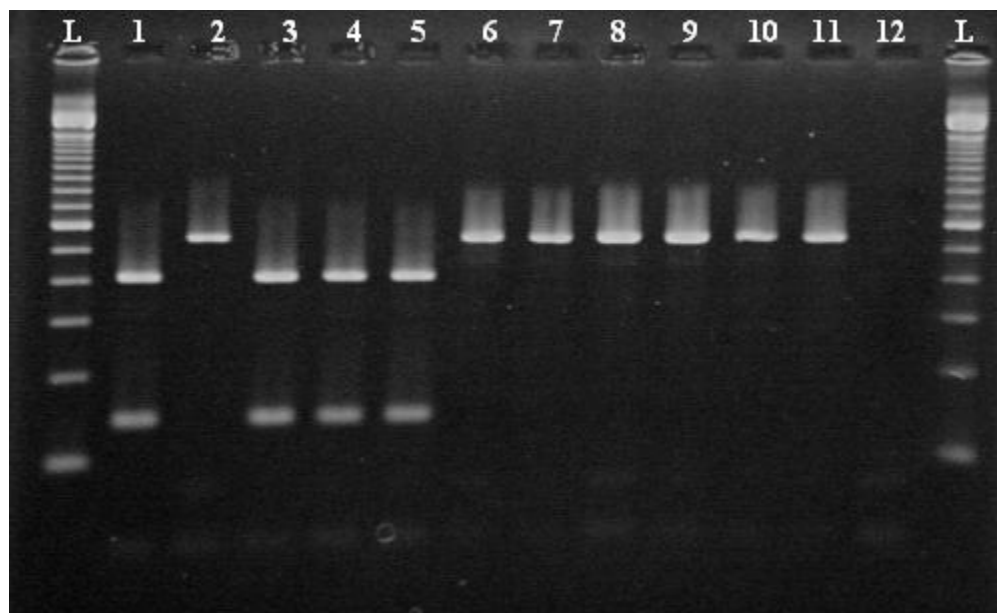


Figure 12. Exemple de résultats obtenus à l'aide d'une méthode de PCR-RFLP utilisée pour détecter une mutation responsable de la résistance de *B. squamosa* aux dicarboximides. Les échantillons contenus dans les puits 2 et 6 à 11 n'ont pas été digérés, ce qui indique la présence de la mutation I365S (tiré de Van der Heyden et al. 2013).

PIRA-PCR (Primer-Introduced Restriction Analysis Polymerase Chain Reaction)

Dans certains cas, les enzymes de restriction qu'il faudrait utiliser pour un test PCR-RFLP peuvent s'avérer très dispendieuses. Pour contourner cette limitation et permettre l'utilisation d'une enzyme plus courante, il est possible d'introduire une mutation artificielle (située en 3' d'une des amorces de PCR), près de la mutation à détecter. Une fois cette mutation introduite, la méthode devient identique au PCR-RFLP. Cette méthode a notamment été utilisée pour concevoir des tests de détection permettant la détection de cinq mutations (une réaction par mutation) associées à la résistance aux SDHs (Veloukas et al. 2011).

PCR et qPCR allèle-spécifique et sondes spécifiques

Cette approche consiste à utiliser des systèmes PCR et qPCR qui présentent une très haute spécificité pour la mutation d'intérêt. Dans cette approche, une des deux amorces de PCR ou la sonde de qPCR, contiens la mutation et amplifie uniquement un des deux allèles, soit l'allèle muté ou l'allèle sauvage. Dans le cas de la PCR allèle spécifique, un gel d'électrophorèse ne révèle que le génotype voulu. Par exemple, pour les tests de ce type développés pour la détection de souches résistantes de *B. cinerea* aux SDHs, une bande sur gel indique une souche mutée, alors que les souches sensibles n'apparaissent pas sur le gel (Yin et al. 2011). Pour le qPCR allèle spécifique, l'amplification révèle également la présence du génotype d'intérêt. C'est notamment le cas pour la détection de la résistance de *B. cinerea* au fenhexamide (Figure 13) (Billard et al. 2012b). Cette approche a également été utilisée

pour la détection de la mutation G143A chez *B. cinerea* et *M. graminicola* (Fraaije et al. 2005; Samuel et al. 2011).

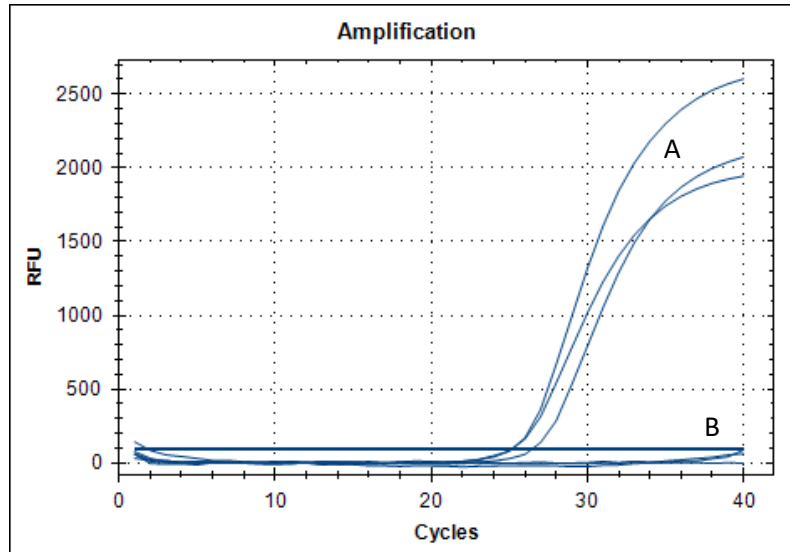


Figure 13. Exemple de résultats d'analyse pour la résistance au fenhexamide. A) Échantillon positif pour le phénotype sensible et B) échantillon résistant au fenhexamide.

LAMP-PCR (Loop-mediated isothermal amplification polymerase chain reaction)

Les approches de LAMP-PCR étaient pressenties jusqu'à tout récemment pour être le moteur d'importants changements en matière de détection au champ. Les approches de PCR conventionnelles reposent sur des étapes de dénaturation et d'élongation nécessitant des changements rapides de températures (entre 35 et 40 cycles de températures entre 50 et 98°C) et des instruments (thermocycleur) relativement complexes et coûteux. Ces méthodes étaient donc confinées au laboratoire jusqu'à tout récemment. Les approches de LAMP-PCR sont dites isothermes et ne nécessitent donc qu'une seule température de réaction, ce qui permet en quelque sorte de ne plus dépendre du thermocycleur (Notomi et al. 2000). Le processus nécessite l'utilisation de deux amorces internes et de deux amorces externes, qui ont au total six séquences qui s'hybrident à l'ADN cible. Selon la température de fusion des amorces (T_m), les réactions sont effectuées entre 60 et 65 °C et amplifient des fragments de 300 paires de bases au maximum.

La LAMP génère des amplicons plus rapidement que le PCR et le temps de réaction est généralement de moins d'une heure. Comme les amorces contiennent six séquences conçues pour s'hybrider à la cible, le LAMP-PCR est plus sensible que les méthodes PCR. Les produits peuvent être analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, par turbidité, ou par fluorescence (Figure 14). L'amplification peut aussi être suivie en temps réel. Cette approche de détection a récemment été utilisée pour détecter la mutation G143A et certaines mutations liées à la résistance aux SDHIs chez *B. cinerea* et *Alternaria* spp. (Fan et al. 2018; Hu et al. 2017). Malgré les nombreuses qualités de cette

approche, il existe peu d'outils de détection efficaces à détecter les génotypes de résistance. Ceci est probablement dû à la complexité liée à la conception des quatre amorces et l'émergence de nouvelles technologies portables plus universelles, notamment la disponibilité de thermocycleurs en temps réels portables permettant l'utilisation de marqueurs conventionnels (Capron et al. 2020).

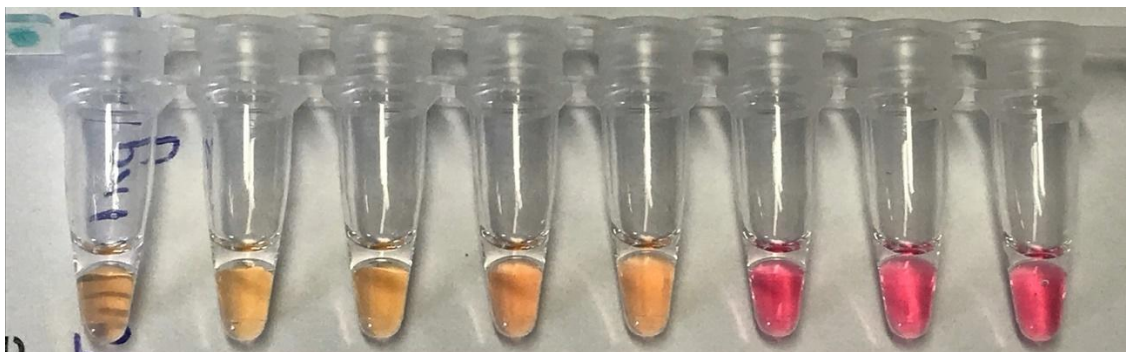


Figure 14. Exemple de résultats de LAMP-PCR. Les puits jaunes sont positifs tandis que les puits roses sont négatifs.

Séquençage

Comme la résistance est causée par des modifications de l'ADN, il devrait être possible dans de nombreux cas de détecter la résistance en utilisant les protocoles de séquençage courants (séquençage Sanger). Bien que cette méthode soit plus longue parce qu'elle implique souvent un laboratoire de service externe, elle est très utile pour l'identification simultanée de toutes les mutations présentes dans une même région génique, comme c'est le cas pour les SDHs. Cette méthode est relativement abordable et ne nécessite que peu de manipulations à part une extraction d'ADN et la réaction de PCR préalable au séquençage et les résultats sont généralement disponibles en quelques jours. Cette méthode est compatible avec tous les mécanismes de résistance et types de résistance.

Les méthodes de séquençage à haut débit peuvent également être utilisées pour amplifier de courtes régions d'intérêt (20 à 50 paires de bases), c'est le cas du pyroséquençage. D'une façon généralisée, le pyroséquençage est une méthode de séquençage en temps réel basé sur la détection d'un pyrophosphate relâché durant la synthèse d'ADN (Chowdhury et Chowdhury, 2012 ; Ronaghi, 2001). La réaction contient un mélange de quatre enzymes qui, à la suite d'une cascade enzymatique, produit de la lumière visible dont l'intensité est proportionnelle au nombre de nucléotides ajoutés dans le brin d'ADN cible. Cette méthode a notamment été utilisée pour détecter les mutations associées à la résistance de *B. cinerea* aux SDHs et de *Cercospora sojinae* aux strobilurines (Gobeil-Richard et al. 2016; Zhou and Mehl 2020).

Les méthodes de séquençage couvrant tout le génome appelé « Whole Genome Sequencing » ou (WGS) sont également prometteuses en ce qui a trait à la détection des mécanismes de résistance, ainsi qu’au suivi des populations. Le génotypage par séquençage (GBS) a pour sa part permis, par exemple, d’associer la structure des populations de *B. cinerea* selon l’utilisation de fongicides (Kozhar et al. 2020). La plateforme de séquençage de troisième génération d’Oxford Nanopores promet également d’importantes percées (Radhakrishnan et al. 2019).

Portrait de la résistance des champignons phytopathogènes au Québec

Les champignons listés dans cette section sont des espèces pour lesquelles des tests de détection de la résistance ont confirmé la présence de populations résistantes à des fongicides homologués encore aujourd’hui ou à des fongicides faisant partie de familles encore utilisées au Québec.

Cette section présente, par espèce, les informations disponibles sur les matières actives et/ou familles de fongicides auxquelles des populations de ces agents pathogènes ont été confirmées comme étant résistantes au Québec et ailleurs dans le monde ainsi que de l’information sur les mécanismes de résistance connus et les méthodes de détection de la résistance aux fongicides par bioessais et par biologie moléculaire.

Le tableau 6 présente les espèces concernées, les maladies qu’elles causent, les cultures, les matières actives contenues dans les fongicides commerciaux utilisés pour les contrôler, leur famille ainsi que les localisations pour lesquelles des populations ont été confirmées comme résistantes.

Tableau 6. Liste des champignons confirmés pour leur résistance aux fongicides au Québec.

Nom	Maladie	Cultures	Matières actives	Familles	Localisation*
<i>Botrytis cinerea</i>	Moisissure grise	Fraise Vigne	Azoxystrobine	11	Capitale-Nationale
			Boscalide	7	Centre-du-Québec
			Cyprodinil	9	Chaudière-Appalaches
			Difénoconazole	3	Estrie
			Fenhexamide	17	Lanaudière
			Fludioxonil	12	Laurentides
			Fluopyram	7	Mauricie
			Fluoxastrobine	11	Montérégie
			Fluxapyroxad	7	
			Iprodione	2	
			Penthiopyrad	7	
			Pydiflumétofène	7	

			Pyraclostrobine	11	
			Pyriméthanil	9	
			Thiophanate-méthyle	1	
			Trifloxystrobine	11	
<i>Botrytis squamosa</i>	Brûlure de la feuille	Oignon	Azoxystrobine	11	Montérégie
			Boscalide	7	
			Difénoconazole	3	
			Fludioxonil	12	
			Fluopyram	7	
			Fluxapyroxad	7	
			Picoxystrobine	11	
			Pyraclostrobine	11	
			Pyriméthanil	9	
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Anthracnose	Fraise	Azoxystrobine	11	Montérégie
		Framboise	Boscalide	7	Laurentides
			Cyprodinil	9	Estrie
			Fluopyram	7	
			Fluoxastrobine	11	
			Fluxapyroxad	7	
			Pyraclostrobine	11	
			Trifloxystrobine	11	
<i>Erysiphe necator</i>	Oïdium	Vigne	Boscalide	7	Montérégie
			Difénoconazole	3	
			Fluopyram	7	
			Fluoxastrobine	11	
			Fluxapyroxad	7	
			Pydiflumétofen	7	
			Pyraclostrobine	11	
<i>Phytophthora infestans</i>	Mildiou	Pomme de terre	Métalaxyl-M	4	Capitale-Nationale
<i>Plasmopara viticola</i>	Mildiou	Vigne	Boscalide	7	Montérégie
			Pyraclostrobine	11	
<i>Venturia inaequalis</i>	Tavelure	Pomme	Thiophanate-méthyl	1	Partout au Québec
			Dodine	U12	
			Myclobutanil	3	
			Difénoconazole	3	
			Trifloxystrobine	11	

* Tiré de l'enquête sur la résistance des ennemis des cultures aux pesticides du CRAAQ réalisée en 2011-2012, du projet 19-2.2-06-PHYTO mené par Phytodata et du site web du réseau pommier de l'IRDA (<https://reseaupommier.irda.qc.ca/?p=6162>)

Moisissure grise

Botrytis cinerea [forme imparfaite du *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.], l'agent pathogène responsable de la moisissure grise est certainement celui qui est le plus étudié en ce qui concerne la résistance aux fongicides. *B. cinerea* affecte de nombreuses espèces végétales, incluant des cultures d'importance économique comme la fraise, la framboise et la vigne (Elad et al. 2004).

État de la résistance au niveau mondial :

Le premier rapport à propos de la résistance de *B. cinerea* aux fongicides remonte au début des années 1970 (Bollen et Scholten, 1971). L'étude de la résistance aux fongicides a même conduit au fil des années à la reclassification de certaines sous-espèces, soit *Botrytis pseudocinerea*, *Botrytis cinerea* groupe S et *Botrytis fragariae* (Leroch et al. 2013; Rupp et al. 2017; Walker et al. 2013). Des cas de résistance de *B. cinerea* aux fongicides ont été rapportés dans les principales cultures affectées et dans toutes les régions du monde où *B. cinerea* représente une menace pour les productions. Les niveaux de résistances sont variables d'une population à l'autre, mais ceux-ci sont assez généralisés pour les classes de fongicides suivantes : benzimidazoles (FRAC 1), dicarboximides (FRAC 2), inhibiteurs de la déméthylase (FRAC 3), inhibiteurs de la succinate déhydrogénase (FRAC 7), anilinopyrimidines (FRAC 9), strobilurines (Frac 11), phénylpyrroles (FRAC 12) et inhibiteurs de la kéto réductase (FRAC 17).

État de la résistance au Québec :

Au Québec, il existe peu de données sur la résistance aux fongicides. En 2012, un inventaire moléculaire de la résistance aux fongicides chez *B. cinerea* a été réalisé dans la culture de la vigne et de la fraise et les résultats obtenus dans cette étude suggéraient des niveaux de résistance élevés aux strobilurines (mutation G143A) et au boscalide (mutations H272R/Y), des niveaux de résistance modérés à l'iprodione (mutation I365S), mais des niveaux de résistance faibles au fenhexamide (mutations F412S) et aux autres fongicides appartenant au groupe FRAC 7 (faible proportion des mutations N230I et P225F) (Van der Heyden et Carisse, 2012). Une seconde étude, réalisée dans la vigne seulement, révélait également des niveaux de résistance élevés au boscalide (H272Y/R), à l'iprodione (I365S) et aux strobilurines (G143A) (Van der Heyden et al. 2014). Le projet 19-2.2-06-PHYTO, débuté en 2019, a permis de mener un inventaire québécois de la résistance aux fongicides dans la culture de la fraise et de la vigne. Il en est ressorti que *Botrytis cinerea* est résistant à une grande quantité de matières actives. En effet, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet suggèrent également des niveaux de résistance élevés aux strobilurines (93,5% dans la fraise et 90,1%

dans la vigne) et au boscalide (89,1% dans la fraise et 80,5% dans la vigne) et des niveaux de résistance élevés (72%) dans la fraise pour les autres fongicides du groupe FRAC 7 et modérés (39,1%) dans la vigne. Il est à noter que la proportion des mutations qui confèrent de la résistance aux fongicides du groupe FRAC 7 en général, et pas seulement au boscalide, est élevée comparativement aux données obtenues lors de l'inventaire effectué en 2012. Le niveau de résistance au fenhexamide est pour sa part modéré dans la fraise (57,4%) et faible dans la vigne (15,2%) alors que le niveau de résistance à l'iprodione est élevé dans la fraise (85,9%) et modéré dans la vigne (50%). Dans cette étude, la présence de phénotypes MDR1h responsables de la résistance aux groupes FRAC 9 et 12 a également été détectée. Plus précisément, les résultats de bioessais ont permis de mesurer, pour la fraise, des niveaux de résistance modérés au cyprodinil (45%) et des niveaux de résistance très faibles au fludioxonil (4%). Pour la vigne, ces niveaux de résistance sont faibles à modérés pour le cyprodinil (25,5%) et très faibles pour le fludioxonil (1%).

Mécanismes connus de la résistance :

Les mécanismes par lesquels *B. cinerea* développe de la résistance aux fongicides dépendent principalement du mode d'action du fongicide auquel il est exposé. Il peut s'agir d'une modification de la cible causée par des mutations au niveau des gènes codant pour la protéine cible, de la surexpression de la cible qui permet à la cellule de diminuer l'effet du fongicide sur certaines voies métaboliques ou de transporteurs à efflux qui permettent à la cellule d'exporter les molécules qu'elle considère comme toxiques à l'extérieur de celle-ci. Le tableau 7 présente les mécanismes impliqués ou possiblement impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *B. cinerea* en fonction des différents groupes.

Méthodes de détection de la résistance :

Les tableaux 8 et 9 présentent les méthodes de détection par bioessais et génétiques de la résistance aux fongicides existantes pour *B. cinerea*.

Tableau 7. Résistance aux fongicides chez *B. cinerea*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Anilinopyrimidines	Cyprodinil Pyriméthanil	Allemagne Canada (NE, ON, QC)	Transporteurs à efflux	Leroch et al. 2013 Rupp et al. 2017 Oliveira et al. 2017

		Chili Chine États-Unis (CA, NC, SC, WA) Italie		Latorre et al. 2002 Latorre and Torres 2012 Liu et al. 2016 De Long et al. 2020 Li et al. 2014 Fernandez-Ortuño et al. 2014 Saito et al. 2016 Bertetti et al. 2020 Campia et al. 2017
Phénylpyrrole	Fludioxonil	Allemagne Chili États-Unis (CA, NC, SC, WA) Italie	Transporteurs à efflux	Rupp et al. 2017 Latorre et al. 2002 Latorre and Torres 2012 De Long et al. 2020 Li et al. 2014 Fernandez-Ortuño et al. 2014 Saito et al. 2016 Campia et al. 2017
Strobilurines	Azoxystrobine Fluoxastrobine Pyraclostrobine Trifloxystrobine	Allemagne Canada (NE, ON, QC) États-Unis (CA, NC, SC, WA) France	Modification de la cible	Grabke et Stammeler 2015 Leroch et al. 2013 Rupp et al. 2017 Oliveira et al. 2017 De Long et al. 2020 Fernandez-Ortuño et al. 2014 Li et al. 2014 Saito et al. 2016 Leroux et al. 2010
Carboximides	Boscalide Fluopyram Fluxapyroxade Pydiflumetofène	Allemagne Canada (NE, ON, QC) États-Unis (CA, NC, SC, WA) France Italie	Modification de la cible	Grabke et Stammeler 2015 Leroch et al. 2013 Rupp et al. 2017 Oliveira et al. 2017 De Long et al. 2020 Fernandez-Ortuño et al. 2014 Li et al. 2014 Hu et al. 2016 Saito et al. 2016 Leroux et al. 2010 Bertetti et al. 2020 Campia et al. 2017
Inhibiteur de la kéto réductase	Fenhexamide	Allemagne Canada (NE, ON, QC) États-Unis (CA, NC, SC, WA) Italie	Modification de la cible	Grabke et Stammeler 2015 Leroch et al. 2013 Rupp et al. 2017 Oliveira et al. 2017 De Long et al. 2020 Fernandez-Ortuño et al. 2014 Grabke et al. 2013 Li et al. 2014 Saito et al. 2016 Saito et al. 2019 Bertetti et al. 2020

Dicarboximides	Iprodione	Allemagne Canada (NE, ON, QC) Chine États-Unis (CA, NC, SC, WA)	Modification de la cible	Grabke et Stammeler 2015 Leroch et al. 2013 Rupp et al. 2017 Oliveira et al. 2017 Adnan et al. 2019 Liu et al. 2016 Fernandez-Ortuño et al. 2014 Li et al. 2014
----------------	-----------	--	--------------------------	--

Tableau 8. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *B. cinerea*.

Type de bioessais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Croissance mycélienne	Anilinopyrimidines Phénylpyrrole	s.o.	Weber et Hahn 2011
Croissance mycélienne avec doses discriminantes	Anilinopyrimidines Phénylpyrrole	s.o.	Fernandez-Ortuño et al. 2014
Germination des spores	Strobilurines Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase Inhibiteur de la kéto réductase Dicarboximides Inhibiteur de la kétoréductase	BASF 2009 V2	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/botrci-microtiter-monitoring-method-basf-2009-v2.pdf?sfvrsn=7b9a419a_4 (Stammeler et Speakman 2006)
	Anilinopyrimidines Phénylpyrrole	BCS 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/septr-radial-growth-bcs-2006-v1.pdf?sfvrsn=a799419a_4
		Syngenta 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/pyrnt-monitoring-method-syngenta-2006-v1.pdf?sfvrsn=549a419a_4

Tableau 9. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *B. cinerea*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Méthode	Références
Strobilurines	F129L G137R G143A	<i>cytb</i>	PCR-Séquençage	Leroux et al. 2010 Samuel et al. 2011
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	H272L/R/V/Y N230I P225F/H/L/T	<i>sdhb</i>	PCR-Séquençage	Yin et al. 2011
Inhibiteurs de la kéto réductase	F412C/I/S/V	<i>erg</i>	PCR-Séquençage	Billard et al. 2011 Billard et al. 2012

Brûlure de la feuille

Botrytis squamosa (Walker 1925) est l'agent pathogène responsable de la brûlure de la feuille de l'oignon et est considéré comme une maladie importante de l'oignon dans le sud-ouest du Québec. Jusqu'au milieu des années 2000, l'iprodione était le principal fongicide unisite utilisé par les producteurs de la région. Aujourd'hui, plusieurs fongicides unisites sont utilisés dans la culture de l'oignon pour lutter contre cette maladie, ceux-ci sont principalement des groupes 3, 7, 9 et 11 (RAP Oignon, ail et poireau 2020). Il s'agit toutefois de groupes pour lesquels le risque de développement de résistance est considéré modéré à élevé (FRAC Code List© 2023).

État de la résistance au niveau mondial :

Contrairement à *Botrytis cinerea*, pour lequel la résistance aux fongicides a été le sujet de nombreuses études, la résistance aux fongicides de *B. squamosa* reste très peu étudiée. L'état de la résistance de cet agent pathogène au niveau mondial est donc peu connu.

État de la résistance au Québec :

Malgré l'utilisation répétée de l'iprodione, des niveaux de résistance faibles à modérés ont été rapportés pour ce fongicide, soient entre 8 et 21% (Carisse and Tremblay 2007; Tremblay et al. 2003). Une seconde étude réalisée entre 2010 et 2012 révèle également des niveaux de résistance faibles à modérés pour l'iprodione causés par la mutation homologue de la I365S (Van der Heyden et al. 2014). L'évaluation de la résistance au boscalide, menée dans le cadre d'une étude non publiée a pour sa part révélée un important décalage entre les CI_{50} moyennes observées pour les souches 2004-2005 de la collection et les souches de 2014-15 (Figure 15). En effet une augmentation marquée de la CI_{50} moyenne a été observée. Ce décalage coïncide avec l'homologation du boscalide, ce qui peut laisser croire à un développement de résistance à cette matière active au cours de la période en question. Ces résultats confirment la fragilité de l'efficacité des fongicides et qu'il est possible de compromettre leur durée de vie utile en peu de temps. Un récent projet de maîtrise mené dans le cadre du projet d'inventaire 19-2.2-06-PHYTO a aussi permis de détecter de la résistance à plusieurs fongicides de différents groupes chez *B. squamosa*. L'incidence de la résistance était de 82,9% pour le boscalide,

79,5% pour le difénoconazole, 4,6% pour le fludioxonil, 78,4% pour le fluopyram, 79,3% pour le fluxapyroxade, 75,6% pour le picoxystrobine, 60,9% pour le pyraclostrobine et 39,1% pour le pyriméthanil (Poulin-Ouellette 2023).

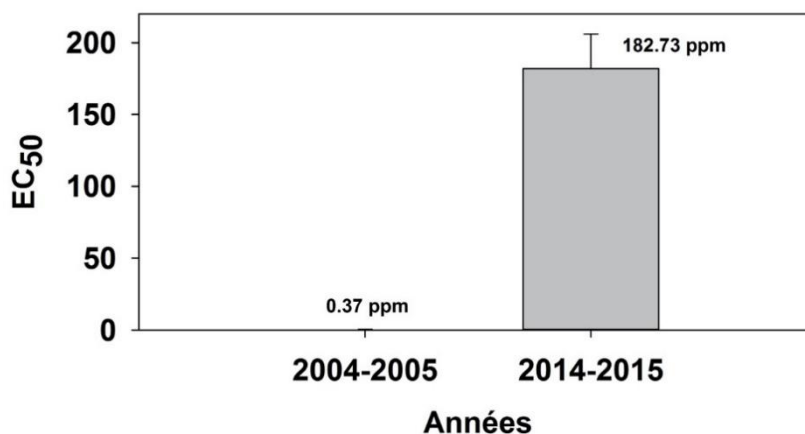


Figure 15 : Comparaison des résultats des tests de résistance réalisés sur des échantillons recueillis en 2004-2005 et 10 ans plus tard en 2014-2015 (source Van der Heyden, non publiée).

Mécanismes connus de la résistance :

Les mécanismes de développement de la résistance chez *B. squamosa* n'ont pas été très étudiés, on suppose donc qu'il s'agisse des mêmes que ceux retrouvés chez *B. cinerea* et les autres champignons et oomycètes et qu'ils dépendent principalement du mode d'action du fongicide auquel l'agent pathogène est exposé. Le tableau 9 présente les mécanismes potentiellement impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *B. squamosa* en fonction des différents groupes.

Méthodes de détection de la résistance :

Le tableau 10 présente les méthodes de détection par bioessais de la résistance aux fongicides existante pour *B. squamosa*. Des protocoles publiés de détection de la résistance par génétique ne sont disponibles que pour l'iprodione (FRAC 2), ce produit n'étant plus homologué pour la culture de l'oignon, ces protocoles ne seront pas présentés dans le cadre de cette revue de littérature. Une mutation homologue à la H272Y a pu être détectée dans le cadre d'une étude non publiée. Les amorces utilisées étaient celles de *B. cinerea* provenant de Yin et al. (2011). Ce protocole ne sera pas décrit ici.

Tableau 10. Résistance aux fongicides chez *B. squamosa*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Anilinopyrimidines	Pyriméthanil	Canada (QC)	Transporteurs à efflux	Projet 19-2.2-06-PHYTO
Phénylpyrrole	Fludioxonil	Canada (QC)	Transporteurs à efflux	Projet 19-2.2-06-PHYTO
Strobilurines	Pycoxystrobine Pyraclostrobine	Canada (QC)	Modification de la cible	Projet 19-2.2-06-PHYTO
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	Boscalide Fluopyram Fluxapyroxade	Canada (QC)	Modification de la cible	Projet 19-2.2-06-PHYTO
Dicarboximides	Iprodione	Angleterre	Modification de la cible	Presley et Maude 1980
Inhibiteurs de la déméthylation	Difénoconazole	Canada (QC)	Modification de la cible	Projet 19-2.2-06-PHYTO

Tableau 11. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *B. squamosa*.

Type de bio essais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Germination des spores	Strobilurines Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase Inhibiteurs de la déméthylation Anilinopyrimidines Phénylpyrrole	BASF 2009 V2	Stammler and Speakman 2006 adapté pour <i>B. squamosa</i> par Poulin-Ouellette (2023)

Anthracnose

L'anthracnose est causée par certaines espèces du complexe des *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Cet agent pathogène s'attaque à plusieurs cultures, mais l'anthracnose est l'une des principales maladies de la fraise (Bernstein (1995), Freeman (2008), Peres (2005)). Cette maladie occasionne des pertes de rendement et des pertes économiques importantes (Dean et al. 2012).

État de la résistance au niveau mondial :

Les travaux réalisés par Ishii et al. (2016) ont permis de tester l'efficacité de fongicides appartenant aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHIs) contre les *Colletotrichum spp.* causant l'anthracnose, soit le boscalide, le penthiopyrad, le fluopyram, le fluxapyroxade et le benzovindiflupyr.

Les souches testées dans le cadre de cette étude provenaient du Japon et des États-Unis, elles avaient été recueillies sur diverses plantes hôtes et appartenaient à quatre espèces de *Colletotrichum spp.*, soit *C. acutatum*, *C. cereale*, *C. gloeosporioides* et *C. orbiculare*. Cette étude suggère, grâce à des tests de croissance mycélienne et de germination de spores, que les espèces de *Colletotrichum spp.* sont naturellement insensibles au boscalide, au fluxapyroxade et au fluopyram. De plus, aucune mutation impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase n'a été retrouvée chez les souches testées. Les souches de *C. acutatum* étaient toutefois sensibles au penthiopyrade et au benzovindiflupyr, fongicide auquel toutes les espèces de *Colletotrichum spp.* de l'étude étaient aussi sensibles. Les premiers cas de résistance croisée aux Qols chez *C. acutatum* dans la fraise ont été répertoriés en Floride en 2016 par Forcelini (2016). La résistance à l'azoxystobine et à la pyraclostrobine était conférée par une mutation sur le gène *cytB*, la mutation G143A ou F129L. Cette étude rapporte les résultats de tests réalisés sur 181 souches recueillies entre 1994 et 2014. La présence de la mutation F129L conférait un niveau de résistance modéré. Les souches ayant la mutation G143A étaient pour leur part considérées fortement résistantes.

État de la résistance au Québec :

Le projet 19-2.2-06-PHYTO a permis d'effectuer un inventaire québécois de la résistance aux fongicides chez *C. acutatum* dans la culture de la fraise. Dans le cadre de ce projet, la proportion d'isolats résistants était très élevée pour les fongicides du groupe 11. En effet, 97% des isolats possédaient la mutation G143A sur le gène *cytB*. La proportion des isolats résistants était faible à modérée pour le cyprodinil du groupe 9 (27,5%) et aucune souche résistance n'a été détectée pour le fludioxonil appartenant au groupe 12. Comme attendu, les isolats de *C. acutatum* étaient tous insensibles aux matières actives du groupe 7 testées, soit le boscalide, le fluopyram et le fluxapyroxade.

Mécanismes connus de la résistance :

Les mécanismes par lesquels *C. acutatum* développe de la résistance aux fongicides dépendent principalement du mode d'action du fongicide auquel il est exposé. Les principaux fongicides utilisés pour le contrôle de l'anthracnose appartiennent aux strobilurines, aux anilinopyrimidines et aux phénylpyrroles, les principaux mécanismes impliqués dans le développement de la résistance sont conséquemment la modification de la cible et l'exportation. Plusieurs fongicides commerciaux utilisés contiennent aussi un inhibiteur de la succinate déshydrogénase, pourtant *C. acutatum* est

naturellement insensible à plusieurs matières actives de cette famille de fongicides (boscalide, fluopyram, fluxapyroxade) à l'exception du benzovindiflupyr et du penthiopyrad (Ishii et al. 2016). Le mécanisme lui conférant cette insensibilité n'a pas encore été élucidé (Ishii et al. 2016). Le tableau 11 présente les principaux mécanismes impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *C. acutatum* en fonction des différents groupes.

Méthodes de détection de la résistance :

Les tableaux 12 et 13 présentent les méthodes de détection par bioessais et génétiques de la résistance aux fongicides existantes pour *C. acutatum*.

Tableau 12. Résistance aux fongicides chez *C. acutatum*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Anilinopyrimidines	Cyprodinil Pyriméthanil	Canada (QC) États-Unis (SC)	Transporteurs à efflux	19-2.2-06-PHYTO Schnabel et al. 2021
Phénylpyrrole	Fludioxonil	Canada (QC) Chine États-Unis (SC)	Transporteurs à efflux	19-2.2-06-PHYTO Gao et al. 2018 Schnabel et al. 2021
Inhibiteurs de la déméthylation	Difénoconazole	Brésil Chine	Modification de la cible	Gama et al. 2020 Chen et al. 2018 Wang et al. 2020 Wei et al. 2020
Strobilurines	Azoxystrobine Fluoxastrobine Pyraclostrobine Trifloxystrobine	Brésil Canada (QC) États-Unis	Modification de la cible	Moreira et al. 2019 19-2.2-06-PHYTO Forcelini et al. 2016, 2018
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	Boscalide Fluopyram Fluxapyroxade Penthiopyrade	Canada (QC) États-Unis (SC) Japon	Insensibilité naturelle sans modification de la cible	19-2.2-06-PHYTO Ishii et al. 2016

Tableau 13. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *C. acutatum*.

Type de bioessais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Croissance mycélienne	Anilinopyrimidines	s.o.	Schnabel et al. 2021
	Phénylpyrrole	s.o.	Gao et al. 2018
	Strobilurines	s.o.	Forcelini et al. 2016
	Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	s.o.	Ishii et al. 2016

Tableau 14. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *C. acutatum*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Méthodes	Références
Strobilurines	F129L G137R G143A	<i>cytb</i>	PCR-Séquençage	Forcelini et al. 2016
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	H272L/R/V/Y N230I P225F/H/L/T	<i>sdhb</i>	PCR-Séquençage	Ishii et al. 2016

Blanc de la vigne

Le blanc de la vigne est causé par le parasite obligatoire *Erysiphe necator* Schwein. Cet agent pathogène s'attaque aux plantes de la famille des vitacées telles que la vigne. Tous les tissus vivants de la plante peuvent être infectés. La vigne européenne *Vitis vinifera* est l'hôte ayant la plus grande importance économique et elle est particulièrement sensible aux infections par *E. necator*. Une raison évoquée pour cette sensibilité est qu'il n'y pas eu co-évolution de l'agent pathogène avec cet hôte puisqu'*E. necator* a été introduit en Europe depuis l'Amérique en 1845 (Gadoury et al. 2012). La gestion de l'oïdium de la vigne, aussi appelé blanc, requière de nombreuses applications de fongicides appartenant à différents groupes, tels que les strobilurines (QoI), les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) et les inhibiteurs de la déméthylation (DMI), malheureusement la résistance aux fongicides compromet depuis plusieurs années déjà le contrôle de cette maladie (Baudoin et al. 2008).

État de la résistance au niveau mondial :

La résistance aux strobilurines (QoI) chez *E. necator* a été détectée pour la première fois aux États-Unis dans l'état de New York par Wong et Wilcox (2002), par la suite par Baudoin et al. (2008) en

Virginie et par Miles et al. (2012) dans le Michigan. Ailleurs dans le monde, de la résistance aux fongicides du groupe 11 a été observée en Hongrie, Slovaquie, France, Nouvelle-Zélande et Inde (Beresford et al. 2016; Dufour et al. 2011; Ghule et al. 2018; Graf 2017). De la résistance aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) a aussi été détectée en Europe et aux États-Unis. En effet, de la résistance au fluxapyroxade a été observée pour la première fois en Italie en 2014 (Graf 2017, Graf et al 2017). Cherrad et al. (2018) ont aussi observé de la résistance au boscalide en France. De la résistance aux SDHI a ensuite été détectée dans différents pays d'Europe tels que la Hongrie et l'Allemagne (Klappach et al. 2021). Aux États-Unis, Stergiopoulos et al. (2022) ont détecté la mutation H242R conférant de la résistance au boscalide chez des isolats provenant de la Californie, du Michigan et de l'état de Washington ainsi que la mutation I244V conférant une résistance croisée au boscalide et au fluopyram chez des isolats provenant de la Californie et de l'Oregon. De la résistance aux fongicides du groupe FRAC 3, les inhibiteurs de la déméthylation (DMIs), a été observée à plusieurs endroits dans le monde depuis déjà plusieurs années. Aux États-Unis la résistance aux DMI chez *E. necator* a été détectée pour la première fois en Californie en 1985 (Gubler et al. 1996). Par la suite, des cas ont été rapportés dans l'état de New York (Erickson and Wilcox 1997) et en Virginia (Colcol et al. 2012). L'étude de Délye et al. (1997) fait pour sa part état d'isolats résistants provenant de France, du Portugal, de Suisse, d'Israël et d'Inde. Selon une revue publiée par Vielba-Fernandez et al. (2020), de la résistance à différentes matières actives du groupe FRAC 3 a aussi été observée en Afrique, en Australie, en Autriche, en Iran et en Nouvelle-Zélande.

État de la résistance au Canada et au Québec :

L'état de la résistance aux fongicides de l'oïdium de la vigne est peu connu au Québec. Au Canada, Northover et Homeyer (2001) ont détecté pour la première fois de la résistance au myclobutanil en Ontario au courant de la saison 1999. De leur côté, Stergiopoulos et al. (2022) ont testé quelques isolats provenant de la Colombie-Britannique pour la résistance aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase et n'ont pas détecté les mutations H242R et I244V habituellement responsables d'une diminution de sensibilité aux fongicides du groupe 7. Le projet 19-2.2-06-PHYTO a permis d'effectuer un inventaire québécois de la résistance aux fongicides chez *E. necator*. Au Québec, la proportion des échantillons résistants aux fongicides des groupes 7 et 11, est modérée à élevée, soit respectivement 33% (H242R) et 67,5% (G143A). La proportion des échantillons de la présente étude qui possèdent la mutation (Y136F) reconnue comme impliquée dans la résistance aux DMIs chez *E. necator* est modérée (45,5%). La proportion d'isolats possédant les deux génotypes soit ayant à la fois un allèle mutant et

non mutant (G3- HTZ) est faible à modérée (22,2%). Ces isolats hétérozygotes ne présentent en pratique pas un phénotype résistant, mais sont porteurs de la mutation. La résistance aux fongicides du groupe 3 pouvant être conférée par plusieurs mécanismes différents, la présence ou l'absence de mutation sur le gène *cyp51* n'est pas gage de sensibilité ou de résistance chez le champignon. Notons que dans le cadre du projet 19-2.2-06-PHYTO la résistance a été détectée par méthode génétique exclusivement, les cas de résistance qui seraient dus à d'autres mécanismes n'ont donc pas pu être détectés.

Mécanismes connus de la résistance :

Plusieurs mécanismes sont associés à la résistance aux fongicides unisites chez *E. necator*. Pour ce qui est des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase, les mutations H242R et H242Y sur la sous-unité b du gène *sdh* sont associées à la résistance au boscalide, au fluopyram et au fluxapyroxade. La mutation G169D sur la sous-unité c du *sdh* est pour sa part associée à une diminution de la sensibilité de *E. necator* à ces derniers. Stergiopoulos et al. (2022) ont toutefois émis l'hypothèse qu'en plus de la modification de la cible, un autre mécanisme pourrait moduler la tolérance au SDHs chez *E. necator*. Des isolats ayant une sensibilité réduite au boscalide et au fluopyram, mais ne présentant pas de mutations ont effectivement été observés dans le cadre de leur étude. Le tableau 14 présente les mécanismes potentiellement impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *E. necator*.

Méthodes de détection de la résistance :

E. necator étant un champignon biotrophe, les méthodes de détections de la résistance par bioessais se font par des essais sur disques foliaires. Les tableaux 15 et 16 présentent les différentes méthodes de détection de la résistance aux fongicides existantes pour *E. necator* respectivement par bioessais et génétiques.

Tableau 15. Résistance aux fongicides chez *E. necator*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Strobilurines	Azoxystrobine Fluoxastrobine Pyraclostrobine Trifloxystrobine	Canada (QC) États-Unis	Modification de la cible	Vielba-Hernandez 2020 19-2.2-06-PHYTO Baudoin et al. 2008 Wong et Wilcox 2002

				Miles et al. 2012 Dufour et al. 2011 Beresford et al. 2016 Ghule et al. 2018 Graf et al. 2017
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	Boscalide Fluopyram Fluxapyroxade Pydiflumétofène	Canada (BC, QC) États-Unis (CA, MI, OR, WA) France	Modification de la cible et possiblement d'autre(s) mécanismes inconnus	19-2.2-06-PHYTO Stergiopoulos et al. 2022 Klappach et al. 2021 Graf et al. 2017 Cherrad et al. 2018
Inhibiteurs de la déméthylation	Difénoconazole	Afrique Australie Autriche Canada (QC) États-Unis France Inde Iran Israël Nouvelle-Zélande Portugal Suisse	Modification de la cible et possiblement d'autre(s) mécanismes inconnus	North et Homeyer 2001 Breseford et al. 2016 Gubler et al. 1996 Erickson et Wilcox 1997 Colcol et al. 2012 Délye et al. 1997

Tableau 16. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *E. necator*.

Type de bioessais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Disques foliaires	Strobilurines Inhibiteurs de la déméthylation Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	UNCINE leaf disc monitoring method EpiL. 2006 V1 n.d	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/uncine-leaf-disc-monitoring-method-epil-2006-v1.pdf?sfvrsn=a599419a_4 Cherrad et al. 2018

Tableau 17: Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *E. necator*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Méthodes	Références
Strobilurines	F129L G137R G143A	<i>cytb</i>	PCR-Séquençage	Ghule et al. 2018

Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	H242R/Y I244V G169D	<i>sdhb</i> <i>sdhc</i>	PCR-Séquençage	Cherrad et al. 2018 Stergiopoulos et al. 2022
Inhibiteurs de la déméthylation	Y136F A1119C	<i>cyp51</i>	PCR-Séquençage	Colcol et al. 2012 Frenkel et al. 2015

Mildiou de la vigne

Le mildiou causé par *Plasmopara viticola* est considéré comme l'une des maladies les plus importantes de la vigne dans le monde (Gessler et al. 2011). L'agent pathogène du mildiou de la vigne est spécifique au genre *Vitis* et est originaire d'Amérique du Nord (Gessler et al. 2011). *P. viticola* est un agent pathogène polycyclique, c'est-à-dire qu'il est capable d'effectuer plusieurs cycles durant une même saison de croissance (Massi et al. 2021). Dans l'est du Canada, en raison des printemps souvent doux et des pluies abondantes, les conditions sont particulièrement propices au développement de la maladie (Carisse 2016 ; Gessler et al. 2011). Pour cette raison, une quantité importante de fongicide est utilisée pour le contrôle de cette maladie.

État de la résistance au niveau mondial :

En Europe, la résistance de *P. viticola* aux strobilurines (Qols) a été observée pour la première fois en 2000 (Genet 2006, Gisi 2002, Gullino 2004, Sierotzki 2005) (tiré de Baudoin et al. 2008). Aux États-Unis, Baudoin et al. 2008 ont détecté de la résistance aux Qols chez une forte proportion des isolats provenant de Virginie, du Maryland et de Pennsylvanie. En Géorgie, des échantillons de *P. viticola* ont été collectés entre 2015 et 2018 dans 18 vignobles. Tous les échantillons d'ADN disponibles ont été testés pour détecter la présence des mutations G143A (Qols) et G1105S (CAAs) connues pour causer une résistance. Cette étude a documenté la présence généralisée de la résistance aux Qols chez *P. viticola* puisque 83 % des isolats collectés en 2017 et 2018 se sont révélés positifs pour la résistance au Qols. Au total, 94 % des vignobles étudiés avaient confirmé une résistance aux Qols à la fin de la période d'étude. Aucune résistance aux fongicides CAAs ou PAs n'a été identifiée dans cette étude (Campbell et al. 2020). Dans une autre étude, réalisée au Brésil, le séquençage du cytochrome b a révélé que 28 et 100% des isolats provenant respectivement de vignobles sous gestion biologique et conventionnelle étaient porteurs de la mutation G143A (Santos et al. 2020b). Une autre étude a également révélé par pyroséquençage que les fréquences de la mutation G143A (Qols) et de la mutation G1105S (CAAs) variaient parmi les 66 populations de champ et étaient positivement corrélées avec le nombre d'applications de Qols et de CAAs. La mutation G143A a été observée dans 60 populations, dont 39 avec des fréquences supérieures à 90 %. La mutation G1105S a été détectée

dans 20 populations avec des fréquences allant de 18% à 100 %, et qui étaient également porteuses de la mutation G143A (Santos et al. 2020a).

État de la résistance au Canada et au Québec :

Le projet 19-2.2-06-PHYTO a permis de détecter de la résistance aux fongicides du groupe 11 chez *P. viticola*. En effet, des niveaux de résistance modérés à élevés (63%) aux strobilurines ont été détectés chez les isolats. Pour ce qui est des CAAs, bien qu'aucun isolat résistant n'ait été détecté, des isolats présentant la mutation sur un des deux allèles ont été détectés. Ces isolats hétérozygotes représentent 10,7% des isolats testés. Ils ne présentent en pratique pas un phénotype résistant, mais sont porteurs de la mutation conférant de la résistance aux fongicides du groupe 40. Notons que dans le cadre du projet 19-2.2-06-PHYTO la résistance a été détectée par méthode génétique exclusivement, les cas de résistance qui seraient dus à d'autres mécanismes n'ont donc pas pu être détectés.

Mécanismes connus de la résistance :

Les mécanismes par lesquels *P. viticola* développe de la résistance aux fongicides dépendent principalement du mode d'action du fongicide auquel il est exposé, comme les fongicides impliqués dans le contrôle du mildiou de la vigne sont principalement des strobilurines, des amides de l'acide carboxylique et des phénylamides, le principal mécanisme connu actuellement est la modification de la cible. En effet, comme chez les autres pathogènes fongiques exposés à des matières actives du groupe 11, des souches de *P. viticola* peuvent acquérir la mutation G143A et devenir résistantes. La résistance aux CAAs est aussi conférée par des mutations (G1105S/V), toutefois, comme la mutation est récessive, elle doit être présente sur les deux allèles du gène de la cellulose synthase 3 (*cesA3*) pour conférer un phénotype résistant. Le tableau 17 présente les mécanismes impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *P. viticola* en fonction des différents groupes.

Méthodes de détection de la résistance :

Les tableaux 18 et 19 présentent les méthodes de détection de la résistance aux fongicides existantes pour *P. viticola* respectivement par bioessais et génétiques.

Tableau 18. Résistance aux fongicides chez *P. viticola*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Strobilurines	Krésoxim-méthyl Pyraclostrobine Trifloxystrobine	Brésil Canada (QC) États-Unis (NY, PA, VA) France Italie Suisse Allemagne Portugal Espagne Grèce Roumanie	Modification de la cible	19-2.2-06-PHYTO Baudoin et al. 2008 Chen et al. 2007
Amides d'acide carboxylique	Mandipropamide Diméthomorphe	Canada (QC) États-Unis (NY, PA, VA) France Italie Suisse Allemagne Portugal Espagne	Modification de la cible	19-2.2-06-PHYTO Blum et al. 2010
Phénylamides	Métalaxyl-M	Australie	Inconnu	Hall et al. 2017

Tableau 19. Méthodes par bio essais de détection de la résistance aux fongicides chez *P. viticola*.

Type de bioessais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Disques foliaires	Strobilurines Amides d'acide carboxylique	PLASVI microtiter	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/plasvi-microtiter.pdf?sfvrsn=409a419a_4
Disques foliaires	Inhibiteurs de la protéine de liaison à l'oxystérol	PLASVI Monitoring method OSBPI DuPont 2017	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/plasvi-monitoring-method-osbpi-dupont-2017.pdf?sfvrsn=6cae489a_2

Tableau 20. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *P. viticola*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Méthodes	Références
Strobilurines	G143A F129L G137R	<i>cytb</i>	PCR-Séquençage	Santos et al. 2020b

Tavelure de la pomme

La tavelure de la pomme causée par *Venturia inaequalis* est une maladie fongique de la pomme qui occasionne d'importantes pertes économiques pour les producteurs (Carisse (2002), Carisse and Bernier (2002)). Malheureusement, de nombreux cas de résistances aux fongicides ont été répertoriés pour cet agent pathogène à la suite d'applications préventives et post-infection répétées (Chapman 2011).

État de la résistance au niveau mondial :

Dans son étude, Chapman (2011) a évalué la sensibilité de souches provenant de vergers aux États-Unis, soit en Indiana et au Michigan, pour différents fongicides, dont le krésoxim-méthyl (FRAC 11), le thiophanate-méthyl (FRAC 1) et le myclobutanil (FRAC 3). Pour le myclobutanil, il a été estimé que de la résistance était présente dans plus de 55% de la population. L'état de la résistance au krésoxim méthylé était bien différente puisque seulement 1% des souches se sont avérées être résistantes. Le thiophanate-méthyl est le fongicide pour lequel Chapman (2011) a trouvé la plus grande proportion de souches résistantes, soit 80%. De son côté, l'étude de Villani (2016) a permis d'établir la sensibilité de base de souches provenant des États-Unis (NY) aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHIs), plus précisément au penthiopyrade, au fluopyram et au benzovindiflupyr. L'étude a aussi démontré qu'il existait une corrélation positive entre les CI50 du penthiopyrade et du fluopyram et entre les CI50 du fluopyram et du benzovindiflupyr. Ayer (2019) a effectué une étude semblable avec des souches provenant aussi de l'état de New York, mais ayant été exposées aux fongicides SDHIs. Ils ont testé la sensibilité des souches au fluxapyroxade, au pydiflumétofen, à l'inpyrfluxam et au benzovindiflupyr. Les résultats que les souches non exposées étaient beaucoup plus sensibles que celles qui étaient exposées aux SDHIs. Dans l'étude de Ayer (2019), aucune mutation sur le gène *sdh* n'a toutefois été observée chez les souches exposées aux SDHIs. Fiaccadori (2018) a mené une étude en Italie sur des souches provenant de vergers avec des niveaux de contrôle de la tavelure connus pour deux fongicides appartenant aux anilinoypyrimidines (AP), soit le cyprodinil et le pyriméthanil. Ainsi, pour le pyriméthanil, la valeur moyenne de CI50 pour les souches n'ayant jamais été exposées à ce fongicide était 5 fois plus faible que la CI50 des souches provenant de vergers où le contrôle de la tavelure était déficient. Pour le cyprodinil, les souches sauvages avaient une CI50 moyenne 50 fois plus faible que les souches provenant de vergers où le contrôle de la tavelure échouait. Jaklova (2020) a

testé des souches provenant de vergers en République tchèque. Les souches ont été séquencées pour la mutation G143A du gène *cytb* conférant à l'agent pathogène une résistance aux strobilurines (Qols). L'étude a démontré que cette mutation était présente chez 95% des souches provenant des vergers conventionnels. Dans le tiers de ces vergers, des mutants ont été détectés, et ce même si certains avaient cessé l'utilisation des strobilurines depuis plus de 14 ans.

État de la résistance au Canada et au Québec :

Carisse and Pelletier (1994) ont évalué la sensibilité de base et la sensibilité de *V. inaequalis* au fenarimol, un inhibiteur de la déméthylation (DMI). Une sensibilité réduite comparativement à la sensibilité de base a été observée chez des souches recueillies dans 3 des 26 vergers étudiés. Selon Carisse and Pelletier (1994), il est probable que les souches les moins sensibles au fenarimol possèdent aussi une sensibilité moindre aux autres fongicides DMIs comme le myclobutanil. En 2014, un inventaire mené par l'IRDA, le projet IRDA-1-12-1590 (Phillion et Joubert 2014), a permis de dresser un portrait de la résistance aux fongicides chez *V. inaequalis*. De la résistance à certains fongicides des groupes FRAC 3, 7, 9 et 11 a ainsi été détectée dans plusieurs vergers canadiens et québécois. En effet, 95% des populations issues des vergers de l'étude avaient un facteur de résistance d'au moins 10 au myclobutanil alors que cette proportion était de 37% pour le difénoconazole. De plus, la proportion des individus résistants au trifloxystrobine était en augmentation. Pour ce qui est des anilinopyrimidines, il a été observé que, bien qu'un seul échantillon ait atteint les seuils de résistance pratique au Québec, ces seuils avaient été atteints hors Québec dans plusieurs vergers. Finalement, de la tolérance aux SDHIs a été observée dans les vergers de l'étude.

Mécanismes connus de la résistance :

Les fongicides utilisés pour le contrôle de la tavelure contiennent principalement des matières actives appartenant aux groupes des DMIs, des SDHIs, des APs et des Qols, ainsi les mécanismes par lesquels *V. inaequalis* développe de la résistance aux fongicides dépendent principalement des modes d'action de ces derniers. Aucune mutation sur le *sdhb* n'a été détectée chez les isolats résistants des études de Villani et al. (2016a) et Ayer et al. (2019), il pourrait donc y avoir plusieurs mécanismes en cause pour la résistance aux SDHIs chez *V. inaequalis*. Ce qui est aussi le cas pour la résistance aux DMIs qui peut être due à plusieurs mécanismes différents, tels que la mutation, l'exportation ou la surexpression (Villani et al. 2016b) Le tableau 20 présente les mécanismes potentiellement impliqués

dans le développement de la résistance aux fongicides chez *V. inaequalis* en fonction des différents groupes.

Méthodes de détection de la résistance :

Les tableaux 21 et 22 présentent les méthodes de détection de la résistance aux fongicides existantes pour *V. inaequalis* respectivement par bioessais et génétiques.

Tableau 21. Résistance aux fongicides chez *Venturia inaequalis*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Anilinopyrimidines	Cyprodinil Pyriméthanol	Canada (QC) Italie	Transporteurs à efflux	IRDA-1-12-1590 Fiaccadori 2018
Méthyl, Benzimidazole, Carbamates	Thiophanate-méthyl	États-Unis	Modification de la cible	Chapman et al. 2011
Strobilurines	Krésoxim-méthyl Pyraclostrobine Trifloxystrobine	Canada (QC) Chine États-Unis Israël République tchèque	Modification de la cible	IRDA-1-12-1590 Li et al. 2021 Chapman et al. 2011 Gur et al. 2021 Jaklova 2020
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	Benzovindiflupyr Fluopyram Fluxapyroxade Inpyrfluxam Penthiopyrade Pydiflumétofène	Canada (QC) États-Unis	Modification de la cible	IRDA-1-12-1590 Ayer et al. 2019 Villani et al. 2016a
Inhibiteurs de la déméthylation	Difénoconazole Fenarimol Myclobutanil Difénoconazole	Canada (QC) Chine États-Unis	Modification de la cible, surexpression du gène <i>CYP51A1</i> et possiblement d'autre(s) mécanismes inconnus	Carisse et Pelletier 1994 IRDA-1-12-1590 Li et al. 2021 Chapman et al. 2011 Schnabel et Jones 2001 Villani et al. 2016b

Tableau 22. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *V. inaequalis*.

Type de bioessais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Germination des spores	Strobilurines	VENTIN spore germination BASF 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-spore-germination-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=be99419a_4
Plants entiers	Anilinopyrimidines Inhibiteurs de la déméthylation	VENTIN monitoring method Syngenta2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-monitoring-method-syngenta2006-v1.pdf?sfvrsn=a199419a_4
	Anilinopyrimidines Strobilurines	VENTIN in vivo-AP BASF 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-in-vivo-ap-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=a299419a_4

Tableau 23. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *V. inaequalis*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Méthode	Numéro de protocole FRAC	Références
Strobilurines	G143A F129L G137R	<i>cytb</i>	Pyroséquençage	VENTIN pyro-monitoring-method Bayer-2016	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-pyro-monitoring-method-bayer-20162bf42b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=85d7499a_2
			PCR-RFLP	VENTIN pcr-rflp-monitoring-method BASF 2015	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-pcr-rflp-monitoring-method-basf-2015fff32b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=51d0499a_2
Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase	H272L/R/V/Y* H277L/R/Y** N230I* P225F/H/L/T*	<i>sdh</i>	PCR-séquençage	s.o.	Villani et al. 2016a
Inhibiteurs de la déméthylation	Élément répétable en amont du	<i>cyp51</i>	PCR-séquençage	s.o	Villani et al. 2016b

* Mutations probables basées sur les modifications de la cible détectées chez *B. cinerea*

** Mutation probable basée sur les modifications de la cible détectées chez *A. alternata*

Mildiou du concombre

Le mildiou du concombre est causé par *Pseudoperonospora cubensis* [(Berkeley & M. A. Curtis) Rostovzev], un oomycète parasite obligatoire s'attaquant à plus de 40 espèces de plantes de la famille des Cucurbitacées. En l'absence de traitement fongicide ou lorsque les fongicides sont appliqués trop tardivement, cette maladie peut significativement réduire le rendement des cultures de concombre, cantaloup, courge et melon d'eau (Cohen et al. 2015; Holmes et al. 2004; Holmes et al. 2015). Les applications de fongicides et l'utilisation de cultivars tolérants représentent les deux principaux moyens de lutte contre le mildiou du concombre. Malheureusement, la diminution de l'efficacité de la tolérance chez les cultivars depuis 2004 et l'augmentation de la résistance aux fongicides compromettent le contrôle de la maladie (Colucci et Holmes 2007; Hausbeck et Cortright 2009; Holmes et Thomas 2006; Lebeda et Urban 2007; Mitani et al. 2001; Urban et Lebeda 2006; Zhu et al., 2008).

État de la résistance au niveau mondial :

La résistance aux fongicides chez *P. cubensis* représente un problème de taille en Europe depuis les années 1980. En effet, des cas de résistance aux phénylamides (FRAC 4) ont été observés par Lebeda et Cohen 2012 chez des isolats collectés en République Tchèque entre 2005 et 2009 et par Hermann et al. 2014 chez des isolats collectés entre 2008 et 2011 en Israël. En ce qui concerne la résistance aux strobilurines, les premiers isolats résistants ont été détectés au Japon par Takeda et al. (1999). La résistance aux Qols chez *P. cubensis* y a ensuite été confirmée par Heaney et al. 2000 et par Ishii et al. 2001 et 2002. Un autre groupe de fongicides utilisé pour le contrôle du mildiou du concombre est le groupe 40, soit les amides d'acide carboxylique (CAAs). De la résistance au groupe 40 a été observée sur la côte ouest-américaine ainsi qu'en Chine et en Israël (CAA FRAC working group, www.frac.info; Zhu et al. 2007). En effet, la mutation G1105V a été détectée chez des souches isolées de concombre provenant d'Israël alors que la mutation G1105W a été détectée chez des souches isolées de concombre, de courgette, de melon d'eau et cantaloup provenant des États-Unis (Blum et al. 2011; Sierotzki et al. 2011).

État de la résistance au Canada et au Québec :

Une enquête sur la résistance du pathogène du mildiou du concombre aux fongicides menée par Agriculture et Agroalimentaire Canada (PRR17-030) a permis, en 2017 et 2018, de déterminer la sensibilité d'isolats de *P. cubensis* recueillis en Ontario et au Québec à différents fongicides. Cette étude a permis de détecter une sensibilité réduite au pyraclostrobine et au fénamidone chez tous les isolats testés et une sensibilité variable pour le fluopicolide, le diméthomorphe et le mandipropamide.

Mécanismes connus de la résistance :

Les mécanismes par lesquels *P. cubensis* développe de la résistance aux fongicides dépendent principalement du mode d'action du fongicide auquel il est exposé. Le tableau 23 présente les mécanismes impliqués ou possiblement impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *P. cubensis* en fonction des différents groupes. Par exemple, la résistance de *P. cubensis* aux CAAs est due aux mutations G1105V et G1105W sur le gène de la cellulose synthase 3 (*cesA3*). Il s'agit d'une mutation récessive, les deux allèles doivent être mutants afin que le phénotype soit résistant. La résistance causée par la mutation G1105 confère la résistance à tous les fongicides du groupe des CAAs (Sierotzki et al. 2011).

Méthodes de détection de la résistance :

Les tableaux 24 et 25 présentent les méthodes de détection par bioessais et génétiques de la résistance aux fongicides existantes pour *P. cubensis*.

Tableau 24. Résistance aux fongicides chez *P. cubensis*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Strobilurines	Azoxystrobine	Canada (ON, QC)	Modification de la cible	PRR17-030
	Fenamidone	États-Unis		Lebeda et Cohen 2012
	Krésoxym-Méthyl	Espagne		Del Pino et al. 1999
	Pyraclostrobine	Japon		Ishii et al. 2001 Takeda et al. 1999
Amides d'acide carboxylique	Diméthomorphe Mandipropamid	Canada (ON, QC)	Modification de la cible	PRR17-030
		Chine		Zhu et al. 2007
		États-Unis		Blum et al. 2011
		Israël		Sierotzki et al. 2011

Phénylamides	Métalaxyl-M Méfénoxam	Israël République chèque États-Unis Chine Inde Vietnam	Inconnu	Reuveni et al. 1980 Urban et Lebeda 2007 Lebeda et Cohen 2012 Pavelkova et al. 2014 Hermann et al. 2014 Cohen et al. 2015
--------------	--------------------------	--	---------	--

Tableau 25. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *P. cubensis*.

Type de bioessais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Disque foliaire	Strobilurines	s.o.	Ishii et al. 2001

Tableau 26. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *P. cubensis*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Méthode	Références
Strobilurines	G143A	<i>cytb</i>	PCR-Séquençage	Ishii et al. 2001
Amides de l'acide carboxylique	G1105V/W	<i>cesA3</i>	PCR-Séquençage	Sierotzki et al. 2011

Mildiou de la pomme de terre

Le mildiou de la pomme de terre est une maladie pouvant causer des pertes très importantes dans les cultures de pommes de terre et de tomates (Jones 1998, Olanya et al. 2001). L'agent pathogène responsable de cette maladie est *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Il s'agit d'un oomycète possédant un fort potentiel de développement de résistance (Russell 2004).

État de la résistance au niveau mondial :

La résistance chez *P. infestans* semble se limiter aux fongicides des groupes FRAC 4 et 40, les phénylamides et les amides de l'acide carboxylique. Les premiers isolats résistants aux phénylamides ont été détectés aux Pays-Bas en 1980 (Davidse et al., 1981; Dowley and O'Sullivan, 1981). En Inde, des isolats résistants au métalaxyl ont aussi été observés par Arora et al. (1992) et ensuite par Thind et al. (2001). Aux États-Unis, une étude de Goodwin et al. (1996) a permis de détecter de la résistance au métalaxyl dans 13 des 15 états américains inventoriés. Les isolats de *P. infestans* provenaient de la culture de pomme de terre et de la tomate et avaient principalement été recueillis en 1992 et 1993. Au Danemark c'est de la résistance au mandipropamide (FRAC 40) qui a été observée dans des champs où le contrôle du mildiou par l'application de ce fongicide n'était plus efficace (Abuley et al. 2023).

État de la résistance au Canada et au Québec :

Il existe peu de données sur la résistance aux fongicides de *P. infestans* au Québec. Au Canada, de la résistance au métalaxyl a été détectée en Colombie-Britannique en 1992 et 1993 (Goodwin et al. 1996). Un projet pancanadien de Grappe agroscientifique, le Canadian Agri-Science Cluster for Horticulture 3, a toutefois été mené par Agriculture et Agroalimentaire Canada de 2018 à 2022 et un rapport final sera disponible sous peu. Les résultats actuellement disponibles de ce projet font état de résistance croissante au métalaxyl-M au courant de la saison 2018 en Ontario et de plusieurs isolats résistants à cette matière active en Colombie-Britannique chez des isolats recueillis en 2018 et 2019. On peut lire dans le dernier rapport d'avancement (Peters 2022, <https://potatoresearchcluster.ca/late-blight/>) que des tests sur des isolats recueillis en Ontario en 2021 ont permis de déterminer que ceux-ci étaient sensibles ou modérément résistants au métalaxyl-M. Les autres fongicides testés (Ridomil Gold® (métalaxyl-M and -s isomer), Ranman® (cyazofamid), CurzateTM (cymoxanil), Allegro® (fluazinam), Bravo®ZN (chlorothalonil), Reason® (fenamidone), Revus® (mandipropamide) and Orondis®Ultra (mandipropamid and oxathiapiprolin)) étaient tous en mesure d'inhiber la croissance des isolats US-23 de *P. infestans*. La résistance au groupe 49, les inhibiteurs de la protéine de liaison à l'oxystérol (OSBPI), a aussi été testé en 2019 dans le cadre de ce projet et aucune résistance n'a été détectée.

Mécanismes connus de la résistance:

Les mécanismes par lesquels *P. infestans* développe de la résistance aux fongicides dépendent principalement du mode d'action du fongicide auquel il est exposé et possiblement aussi du génotype de l'agent pathogène (Cohen et al. 2021). Dans le cas des phénylamides (FRAC 4), l'origine de la résistance semble avoir commencé à partir d'isolats naturellement insensibles, et ce avant l'introduction de fongicides de ce groupe. Daggett et al. (1993) ont en effet détecté des isolats résistants aux phénylamides en Allemagne en 1977, soit avant que le métalaxyl n'y soit utilisé. La résistance au méfenoxam/métalaxyl semble être due aux transporteurs à efflux, plus précisément aux transporteurs ABC (Childers et al. 2015, Leesutthiphonchai et al. 2018). De plus, certaines lignées clonales sont généralement plus sensibles que d'autres aux phénylamides (Larson et al. 2021), c'est le cas des souches US-23 (A1 mating type) retrouvées en Ontario dans le cadre du projet de Grappe agroscientifique. Le tableau 26 présente les mécanismes impliqués dans le développement de la résistance aux fongicides chez *P. infestans* en fonction des différents groupes.

Méthodes de détection de la résistance :

Les tableaux 27, 28 et 29 présentent les méthodes de détection par bioessais et génétiques de la résistance aux fongicides existantes pour *P. infestans*.

Tableau 27. Résistance aux fongicides chez *P. infestans*.

Familles de fongicides	Matières actives	Localisation	Mécanismes	Références
Phénylamides	Métalaxyl Méfénoxam	Canada (BC, ON, QC) États-Unis (WA) Inde Pays-Bas	Transports à efflux, mutations et autres mécanismes	CRAAQ 2011-2012 Peters 2022 Deahl et al. 1993 Goodwin et al. 1996 Arora et al. 1992 Thind et al. 2001 Kaur et al. 2010 Davidse et al. 1981 Dowley et O'Sullivan 1981
Amides de l'acide carboxylique	Mandipropamide	Danemark	Modification de la cible	Abuley et al. 2023
Découpleurs de la phosphorylation oxydative dans la chaîne respiratoire	Fluazinam	Pays-Bas	Detoxification (mécanisme suggéré, mais à confirmer)	Schepers et al. 2018

Tableau 28. Méthodes par bioessais de détection de la résistance aux fongicides chez *P. infestans*.

Type de bio essais	Familles de fongicides visées	Numéro de protocole FRAC	Références
Disques foliaires	Amides de l'acide carboxylique	PHYTIN in vivo method BASF 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-in-vivo-method-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=4a9a419a_4
		PHYTIN in vivo method Syngenta 2007 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-in-vivo-method-syngenta-2007-v1.pdf?sfvrsn=499a419a_4
Germination de spores	Amides de l'acide carboxylique	PHYTIN microtiter method sporangia BASF 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-microtiter-method-sporangia-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=479a419a_4

	Strobilurines	PHYTIN microtiter plate method DuPont 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-microtiter-plate-method-dupont-2006-v1.pdf?sfvrsn=459a419a_4
Croissance mycélienne	Amides de l'acide carboxylique	PHYTIN tissue culture plate method BASF 2006 V1	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-tissue-culture-plate-method-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=439a419a_4
Disques foliaires	Inhibiteurs de la protéine de liaison à l'oxystérol	PHYTIN Monitoring method OSBPI DuPont 2017	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-monitoring-method-osbpi-dupont-2017.pdf?sfvrsn=10ae489a_2

Tableau 29. Méthodes génétiques de détection de la résistance aux fongicides chez *P. infestans*.

Familles de fongicides	Mutations	Gènes impliqués	Références
Phénylamides	F382Y P980S V1476G	<i>RPA190</i>	Chen et al. 2018

Tache alternarienne.

Les organismes phytopathogènes du genre *Alternaria* causent des maladies foliaires dans différentes cultures comme les crucifères et la pomme de terre. Ils nécessitent l'utilisation de nombreuses applications de fongicides ce qui peut conduire à des cas de résistance.

État de la résistance au niveau mondial :

Dans la pomme de terre, une réduction de la sensibilité d'*Alternaria solani* et d'*Alternaria alternata* aux Qols a été observée en Europe (Nottensteiner et al. 2019). Les isolats d'*A. alternata* insensibles aux Qols étaient porteurs de la mutation G143A. Par contre, *A. solani* était plutôt porteur de la mutation F129L sur le même gène (Nottensteiner et al. 2019). D'autres résultats obtenus aux États-Unis, en Idaho, ont démontrés que 57% des isolats d'*A. solani* étaient résistants au boscalide, que 7% étaient résistants au penthiopyrad, que 15% étaient résistants au pyriméthanil et qu'en moyenne 63% des isolats étaient résistants aux strobilurines. Cependant, aucun des isolats n'était résistant au fluopyram ou à un mélange de fluopyram et de pyriméthanil (Fairchild et al. 2013). La résistance d'*A. solani* au boscalide a également été détectée dans les États du Dakota du Nord, du Minnesota, du Nebraska, du Texas, du Wisconsin et de la Floride à partir d'échantillons collectés en 2010 et 2011. Environ 80 % de tous les isolats d'*A. solani* testés se sont avérés présenter un certain niveau de

résistance au boscalide. Près de 99% de tous les isolats résistants au boscalide possédaient également la mutation F129L sur le gène du cytochrome b, ce qui indique qu'une population d'*A. solani* présentant une double résistance aux fongicides prédomine dans les états étudiés (Gudmestad et al. 2013). D'autres cas de résistance ont également été rapportés chez différents agents pathogènes suite à l'utilisation de fluodioxonil, un phénylpyrrole, c'est le cas pour *Alternaria brassicicola* dans les crucifères Iacomi-Vasilescu (2004).

Champignons soupçonnés de résistance au Québec

Les champignons et oomycètes listés dans cette section (tableau 30) sont des agents pathogènes présents au Québec et pour lesquels des soupçons de résistances aux fongicides ont été relevés pour donner suite à l'observation de baisses de performance des produits fongicides appliqués au champ. Ces agents pathogènes ont été regroupés en trois catégories selon l'existence ou non de protocoles de détection de la résistance aux fongicides.

Champignons et oomycètes avec protocoles établis :

Cette liste est basée sur l'existence de protocoles établis et validés par la FRAC.

Champignons et oomycètes avec protocoles à adapter :

Cette liste est basée sur l'existence de publications scientifiques détaillant des protocoles de détection de la résistance pour les espèces listées ou de l'existence de protocoles développés pour des espèces similaires et qui pourraient être adaptés aux espèces listées.

Champignons et oomycètes pour lesquels des protocoles sont à développer :

Cette liste regroupe les espèces pour lesquelles il n'existe pas ou peu de documentation sur les méthodes de détection de la résistance.

1
2

Tableau 30: Liste des champignons soupçonnés de résistance aux fongicides au Québec

Nom	Maladie	Cultures	Matières actives	Familles	Localisation de la résistance	Protocoles disponibles	Références et/ou Numéro de protocole FRAC
<i>Alternaria solani</i>	Brûlure hâtive	Pomme de terre	Azoxystrobine Boscalide Penthiopyrad Piriméthanil	QoIs SDHIs APs	États-Unis	Établis	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/alteso-monitoring-method-syngenta-2006-v1.pdf?sfvrsn=619a419a_4
<i>Botrytis allii</i>	Pourriture du col	Oignon	Carbendazim	MBCs	Nouvelle-Zélande	À adapter	Viljanen-Rollinson et al. 2007
<i>Bremia lactucae</i>	Mildiou	Laitue	Metalaxyl	PAs	Angleterre États-Unis Italie	À adapter	Crute et al. 1987 Schettini et al. 1991 Corbelli et al. 1998
<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	Oïdium	Brocoli	n.d.	n.d.	n.d.	À développer	n.d.
<i>Podosphaera aphanis</i>	Oïdium	Fraise	n.d.	QoIs	n.d.	À développer	Ishii et al. 2001
<i>Podosphaera xanthii</i>	Oïdium	Cucurbitacées	Azoxystrobine Krésoxim-méthyl	QoIs	Espagne États-Unis Japon	À adapter	Ishii et al. 2001
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Rouille	Soya	Azoxystrobine	QoIs	Brésil	Établis	https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phakpa-in-vitro-

				SDHIs	Brésil	À adapter	Mello et al. 2021
<i>Phytophthora spp.</i>	Pourridiées phytophthoréens	Petits fruits	Méfénoxam	PAs	États-Unis	À adapter	Marin et al. 2021
<i>Stemphylium vesicarium</i>	Brûlure stemphylienne	Oignon	Azoxystrobine Pyraclostrobine Boscalide Fluopyram Fluxapyroxad Difénoconazole Cyprodinil Piriméthanil Fludioxonil	Qols SDHIs DMIs APs Phenylpyrrole	Canada États-Unis	À adapter	Stricker et al. 2021 Hay et al. 2019

Bibliographie

- Abuley, I. K., Lynott, J. S., Hansen, J. G., Cooke, D. E., & Lees, A. K. (2023). The EU43 genotype of *Phytophthora infestans* displays resistance to mandipropamid. *Plant Pathology*, 72(7), 1305-1313.
- Acero, F. J. F., Carbú, M., El-Akhal, M. R., Garrido, C., González-Rodríguez, V. E., and Cantoral, J. M. 2011. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *Int J Mol Sci* 12:795-816.
- Adnan, M., Hamada, M.S., Hahn, M. et al. Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry to procymidone and zoxamide in Hubei, China. *Phytopathol Res* 1, 17 (2019). <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0024-8>
- Alberoni, G., Collina, M., Pancaldi, D., and Brunelli, A. 2005. Resistance to Dicarboximide Fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian Pear Orchards. *European Journal of Plant Pathology* 113:211-219.
- Albertini, C., and Leroux, P. 2004. A *Botrytis cinerea* Putative 3-keto Reductase Gene (ERG27) that is Homologous to the Mammalian 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 7 gene (17 β -HSD7). *European Journal of Plant Pathology* 110:723-733.
- Anonymous. 1988. Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPPO Bulletin* 18:569-574.
- Arora RK, Kamble SS, Gangawane LV. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in Nilgiri hills of Southern India. *Phytophthora Newsl.* 1992; 18:8-9.
- Avenot, H., Simoneau, P., Iacomí-Vasilescu, B., and Bataillé-Simoneau, N. 2005. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene AbNIK1 from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Current Genetics* 47:234-243.
- Avenot, H. F., and Michailides, T. J. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29:643-651.
- Avenot, H. F., and Michailides, T. J. 2015. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. *Crop Protection* 78:214-221.
- Avenot, H. F., and Michailides, T. J. 2019. Occurrence and Extent of Boscalid Resistance in Populations of *Alternaria alternata* from California Pistachio Orchards. *Plant Disease* 104:306-314.
- Ayer, K. M. 2019. Characterization of the VisdhC and VisdhD Genes in *Venturia inaequalis*, and Sensitivity to Fluxapyroxad, Pydiflumetofen, Inpyrfluxam, and Benzovindiflupyr. *Plant Disease* 103:1092.
- Baggio, J. S. 2018. Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole, and thiophanate-methyl. *Tropical Plant Pathology* 43:533.
- Bard, M., Bruner, D. A., Pierson, C. A., Lees, N. D., Biermann, B., Frye, L., Koegel, C., and Barbuch, R. 1996. Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:186-190.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58:649-662.
- Baudoin, A., Olaya, G., Delmotte, F., Colcol, J. F., & Sierotzki, H. (2008). QoI resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the mid-Atlantic United States. *Plant Health Progress*, 9(1), 25.
- Beever, R. E., Laracy, E. P., and Pak, H. A. 1989. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathology* 38:427-437.

- Beresford, R. M., Wright, P. J., Wood, P. N., & Agnew, R. H. (2016). Sensitivity of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) to demethylation inhibitor and quinone outside inhibitor fungicides in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 69, 1-10.
- Bernstein, B. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease* 79:478.
- Bertetti, D., Monchiero, M., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2020). Monitoring activities on fungicide resistance in *Botrytis cinerea* carried out in vineyards in North-West Italy in 2018. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 123-127.
- Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., and Debieu, D. 2012a. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science* 68:684-691.
- Billard, A., Laval, V., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., and Debieu, D. 2012b. The Allele-Specific Probe and Primer Amplification Assay, a New Real-Time PCR Method for Fine Quantification of Single-Nucleotide Polymorphisms in Pooled DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1063-1068.
- Blum, M., Waldner, M., Olaya, G., Cohen, Y., Gisi, U., & Sierotzki, H. (2011). Resistance mechanism to carboxylic acid amide fungicides in the cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Pest management science*, 67(10), 1211-1214.
- Blum M, Waldner M, Gisi U. A single point mutation in the novel *PvCesA3* gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genet Biol*. 2010 Jun;47(6):499-510. doi: 10.1016/j.fgb.2010.02.009. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20226261.
- Bollen, G.J., and Scholten, G. Acquired resistance to bonomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cylcamen. 1971 Ma; 77 : 83-90.
- Brent, K. J., and Hollomon, D. W. 2007a. Fungicide Resistance: The Assessment of Risk. Second edition ed. Fungicide Resistance Action Committee.
- Brent, K. J., and Hollomon, D. 2007b. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Fungicide Resistance Action Committee.
- Campia, P., Venturini, G., Moreno-Sanz, P., Casati, P. L. T. S., & Toffolatti, S. L. (2017). Genetic structure and fungicide sensitivity of *Botrytis cinerea* populations isolated from grapevine in northern Italy. *Plant pathology*, 66(6), 890-899.
- Campbell, S. E., Brannen, P. M., Scherm, H., and Brewer, M. T. 2020. Fungicide Sensitivity Survey of *Plasmopara viticola* Populations in Georgia Vineyards. *Plant Health Progress*:256-261.
- Campion, C., Chatot, C., Perraton, B., and Andrivon, D. 2003. Anastomosis Groups, Pathogenicity and Sensitivity to Fungicides of *Rhizoctonia solani* Isolates Collected on Potato Crops in France. *European Journal of Plant Pathology* 109:983-992.
- Capron, A., Stewart, D., Hrywkiw, K., Allen, K., Feau, N., Bilodeau, G., Tanguay, P., Cusson, M., and Hamelin, R. C. 2020. In Situ Processing and Efficient Environmental Detection (iSPEED) of tree pests and pathogens using point-of-use real-time PCR. *PLOS ONE* 15:e0226863.
- Carisse, O. (2016). Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 773-783.
- Carisse, O. 2002. A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection* 83:1.
- Carisse, O., and Pelletier, J. R. 1994. Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to fenarimol in Québec apple orchards. *Phytoprotection* 75:35-43.
- Carisse, O., and Bernier, J. 2002. Effect of environmental factors on growth, pycnidial production and spore germination of *Microsphaeropsis* isolates with biocontrol potential against apple scab. *Mycological Research* 106:1455-1462.

- Carisse, O., and Tremblay, D. M. 2007. Incidence and significance of iprodione-insensitive isolates of *Botrytis squamosa*. *Plant Disease* 91:41-46.
- Chapelaud, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M., and Leroux, P. 1999. Inheritance and Mechanisms of Resistance to Anilinopyrimidine Fungicides in *Botrytis Cinerea* (*Botryotinia Fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64:85-100.
- Chapman, K. S. 2011. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 95:921.
- Chen, F., Zhou, Q., Xi, J., Li, D. L., Schnabel, G., & Zhan, J. (2018). Analysis of RPA190 revealed multiple positively selected mutations associated with metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Pest management science*, 74(8), 1916-1924.
- Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C, Corio-Costet MF. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Aug;73(16):5162-72. Doi: 10.1128/AEM.00507-07. Epub 2007 Jun 22. PMID: 17586672; PMCID: PMC1950979.
- Cherrad, S.; Charnay, A.; Hernandez, C.; Steva, H.; Belbahri, L.; Vacher, S. Emergence of boscalid-resistant strains of *Erysiphe necator* in French vineyards. *Microbiol. Res.* 2018, 216, 79–84.
- Childers, R., Danies, G., Myers, K., Fei, Z., Small, I. M., and Fry, W. E. 2015. Acquired resistance to mefenoxam in sensitive isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 105:342-349.
- Chung, W. H. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Disease* 90:506.
- Cohen, Y., Van den Langenberg, K. M., Wehner, T. C., Ojiambo, P. S., Hausbeck, M., Quesada-Ocampo, L. M., ... & Gisi, U. (2015). Resurgence of *Pseudoperonospora cubensis*: The causal agent of cucurbit downy mildew. *Phytopathology*, 105(7), 998-1012.
- Colcol, J. F., Rallos, L. E., & Baudoin, A. B. (2012). Sensitivity of *Erysiphe necator* to demethylation inhibitor fungicides in Virginia. *Plant disease*, 96(1), 111-116.
- Crute, I. R., NORWOOD, J. M., & GORDON, P. L. (1987). The occurrence, characteristics and distribution in the United Kingdom of resistance to phenylamide fungicides in *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). *Plant Pathology*, 36(3), 297-315.
- Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., and Templeton, M. D. 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.
- Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., Weeds, P. L., and Templeton, M. D. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology* 36:187-198.
- Daggett, S. S., Götz, E., & Therrien, C. D. (1993). Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from eastern Germany. *PHYTOPATHOLOGY-NEW YORK AND BALTIMORE THEN ST PAUL*, 83, 319-319.
- Davidse LC, van den Berg-Velthuis GCM, Mantel BC, Jespers ABK. Phenylamides and *Phytophthora*. In *Phytophthora* (J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke, Eds.), British Mycological Society, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1991, 349–360.
- DEAN, R., VAN KAN, J.A.L., PRETORIUS, Z.A., HAMMOND-KOSACK, K.E., DI PIETRO, A., SPANU, P.D., RUDD, J.J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J. and FOSTER, G.D. (2012), The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- De Artur Teixeira, A., Jr., Longhi, P., Ritschel, P., Gava, R., Sanhueza, R. M. V., and Cox, K. 2015. Use of rflp-pcr method to detect kresoxim methyl-resistant *venturia inaequalis* isolates from the South of Brazil. *Summa Phytopathologica* 41:224-226.

- Debieu, D., and Leroux, P. 2015. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C-4 Demethylation. Pages 217-231 in: Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management. H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. Springer Japan, Tokyo.
- DeLong, J. A., Saito, S., Xiao, C. L., & Naegele, R. P. (2020). Population genetics and fungicide resistance of *Botrytis cinerea* on *Vitis* and *Prunus* spp. in California. *Phytopathology*, 110(3), 694-702.
- del Pino, D., Olalla, L., Cánovas, I., Cazorla, F. M., deVicente, A., and Torés, J. A. 1999. Resistance to fungicides of *Sphaerotheca fuliginea* strains isolated from southern Spain. Pages 42 in: Int. Powdery Mildew Conf., 1st, Avignon, France.
- Delye, C., Laigret, F., & Corio-Costet, M. F. (1997). A mutation in the 14 alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 2966-2970.
- Dowley, L. J., & O'sullivan, E. (1981). Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. *Potato research*, 24, 417-421.
- Dufour, M. C., Fontaine, S., Montarry, J., & Corio-Costet, M. F. (2011). Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science*, 67(1), 60-69.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural ecosystems—an introduction. Pages 1-8 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Erickson, E. O., & Wilcox, W. F. (1997). Distributions of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator* sensitive and resistant to triadimefon. *Phytopathology*, 87(8), 784-791.
- Esterio, M., Muñoz, G., Ramos, C., Cofré, G., Estévez, R., Salinas, A., and Auger, J. 2011. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the Central Valley of Chile. *Plant Disease* 95:683-690.
- Fairchild, K. L., Miles, T. D., and Wharton, P. S. 2013. Assessing fungicide resistance in populations of *Alternaria* in Idaho potato fields. *Crop Protection* 49:31-39.
- Fan, F., Yin, W. X., Li, G. Q., Lin, Y., and Luo, C. X. 2018. Development of a LAMP Method for Detecting SDHI Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 102:1612-1618.
- Fernández-Ortuño, D., Chen, F., and Schnabel, G. 2012. Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in the Carolinas. *Plant Disease* 96:1198-1203.
- Fernández Acero, F. J., Carbú, M., El-Akhal, M. R., Garrido, C., González-Rodríguez, V. E., & Cantoral, J. M. 2011. Development of Proteomics-Based Fungicides: New Strategies for Environmentally Friendly Control of Fungal Plant Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1): 795-816.
- Fiaccadori, R. 2018. In Vitro, in Vivo and in Field Sensitivity of *Venturia inaequalis* to Anilinopyrimidine Fungicides with Different Types of Scab Management and Degree of Control. *OALib* 05:1.
- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C., and Debieu, D. 2008. Genetic Analysis of Fenhexamid-Resistant Field Isolates of the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3933-3940.
- Forcelini, B. B. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Disease* 100:2050.
- Fournier, E., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., Giraud, T., and Brygoo, Y. 2003. Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* hch-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia* 95:251-261.
- Fraaije, B. A., Cools, H. J., Fountaine, J., Lovell, D. J., Motteram, J., West, J. S., and Lucas, J. A. 2005. Role of Ascospores in Further Spread of QoI-Resistant Cytochrome b Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*® 95:933-941.

- Freeman, S. 2008. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *HortScience* 43:66.
- Frenkel, O., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., & Milgroom, M. G. (2015). Mechanisms of resistance to an azole fungicide in the grapevine powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*. *Phytopathology*, 105(3), 370-377.
- Gachotte, D., Barbuch, R., Gaylor, J., Nickel, E., and Bard, M. 1998. Characterization of the Saccharomyces cerevisiae ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:13794.
- Gachotte, D., Sen, S. E., Eckstein, J., Barbuch, R., Krieger, M., Ray, B. D., and Bard, M. 1999. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12655-12660.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L. A. N. C. E., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*, 13(1), 1-16.
- Gama, A. B., Baggio, J. S., Rebello, C. S., Lourenco, S. D. A., Gasparoto, M. C. D. G., da Silva Junior, G. J., ... & Amorim, L. (2020). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from citrus to carbendazim, difenoconazole, tebuconazole, and trifloxystrobin. *Plant disease*, 104(6), 1621-1628.
- Gao, Y. 2018. Assessment of the baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum acutatum* to fludioxonil. *European Journal of Plant Pathology* 150:639.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58:859-867.
- Gobeil-Richard, M., Tremblay, D.-M., Beaulieu, C., Van der Heyden, H., and Carisse, O. 2016. A pyrosequencing-based method to quantify genetic substitutions associated with resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botrytis* spp. populations. *Pest Management Science* 72:566-573.
- Goodwin, S. B., Sujkowski, L. S., & Fry, W. E. (1996). Widespread distribution and probable origin of resistance to Metalaxyl in clonal genotypes. *Phytopathology*, 86, 793-800.
- Grabke, A., Fernandez-Ortuno, D., and Schnabel, G. 2012. Fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in the Carolinas is associated with four target gene mutations. *Plant Disease*.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X., Peres, N. A., Smith, P., and Schnabel, G. 2013. Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry. *Phytopathology*® 104:396-402.
- Graf, S. Characterisation of Metrafenone and Succinate Dehydrogenase Inhibitor Resistant Isolates of the Grapevine POWDERY Mildew *Erysiphe necator*. Ph.D. Thesis, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany, 2017.
- Grimmer, M. K., van den Bosch, F., Powers, S. J., and Paveley, N. D. 2014. Evaluation of a matrix to calculate fungicide resistance risk. *Pest Management Science* 70:1008-1016.
- Gudmestad, N. C., Arabiat, S., Miller, J. S., and Pasche, J. S. 2013. Prevalence and impact of SDHI fungicide resistance in *Alternaria solani*. *Plant Disease* 97:952-960.
- Gullino, M. L., Gilardi, G., Tinivella, F., & Garibaldi, A. (2004). Observations on the behaviour of different populations of *Plasmopara viticola* resistant to QoI fungicides in Italian vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(3), 341-350.
- Gullino, M. L., Leroux, P., and Smith, C. M. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19:1-11.

- Gur, L.; Levy, K.; Farber, A.; Frenkel, O.; Reuveni, M. Delayed Development of Resistance to QoI Fungicide in *Venturia inaequalis* in Israeli Apple Orchards and Improved Apple Scab Management Using Fungicide Mixtures. *Agronomy* 2021, 11, 396. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020396>
- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *J Chem Biol* 7:133-141.
- Hall BH et al., Fungicide Resistance in Australina Viticulture. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stamm G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 181-186. © 2017 Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978-3-941261-15-0
- Holmes, G. J., Ojiambo, P. S., Hausbeck, M. K., Quesada-Ocampo, L., & Keinath, A. P. (2015). Resurgence of cucurbit downy mildew in the United States: A watershed event for research and extension. *Plant Disease*, 99(4), 428-441.
- Holmes GJ, Main CE, Kever ZT, 2004. Cucurbit downy mildew: a unique pathosystem for disease forecasting. In: Spencer-Phillips PTN, Jeger M, eds. *Advances in Downy Mildew Research* (Vol. 2). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 69–80.
- Hu, X. R., Dai, D. J., Wang, H. D., and Zhang, C. Q. 2017. Rapid on-site evaluation of the development of resistance to quinone outside inhibitors in *Botrytis cinerea*. *Sci Rep* 7:13861-13861.
- Hulvey, J., Popko, J. T., Sang, H., Berg, A., and Jung, G. 2012. Overexpression of *ShCYP51B* and *ShatrD* in *Sclerotinia homoeocarpa* Isolates Exhibiting Practical Field Resistance to a Demethylation Inhibitor Fungicide. *Applied and Environmental Microbiology* 78:6674.
- Iacomini-Vasilescu, B. 2004. In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection* 23:481.
- Iacomini-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataillé-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., and Simoneau, P. 2004. In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection* 23:481-488.
- Ishii, H. 2016. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species. *Pest Management Science* 72:1844.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D. W. 2001. Occurrence and Molecular Characterization of Strobilurin Resistance in Cucumber Powdery Mildew and Downy Mildew. *Phytopathology*® 91:1166-1171.
- Jaklova, P. P. 2020. A real-time PCR quantitative analysis of the *Venturia inaequalis* cytb gene G143A mutation and its prevalence in the Czech Republic. *European Journal of Horticultural Science* 85:169.
- Jones GD. 1998. *The Epidemiology of Plant Diseases*. 3rd Edition. Kluwer Academic Publishes London, 1998, 371- 388.
- Kaur, R., Thind, T. S., & Goswami, S. (2010). Profiling of *Phytophthora infestans* populations for metalaxyl resistance and its management with novel action fungicides. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 40(1), 14.
- Kilani, J., and Fillinger, S. 2016. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Frontiers in microbiology* 7:2014-2014.
- Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Stability and Fitness of Pyraclostrobin- and Boscalid-Resistant Phenotypes in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Phytopathology* 101:1385-1391.

- Klappach, K.; Stammler, G.; Bryson, R.; Semar, M.; Mehl, A.; Steiger, D.; Derpmann, J.; Genet, J.-L.; MBoup, M.; Sierotzki, H.; et al. Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Working Group. 2021. Available online: <https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-fungicides/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2021-sdhi-meeting-20-21th-of-january-2021-with-recommendations-for-2021.pdf> (accessed on 20 April 2021)
- Klappach, K., and Stammler, G. 2019. CHAPTER 7: Resistance of Plant Pathogens to Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Fungicides (FRAC Code 7). Pages 85-95 in: Fungicide Resistance in North America, Second Edition. K. Klappach and G. Stammler, eds. The American Phytopathological Society.
- Köller, W., Wilcox, W. F., and Jones, A. L. 1999. Quantification, persistence, and status of dodine resistance in New York and Michigan orchard populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 83:66-70.
- Köller, W., Wilcox, W. F., Barnard, J., Jones, A. L., and Braun, P. G. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87:184-190.
- Kozhar, O., Larsen, M. M., Grünwald, N. J., and Peever, T. L. 2020. Fungal evolution in anthropogenic environments: *Botrytis cinerea* populations infecting small fruit hosts in the pacific northwest rapidly adapt to human-induced selection pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 86.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M. A., and Hahn, M. 2009. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog* 5:e1000696.
- Kuck, K-H (2005) Fungicide resistance management in a new regulatory environment. In: Modern fungicides and anti-fungal compounds IV. Dehne, H-W, Gisi, U, Kuck, K-H, Russell, P E and Lyr H eds. BCPC, Alton UK., 35-43.
- Larson, E. R., Migliano, L. E., Chen, Y., & Gevens, A. J. (2021). Mefenoxam Sensitivity in US-8 and US-23 *Phytophthora infestans* from Wisconsin. *Plant Health Progress*, 22(3), 272-280.
- Latorre, B. A., and Torres, R. 2012a. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection* 40:49-52.
- Latorre, B. A., and Torres, R. 2012b. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection* 40:49-52.
- Latorre, B. A., Spadaro, I., and Rioja, M. E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* 21:957-961.
- Lebeda, A., & Cohen, Y. (2012). Fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis*, the causal pathogen of cucurbit downy mildew. *Fungicide resistance in crop protection: risk and management*, 44-63.
- Leesutthiphonchai, W.; Vu, A.L.; Ah-Fong, A.M.V.; Judelson, H.S. How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology* 2018, 108, 916–924
- Leroch, M., Kretschmer, M., and Hahn, M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology* 159:63-65.
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., and Hahn, M. 2013. Gray mold populations in german strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and environmental microbiology* 79:159-167.
- Leroux, P., and Clerjeau, M. 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Protection* 4:137-160.

- Leroux, P., and Walker, A. S. 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 67:44-59.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18:687-697.
- Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A.-S. 2010. Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6615-6630.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58:876-888.
- Lew, R. R. 2010. Turgor and net ion flux responses to activation of the osmotic MAP kinase cascade by fludioxonil in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 47:721-726.
- Li, X., Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., & Schnabel, G. (2014). Resistance to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology*, 104(7), 724-732.
- Liang, H., Li, J., Luo, C., Li, J., and Zhu, F.-X. 2019. Effects of SHAM on the Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to QoI Fungicides. *Plant Disease* 103:1884-1888.
- Link, T. A., Iwata, M., Björkman, J., van der Spoel, D., Stocker, A., and Iwata, S. 2003.
- Luo, C.-X., and Schnabel, G. 2008. The Cytochrome P450 Lanosterol 14 α -Demethylase Gene Is a Demethylation Inhibitor Fungicide Resistance Determinant in *Monilinia fructicola* Field Isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* 74:359.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.
- Ma, Z., Luo, Y., and Michailides, T. 2006a. Molecular characterization of the two-component histidine kinase gene from *Monilinia fructicola*. *Pest Management Science* 62:991-998.
- Ma, Z., Proffer, T. J., Jacobs, J. L., and Sundin, G. W. 2006b. Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and environmental microbiology* 72:2581-2585.
- Mair, W., Lopez-Ruiz, F., Stammler, G., Clark, W., Burnett, F., Hollomon, D., Ishii, H., Thind, T. S., Brown, J. K. M., Fraaije, B., Cools, H., Shaw, M., Fillinger, S., Walker, A.-S., Mellado, E., Schnabel, G., Mehl, A., and Oliver, R. P. 2016. Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. *Pest Management Science* 72:1449-1459.
- Malandrakis, A., Markoglou, A., and Ziogas, B. 2011. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:118-124.
- Malandrakis, A. A., Apostolidou, Z. A., Markoglou, A., and Flouri, F. 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *European Journal of Plant Pathology* 142:489-499.
- Masner, P., Muster, P., and Schmid, J. 1994. Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pesticide Science* 42:163-166.
- Mehl, A., Schmitz, H., Stenzel, K., and Bloomberg, J. 2019. CHAPTER 5: DMI Fungicides (FRAC Code 3): Sensitivity Status of Key Target Pathogens, Field Versus Laboratory Resistance, and Resistance Mechanisms. Pages 51-68 in: *Fungicide Resistance in North America, Second Edition*. A. Mehl, H. Schmitz, K. Stenzel and J. Bloomberg, eds. The American Phytopathological Society.

- Mosbach, A., Edel, D., Farmer, A. D., Widdison, S., Barchietto, T., Dietrich, R. A., Corran, A., and Scalliet, G. 2017. Anilinopyrimidine Resistance in *Botrytis cinerea* Is Linked to Mitochondrial Function. *Frontiers in microbiology* 8:2361-2361.
- Moyano, C., Gómez, V., and Melgarejo, P. 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology* 152:484-490.
- Myresiotis, C. K., Bardas, G. A., and Karaoglanidis, G. S. 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.
- Noel, Z. A., Wang, J., and Chilvers, M. I. 2017. Significant Influence of EC50 Estimation by Model Choice and EC50 Type. *Plant Disease* 102:708-714.
- Northover, J.; Homeyer, C.A. Detection and management of myclobutanil-resistant grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) in Ontario. *Can. J. Plant Pathol.* 2001, 23, 337–345
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28:E63.
- Nottensteiner, M., Absmeier, C., and Zellner, M. 2019. QoI Fungicide Resistance Mutations in *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* are Fully Established in Potato Growing Areas in Bavaria and Dual Resistance against SDHI Fungicides is Upcoming. *Gesunde Pflanzen* 71:155-164.
- Obuya, J. O., and Franc, G. D. 2016. Molecular analysis of *Cercospora beticola* isolates for strobilurin resistance from the Central High Plains, USA. *European Journal of Plant Pathology* 146:817-827.
- Olanya OM, Adipala E, Hakiza JJ, Kedera JC, Ojiambo P, Mukalazi JM et al. Epidemiology and population dynamics of *Phytophthora infestans* in Sub-Saharan Africa: Progress and Constraints. *African Crop Science Journal*. 2001; 9:181-193.
- Olaya, G., and Geddens, R. 2019. CHAPTER 3: The Methyl Benzimidazole Carbamate Fungicides (FRAC Code 1). Pages 29-40 in: *Fungicide Resistance in North America, Second Edition*. G. Olaya and R. Geddens, eds. The American Phytopathological Society.
- Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., and Yamaguchi, I. 2002. A Point Mutation in the Two-Component Histidine Kinase BcOS-1 Gene Confers Dicarboximide Resistance in Field Isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92:75-80.
- Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene *BcOS1* in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* 72:65-73.
- Parker, J. E., Warrilow, A. G. S., Cools, H. J., Martel, C. M., Nes, W. D., Fraaije, B. A., Lucas, J. A., Kelly, D. E., and Kelly, S. L. 2011. Mechanism of Binding of Prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola*; CYP51 Differs from That of Other Azole Antifungals. *Applied and Environmental Microbiology* 77:1460.
- Pasche, J. S., and Gudmestad, N. C. 2019. CHAPTER 13: Laboratory Methods for Evaluating Fungicide Resistance In Vitro. Pages 161-173 in: *Fungicide Resistance in North America, Second Edition*. J. S. Pasche and N. C. Gudmestad, eds. The American Phytopathological Society.
- Pasche, J. S., Wharam, C. M., and Gudmestad, N. C. 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. *Plant Disease* 88:181-187.
- Pasche, J. S., Piche, L. M., and Gudmestad, N. C. 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Disease* 89:269-278.
- Pavelková, J., Lebeda, A., & Sedláková, B. (2014). Efficacy of fosetyl-Al, propamocarb, dimethomorph, cymoxanil, metalaxyl and metalaxyl-M in Czech *Pseudoperonospora cubensis* populations during the years 2005 through 2010. *Crop Protection*, 60, 9-19.

- Peres, N. A. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89:784.
- Peters, R. 2022. Late Blight (potatoresearchcluster.ca) Progress report.
- Pierce, A. M., Pierce, H. D., Jr., Unrau, A. M., and Oehlschlager, A. C. 1978. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. *Can J Biochem* 56:135-142.
- Pommer, E. H., and Lorenz, G. 1982. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides -- a literature review. *Crop Protection* 1:221-230.
- Poulin-Ouellette, M. (2023). *RÉSISTANCE AUX FONGICIDES, AGRESSIVITÉ ET AGENTS CAUSAUX : IMPLICATIONS POUR LA GESTION DE LA MALADIE DE LA BRÛLURE DE LA FEUILLE DE L'OIGNON* [Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke].
- Presley et Maude 1980. Control of *Botrytis cinerea* and *Botrytis squamosa* in overwintered salad onion by fungicides sprays. *Ann. Appl. Biol.* 94:197-204.
- Radhakrishnan, G. V., Cook, N. M., Bueno-Sancho, V., Lewis, C. M., Persoons, A., Mitiku, A. D., Heaton, M., Davey, P. E., Abeyo, B., Alemayehu, Y., Badebo, A., Barnett, M., Bryant, R., Chatelain, J., Chen, X., Dong, S., Henriksson, T., Holdgate, S., Justesen, A. F., Kalous, J., Kang, Z., Laczny, S., Legoff, J.-P., Lesch, D., Richards, T., Randhawa, H. S., Thach, T., Wang, M., Hovmøller, M. S., Hodson, D. P., and Saunders, D. G. O. 2019. MARPLE, a point-of-care, strain-level disease diagnostics and surveillance tool for complex fungal pathogens. *BMC Biology* 17:65.
- Reuveni, M., Eyal, H., & Cohen, Y. (1980). Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Disease*, 64(12), 1108-1109.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., and Gerhard, D. 2016. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE* 10:e0146021.
- Rosenzweig, N., Hanson, L. E., Clark, G., Franc, G. D., Stump, W. L., Jiang, Q. W., Stewart, J., and Kirk, W. W. 2015. Use of PCR-RFLP analysis to monitor fungicide resistance in *cercospora beticola* populations from sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. *Plant Disease* 99:355-362.
- Rupp, S., Plesken, C., Rumsey, S., Dowling, M., Schnabel, G., Weber, R. W. S., and Hahn, M. 2017. *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*, a New Species Causing Gray Mold on Strawberries, Shows High Frequencies of Specific and Efflux-Based Fungicide Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 83:e00269-00217.
- Russell P. E. (2004). Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. FRAC Monograph No. 3 Brussels: CropLife International.
- Saito, Seiya, Suzuki, Shunji, Takayanagi, and Tsutomu. 2009. Nested PCR-RFLP is a high-speed method to detect fungicide-resistant *Botrytis cinerea* at an early growth stage of grapes. Wiley, Chichester, ROYAUME-UNI.
- Samuel, S., Papayiannis, L. C., Leroch, M., Veloukas, T., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. 2011. Evaluation of the incidence of the G143A mutation and cytb intron presence in the cytochrome bc-1 gene conferring Qol resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. *Pest Management Science* 67:1029-1036.
- Santos, R. F., Ciampi-Guillardi, M., Fraaije, B. A., de Oliveira, A. A., and Amorim, L. 2020a. The Climate-Driven Genetic Diversity Has a Higher Impact on the Population Structure of *Plasmopara viticola* Than the Production System or Qol Fungicide Sensitivity in Subtropical Brazil. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Santos, R. F., Fraaije, B. A., Garrido, L. d. R., Monteiro-Vitorello, C. B., and Amorim, L. 2020b. Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to Qol and CAA fungicides in Brazil. *Plant Pathology* n/a.
- Schettini, T. M., Legg, E. J., & Michelmore, R. W. (1991). Insensitivity to metalaxyl in California populations of *Bremia lactucae* and resistance of California lettuce cultivars to downy mildew. *Phytopathology*, 81(1), 64-70.

- Schnabel, G., and Jones, A. L. 2001. The 14 α -Demethylase(CYP51A1) Gene is Overexpressed in *Venturia inaequalis* Strains Resistant to Myclobutanil. *Phytopathology*® 91:102-110.
- Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., and De Waard, M. A. 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.
- Sierotzki, H., and Scalliet, G. 2013. A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *Phytopathology*® 103:880-887.
- Sierotzki, H., and Stammler, G. 2019. CHAPTER 8: Resistance of Plant Pathogens to QoI Fungicides (FRAC Code 11). Pages 97-113 in: *Fungicide Resistance in North America, Second Edition*. H. Sierotzki and G. Stammler, eds. The American Phytopathological Society.
- Sierotzki, H., Mehl, A., and Stammler, G. 2019. CHAPTER 14: Molecular Detection Methods for Fungicide Resistance. Pages 175-193 in: *Fungicide Resistance in North America, Second Edition*. H. Sierotzki, A. Mehl and G. Stammler, eds. The American Phytopathological Society.
- Sierotzki, H., Blum, M., Olaya, G., Waldner-Zulauf, M., Buitrago, C., Wullschleger, J., et al. 2011. Sensitivity to CAA fungicides and frequency of mutations in cellulose synthase (CesA3) gene of oomycete pathogen populations. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. 6:103–110
- Szkolnik, M., and Gilpatrick, J. D. 1969. Apparent resistance of *Venturia inaequalis* to dodine in New York apple orchards. *Plant Dis. Rep.* 53:861-864.
- Stammler, G., and Speakman, J. 2006. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 154:508-510.
- Stevenson, K. L., McGrath, M. T., and Wyenandt, C. A. 2019. *Fungicide Resistance in North America, Second Edition*. The American Phytopathological Society.
- Thind TS, Singh L, Mohan C, Paul J. Monitoring for metalaxyl resistance in populations of *Phytophthora infestans* and their characteristics in Punjab. *Indian Phytopath.* 2001; 54(1):91-97.
- Tremblay, D. M., Talbot, B. G., and Carisse, O. 2003. Sensitivity of *Botrytis squamosa* to different classes of fungicides. *Plant Disease* 87:573-578.
- Urban, J., & Lebeda, A. (2007). Variation of fungicide resistance in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Phytopathology*, 155(3), 143-151.
- Van der Heyden, H. and Carisse, O. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to boscalid, cyprodinil and fludioxonil, and frequency of resistant isolates in commercial fields in Quebec. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2012, Sept; 34 (3) 421-435.
- Van der Heyden, H., Dutilleul, P., Brodeur, L., and Carisse, O. 2014. Spatial Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms Related to Fungicide Resistance and Implications for Sampling. *Phytopathology* 104:604-613.
- Veloukas T, Kalogeropoulou P, Markoglou AN, Karaoglanidis GS. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. *Phytopathology*. 2014 Apr;104(4):347-56. doi: 10.1094/PHYTO-07-13-0208-R. PMID: 24168041.
- Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. 2012. Differential Effect of *SdhB* Gene Mutations on the Sensitivity to SDHI Fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 97:118-122.
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. 2011. Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. *Plant Disease* 95:1302-1307.
- Vielba-Fernández A, Bellón-Gómez D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D. Heteroplasmy for the Cytochrome b Gene in *Podosphaera xanthii* and its Role in Resistance to QoI Fungicides in Spain. *Plant Dis.* 2018 Aug;102(8):1599-1605. doi: 10.1094/PDIS-12-17-1987-RE. Epub 2018 Jul 3. PMID: 30673427.

- Vijaya Palani, P., and Lalithakumari, D. 1999. Resistance of *Venturia inaequalis* to the sterol biosynthesis-inhibiting fungicide, penconazole [1-(2-(2,4-dichlorophenyl) pentyl)-1H-1,2,4-triazole]. *Mycological Research* 103:1157-1164.
- Viljanen-Rolinson, S. L. H., Maroni, M. V., & Butler, R. C. (2007). Reduced sensitivity to carbendazim in isolates of *Botrytis allii*. *New Zealand Plant Protection*, 60, 108-113.
- Villani, S. M. 2016. Molecular characterization of the *sdhB* gene and baseline sensitivity to penthiopyrad, fluopyram, and benzovindiflupyr in *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 100:1709.
- Walker, A.-S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M., and Leroux, P. 2013. French vineyards provide information which opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science*:n/a-n/a.
- Walker, A. S., Gautier, A. L., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le, P. C. P., Dupont, J., and Fournier, E. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433-1445.
- Walsh, R. C., and Sisler, H. D. 1982. A mutant of *Ustilago maydis* deficient in sterol C-14 demethylation: Characteristics and sensitivity to inhibitors of ergosterol biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 18:122-131.
- Wang, J., Bradley, C. A., Stenzel, O., Pedersen, D. K., Reuter-Carlson, U., and Chilvers, M. I. 2016. Baseline Sensitivity of *Fusarium virguliforme* to Fluopyram Fungicide. *Plant Disease* 101:576-582.
- Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Molecular Characterization of Boscalid Resistance in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Phytopathology* 101:986-995.
- Zhang H, Kong F, Wang X, Liang L, Schoen CD, Feng J, Wang Z. Tetra-primer ARMS PCR for rapid detection and characterisation of *Plasmopara viticola* phenotypes resistant to carboxylic acid amide fungicides. *Pest Manag Sci.* 2017 Aug;73(8):1655-1660. doi: 10.1002/ps.4506. Epub 2017 Feb 3. PMID: 27990754.
- Zhou, T., and Mehl, H. L. 2020. Rapid quantification of the G143A mutation conferring fungicide resistance in Virginia populations of *Cercospora soja* using pyrosequencing. *Crop Protection* 127:104942.
- Zhu, S. S., Liu, X. L., Wang, Y., Wu, X. H., Liu, P. F., Li, J. Q., ... & Si, N. G. (2007). Resistance of *Pseudoperonospora cubensis* to flumorph on cucumber in plastic houses. *Plant Pathology*, 56(6), 967-975.
- Ziogas, B. N., and Malandrakis, A. A. 2015. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). Pages 199-216 in: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. Springer Japan, Tokyo.
- Ziogas, B., Nikou, D., N Markoglou, A., A Malandrakis, A., and Vontas, J. 2009. Identification of a novel point mutation in the β -tubulin gene of *Botrytis cinerea* and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay. *European Journal of Plant Pathology* 125:97-107.