



# tester

Tavelure sur feuille (ph. SRPV Rhône-Alpes)

# Tavelure du pommier sa résistance aux strobilurines en France

## Tests biologiques et moléculaires 2004- 2006

Florent Remuson<sup>(\*)</sup>, Séverine Fontaine<sup>(\*)</sup>, Annie Micoud<sup>\*</sup>, Laurence Fraissinet-Tachet<sup>\*\*</sup>, Roland Marmeisse<sup>\*\*</sup> et Delphine Melayah<sup>\*\*</sup>

**Il y a en France de la tavelure du pommier résistante aux strobilurines — ou plutôt des souches de *Venturia inaequalis*, agent de la maladie, résistantes à cette famille de fongicides. Mais quelle est l'importance du phénomène, quels sont ses mécanismes ? Le savoir permet de mieux gérer la lutte contre cette maladie. Pour cela, une surveillance est réalisée avec des analyses mises en œuvre par le laboratoire de la Protection des Végétaux de Rhône-Alpes. Nous présentons ici les résultats de trois années de travail sur des échantillons issus de plus de 250 vergers, comparant trois techniques d'analyse. L'une, biologique, détecte tous les types de résistance mais elle est délicate. Les deux autres, moléculaires et rapides, mises au point en collaboration avec l'Université Lyon 1, ne détectent qu'un seul type de résistance. Explications.**

Dans la lutte chimique contre la tavelure, il est essentiel de savoir si l'agent de la maladie présente une résistance à certains des fongicides utilisés. D'où la surveillance évoquée dans cet article.

**L**a tavelure du pommier provoquée par le champignon Ascomycète *Venturia inaequalis* (Cooke) a un impact économique important en arboriculture et reste la maladie la plus répandue sur pommier. La lutte contre ce champignon, outre des mesures prophylactiques et agronomiques, utilise des fongicides parmi lesquels des strobilurines. Ces molécules du groupe des QoI bloquent la chaîne respiratoire en interagissant avec le centre d'oxydation du cytochrome b du complexe III (Leroux et Delorme, 1997). Les premières utilisations de strobilurines sur la tavelure remontent au printemps 1998 et en 2002 des pertes d'efficacité de ces fongicides ont été constatées en France.

Le laboratoire de la Protection des végétaux de Rhône-Alpes est chargé de la surveillance et du suivi de l'apparition de résistances aux fongicides chez *V. inaequalis*. Jusqu'à présent, cette surveillance a été réalisée par des tests biologiques de germination de spores *in vitro* sur des milieux amendés en fongicides. Mais le pouvoir germinatif des spores issues des échantillons prélevés dans les vergers est aléatoire.

Pour s'affranchir de cette difficulté, il est apparu intéressant de développer des techniques moléculaires de détection des mutations de résistance à ces fongicides. Dans le cas des strobilurines, cette résistance semble principalement induite par une mutation de cible qui se traduit par un changement de glycine en alanine de l'acide aminé en position 143 (G143A) au niveau du cytochrome b.

Cet article présente une synthèse des analyses de résistance aux strobilurines chez la tavelure



Ph. D. R.

du pommier. Ce bilan a été dressé à partir de tests biologiques et moléculaires (PCR-RFLP, PCR allèle spécifique) sur des échantillons prélevés de 2004 à 2006 dans différentes régions de production françaises.

## Procédures expérimentales

### Origine des échantillons

Les échantillons ont été prélevés dans des vergers commerciaux situés dans les principaux bassins de production français. Dans tous ces vergers, malgré des programmes de traitements anti-tavelure adaptés, le parasite n'a pas été correctement maîtrisé, d'où l'hypothèse de l'apparition d'une résistance vis-à-vis des substances actives utilisées, notamment des strobilurines. Dans chaque verger, de 30 à 50 feuilles portant de jeunes taches sporulantes de tavelure ont été récoltées en différents points des parcelles au printemps, en été ou en automne.

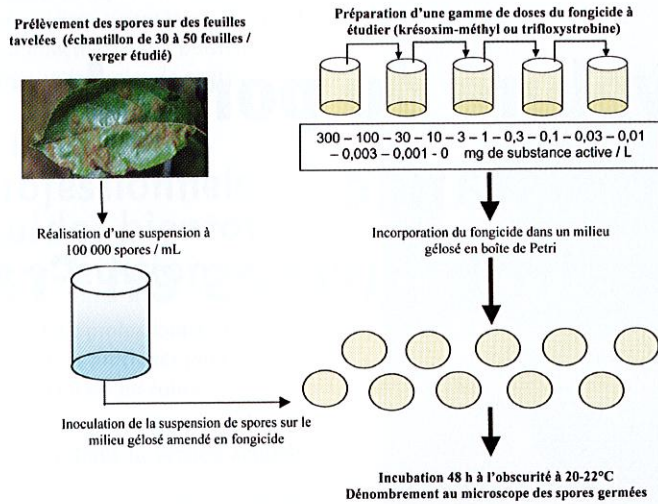
Pour comparaison, des isolats de *V. inaequalis* issus de vergers non traités par des fongicides et éloignés de vergers commerciaux ont été utilisés comme références sensibles aux fongicides.

<sup>\*</sup> Service Régional de la Protection des Végétaux Rhône-Alpes ; <sup>(1)</sup> FREDON Rhône-Alpes.

<sup>\*\*</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS, USC INRA d'écologie microbienne.



Figure 1 - Protocole des tests in vitro en germination de spores.



Test biologique

Le test biologique consiste en un test de germination de spores *in vitro* sur milieux gélosés contenant différentes concentrations de fongicide, entre 0,001 et 300 mg/l (Figure 1). Les spores sont prélevées directement sur les lésions présentes sur les feuilles prélevées. Pour chaque substance active, les « concentrations d'inhibition » à 50 % (CI 50) et les

« concentrations minimales d'inhibition » (CMI) ont été déterminées graphiquement à partir des courbes représentant le pourcentage de germination par rapport au témoin, en fonction du logarithme (log<sub>10</sub>) des concentrations testées. Le rapport entre la CI 50 ainsi estimée et la moyenne des CI 50 des vergers sensibles de référence a permis de calculer le « facteur de résistance » (FR) de chaque population étudiée.

Tests moléculaires

Pour chaque verger étudié, la présence de la mutation G143A responsable de la résistance aux strobilurines a été recherchée par PCR. Chaque amplification PCR a été réalisée à partir de l'ADN extrait de 30 lésions de tavelure. Ces 30 rondelles de feuilles tavelées ont été broyées. Les extractions d'ADN ont été effectuées à l'aide du kit commercial Nucleospin Plant (Macherey-Nagel).

Deux types de techniques de détection de la mutation G143A ont été mises en œuvre. L'une fait appel à une PCR-RFLP (polymérisation en chaîne couplée à une analyse de polymorphisme de fragments de restriction), l'autre à une PCR allèle spécifique (AS-PCR).

Ces techniques sont décrites dans l'encadré ci-dessous.

Nombre de tests réalisés

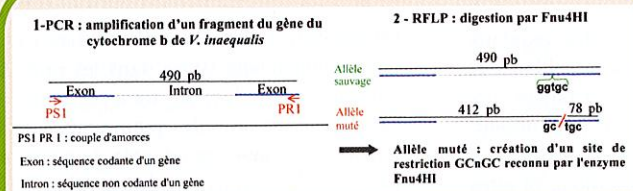
De 2004 à 2006, 256 vergers commerciaux situés dans 15 régions françaises ont fait l'objet de prélèvements pour analyse de la résistance aux strobilurines.

Certains de ces vergers ont été suivis sur plusieurs années. Les échantillons ont été analysés soit par test biologique (19 vergers), soit par test moléculaire uniquement (196 échantillons en PCR-RFLP ou AS-PCR), soit par les deux méthodes (66 vergers).

Description des deux techniques moléculaires utilisées

La technique dite PCR-RFLP consiste à amplifier par PCR une portion du gène du cytochrome b contenant en son sein le site de la mutation G143A (figure 2). Ce site muté est spécifiquement reconnu par l'enzyme de restriction Fnu4HI. Cette enzyme clive en deux fragments le produit d'amplification par PCR du gène muté, ce qui permet de discriminer l'allèle de résistance par rapport à l'allèle sauvage sensible aux strobilurines qui n'est pas clivé. Les produits de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose puis visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium (Figure 3).

Figure 2 - Technique PCR-RFLP pour détecter la mutation G143A.



La technique PCR allèle spécifique (AS-PCR) consiste à amplifier par PCR une portion du gène du cytochrome b uniquement si la mutation G143A est présente (Figure 4). Cette amplification est réalisée avec un couple d'amorces dont l'une est spécifique de la séquence mutée. Cette dernière se termine en 3' sur la base mutée et ne reconnaît donc pas la séquence de l'allèle sensible. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % puis visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium (Figure 5).

Figure 4 - Technique PCR-allèle spécifique pour détecter la mutation G143A.

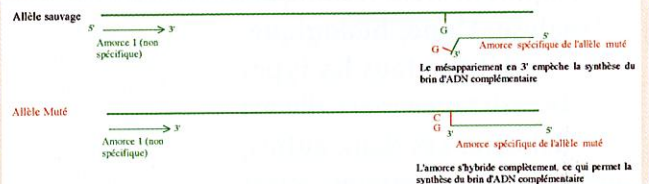


Figure 3 - Profils de digestion des échantillons analysés PCR-RFLP.

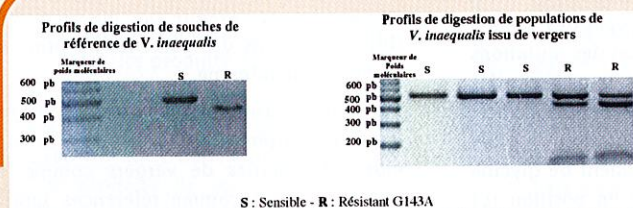
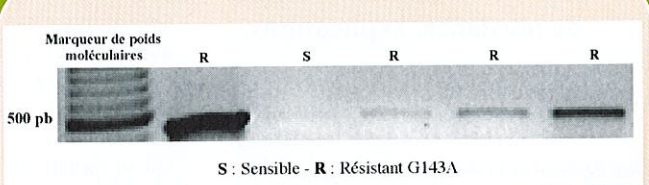


Figure 5 - Électrophorèse en gel d'agarose des échantillons analysés par PCR-allèle spécifique.





## Bilan du test biologique et limites

### Dans les 7 vergers sensibles de référence

Les données obtenues par test biologique montrent que les populations de tavelure des vergers de référence paraissent assez homogènes quant à leur sensibilité au krésoxim-méthyl (Tableau 1). En effet, les paramètres de sensibilité estimés (CI 50 et CMI) sont très cohérents aussi bien entre les différents vergers que pour un même verger au cours du temps (cas des vergers FRB et VB analysés en 2004 et 2005 et de FRM et FRV en 2005 et 2006).

Par ailleurs, pour les échantillons issus de 4 vergers testés à la fois pour leur sensibilité au krésoxim-méthyl et à la trifloxystrobine, des sensibilités similaires à ces deux strobilurines ont été visualisées.

Ces résultats sont également en accord avec les données relevées dans la littérature, en tests *in vitro* sur souches sensibles (Färber Küng *et al.*, 2002 ; Olaya *et al.*, 1998 ; Steinfield *et al.*, 2002 ; Fiaccadori *et al.*, 2005). Ces éléments nous ont conduit à considérer les valeurs moyennes de CI 50 et de CMI obtenues comme des valeurs de référence pour l'interprétation des analyses sur les vergers commerciaux.

### Pour les vergers commerciaux

Les taux de germination des spores issues des vergers commerciaux sur milieu témoin sans fongicide sont très variables et généralement faibles.

Ainsi, à l'instar des vergers sensibles de référence, seuls 85 prélèvements (30 %), sur les 291 reçus de 2004 à 2006, ont montré des taux de germination supérieurs ou égaux à 10 % (32 en 2004, 32 en 2005 et 21 en 2006), donnant lieu à un résultat considéré comme interprétable.

Tous les échantillons de 2005 et 2006 analysés par test biologique ont également été soumis à une PCR. En revanche, une partie des échan-

Tableau 1 - CI 50 et CMI des souches sensibles de *Venturia inaequalis*.

Vergers	Dép'	Année	% G. témoin	Krésoxim-méthyl		Trifloxystrobine		
				CI 50	CMI	CI 50	CMI	
Verger AM	Isère	2004	42 %	0,004	0,01	Pas d'analyse		
Verger CB	Ain	2004	20 %	0,005	0,03	Pas d'analyse		
Verger DB3	Rhône	2004	48 %	0,004	0,01	Pas d'analyse		
Verger FRB	Loire	2004	15 %	0,006	0,01	Pas d'analyse		
		2005	10 %	0,006	0,03	0,0041	0,01	
Verger VB	Rhône	2004	76 %	0,0035	0,01	Pas d'analyse		
		2005	28 %	0,0024	0,03	0,002	0,01	
Verger FRM	Loire	2005	12 %	0,0026	0,01	0,002	0,01	
		2006	13 %	0,0026	0,01	Pas d'analyse		
Verger FRV	Loire	2005	10 %	0,0014	0,01	0,002	0,01	
		2006	10 %	0,003	0,01	Pas d'analyse		
				moyenne	0,004	0,003		
				min-max	0,0014-0,006	0,01-0,03	0,002-0,004	0,01

Légende : % G. témoin = % de germination de l'échantillon sur milieu eau-agar sans fongicide.

Tableau 2 - Parcelles résistantes analysées en 2004 par test biologique uniquement.

Régions	Départements	FR	% de germination à la dose de 10x CMI pop. sensibles de krésoxim-méthyl (0,3 mg/l)
Rhône-Alpes	Isère	>60 000	83 %
Midi-Pyrénées	Tarn-et-Garonne	1 377	100 %
		1 067	73 %
		889	80 %
		33	29 %
		10	12 %
Alsace	Bas-Rhin	13	0 % (7% à 0,1 mg/l)
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	Bouches-du-Rhône	13	20 %

tillons de 2004 a été analysée uniquement par test biologique (19). Dans le tableau 2, sont répertoriés les 8 échantillons qui ont été considérés comme résistants (Facteur de résistance  $\geq 10$ ). Ces populations montrent des facteurs de résistance très variables (de 10 à plus de 60 000), valeurs en cohérence avec les pourcentages de spores capables de germer à 0,3 mg/l de krésoxim-méthyl, soit 10 fois la CMI des populations sensibles.

## Bilan des tests moléculaires et limites

À la différence du test biologique, la détection moléculaire de la mutation de cible G143A a pu être mise en œuvre sur tous les échantillons testés, que ceux-ci aient produit des spores viables ou non. Comme attendu, la mutation

**Accompagner**  
une arboriculture durable

**Apporter**  
des solutions sûres et rentables

**Maîtriser**  
les effets sur l'environnement

**L'éco-contribution**  
c'est dans la nature d'UNIMED arbo

**Expert PHYTOBAC**

**unimed ARBO**  
La culture du progrès

**UNIMED ARBO : Tél. 06 15 01 22 71**  
92, rue Joseph Vernet • 84025 AVIGNON Cedex 1

**copal**  
LA PERFORMANCE AGRICOLE

**VALSÉRIE**  
Energy in the city

**cop**  
Coopérative Agricole de Provence

**La Centrale**

**Le Centre de Recherche Agronomique de MAGNAN**

PHYTOMA • La Défense des Végétaux  
N°605 Juin 2007



Tableau 3 - Parcelles avec des résultats divergents en 2005, réévaluées en 2006.

Régions	Départem.	Analyses 2005		Analyses 2006	
		Tests Biologiques	PCR-RFLP	Tests Biologiques	PCR Allèle Spécifique
Aquitaine	Gironde	FR krésoxim-méthyl = 1 FR trifloxystrobine = 21	Sensible	FR krésoxim-méthyl = 1 (5% de germination à 0,3 mg/l)	Sensible
Lorraine	Moselle	FR krésoxim-méthyl = 133 FR trifloxystrobine = 43	Sensible	FR krésoxim-méthyl = 152	Résistant
Midi-Pyrénées	Tarn-et-Garonne	FR krésoxim-méthyl = 13 800 FR trifloxystrobine = 27 600	Sensible	inexploitable	Sensible
	Haute-Garonne	FR krésoxim-méthyl = 3 FR trifloxystrobine = 238	Sensible	inexploitable	Résistant
Pays de Loire	Loire-Atlantique	FR krésoxim-méthyl = 49 FR trifloxystrobine = 20	Sensible	inexploitable	Sensible
	Maine-et-Loire	FR krésoxim-méthyl = 29 FR trifloxystrobine = 2	Sensible	inexploitable	Sensible

n'a pu être décelée dans aucun des vergers sensibles de référence, tandis que celle-ci est présente dans de nombreux vergers commerciaux analysés. La majeure partie des échantillons pour lesquels la résistance a été détectée provient de vergers situés en Midi-Pyrénées (21 sur 31) et en Rhône-Alpes (5 sur 31), les autres provenant de Lorraine (4) et de PACA (1). Des analyses comparatives ont permis de souligner une nette évolution du paysage français de la résistance aux strobilurines.

En effet, en 2004, des niveaux de résistance *in vitro* élevés couplés à la détection de la mutation ont été relevés dans trois régions : Midi-Pyrénées, Provence-Alpes-Côte-d'Azur et Rhône-Alpes.

En 2005, cinq régions se sont trouvées concernées par cette résistance, dont 3 nouvelles : l'Alsace, l'Aquitaine et la Lorraine, tandis que l'existence de cette résistance se confirmait en Midi-Pyrénées et en Rhône-Alpes. Pour 2006 enfin, la mutation a été retrouvée en Aquitaine,

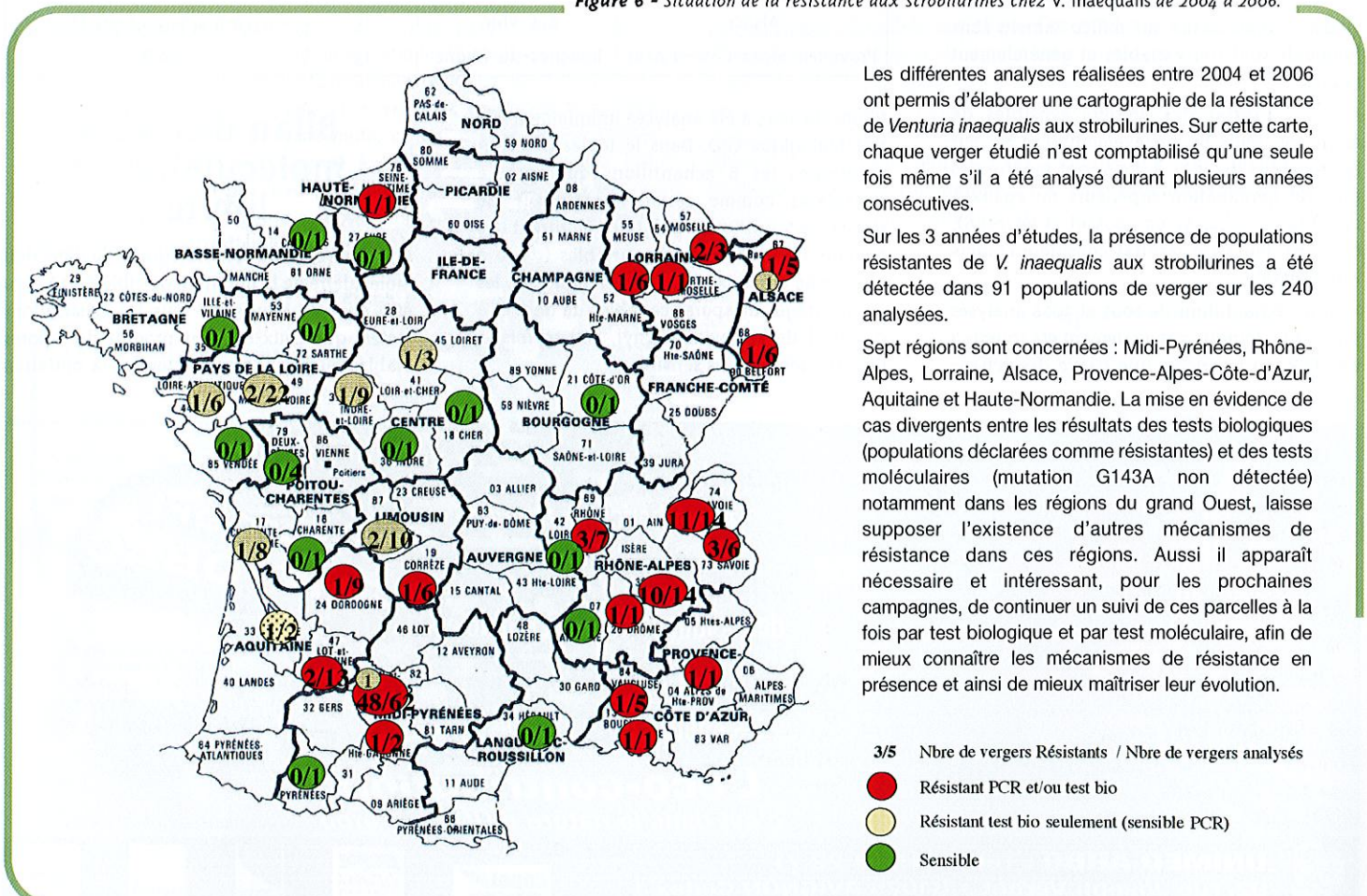
Lorraine, Midi-Pyrénées, PACA et Rhône-Alpes et a été détectée pour la première fois en Haute-Normandie.

## Comparaison des tests biologiques et moléculaires

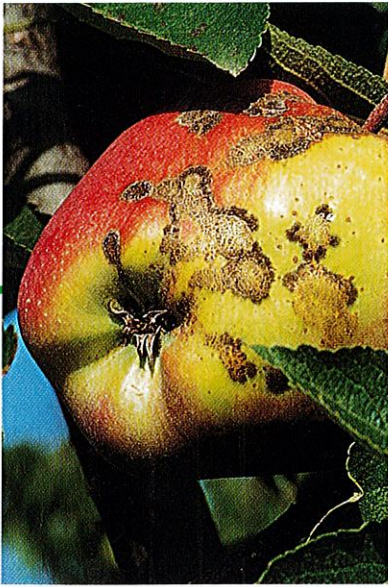
La comparaison des résultats obtenus par les tests biologiques et moléculaires de détection de la mutation G143A indique que les deux tiers des cas de résistance observés *in vitro* sont corrélés à la présence de la mutation de cible G143A (28 cas avec G143A, sur les 42 prélèvements résistants *in vitro*).

Les deux méthodes (biologique et moléculaire) de détection de la résistance ont donné des résultats cohérents pour la plupart des populations.

Cependant, certains échantillons ont montré des résultats différents entre les tests biologiques et moléculaires. Ainsi, la mutation G143A n'a d'abord pas été détectée pour 14 échantillons prélevés en 2004 et 2005 bien que ceux-ci aient montré *in vitro* des FR supérieurs ou égaux à 10. Ces différences ont, pour certains cas, pu s'expliquer par un manque de sensibilité de la méthode PCR-RFLP utilisée au début de ce travail. La mise en œuvre, en 2006, de la PCR allèle-spécifique plus sensible, sur 7 de ces vergers, a permis pour 3 d'entre eux de détecter la mutation G143A, confirmant ainsi les tests biologiques

Figure 6 - Situation de la résistance aux strobilurines chez *V. inaequalis* de 2004 à 2006.





ph. D. R.

Les tests moléculaires détectent bien les résistances dues à une mutation précise. Mais il semble exister d'autres mécanismes de résistance.

de 2005 (Tableau 3). Mais, pour les 4 autres vergers, la mutation n'a toujours pas pu être détectée.

Bien que sur ces 4 vergers, les tests biologiques de 2006 n'aient pas donné de résultats interprétables (à cause d'une très faible viabilité des spores) et n'aient donc pas confirmé les données de 2005, ces observations laissent suspecter que des mécanismes de résistance autres que la mutation G143A pourraient exister, comme le suggèrent certains auteurs (Jabs *et al.*, 2001 ; Steinfeld *et al.*, 2001).

Aussi il paraît intéressant, pour les prochaines campagnes, de continuer un suivi de ces parcelles à la fois par test biologique et par test moléculaire, afin de mieux connaître les mécanismes de résistance en présence et ainsi de mieux maîtriser leur évolution.

## Conclusion

La recherche par PCR de la mutation G143A chez *V. inaequalis* est une technique intéressante pour détecter la résistance aux strobilurines induite par cette mutation.

En effet, cette technique est rapide à mettre en œuvre, fiable et sensible car réalisable avec de très faibles quantités de matériel biologique, même non viable. Avec un faible taux d'échec, elle permet de s'affranchir du test biologique classique qui se heurte au pouvoir germinatif faible et aléatoire des spores prélevées sur des échantillons de terrain.

L'analyse comparative des résultats obtenus chez *V. inaequalis*, par test biologique et par test moléculaire, a montré qu'une majorité des cas de résistance a bien pour origine la mutation G143A et que ce mécanisme de résistance est maintenant très présent en Midi-Pyrénées ainsi qu'en Rhône-Alpes et en Provence-Alpes-Côte-d'Azur.

Ces cas de résistance ne restent pas limités à ces régions, ils sont maintenant mis en évidence en Alsace, Lorraine et Haute-Normandie (Figure 6, Carte).

La fréquence des populations de tavelure présentant la mutation de cible G143A ainsi que l'existence suspectée d'autres mécanismes de résistance doivent inciter à redoubler de vigilance dans l'utilisation des strobilurines

pour lutter contre la tavelure : la limitation de la pression de sélection reste un élément essentiel dans la gestion des résistances.

**Remerciements :** Nous tenons à remercier tout particulièrement Pierre Leroux et Anne-Sophie Walker (INRA Versailles) pour leur soutien scientifique ainsi que pour les conseils qu'ils nous ont prodigués au cours de cette étude.

## Bibliographie

- **Fiaccadori R., Cicognani E., Abbatecola A., Collina M., Brunelli A., 2005** - Sensitivity of *Venturia inaequalis* to strobilurin fungicides in Italy. 57th International Symposium on Crop Protection, Ghent.
- **Färber Küng R. B., Min Chin K. M., Leidbitter N., 2002** - Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. Pest Management Science, 58, 261-267.
- **Jabs T., Cronshaw K., Freund A., 2001** - New strobilurin resistance mechanism in apple scab (*Venturia inaequalis*) and its distribution in Europe. 13th International Reinhardtbrunn Symposium on fungicides, Freidrichroda, Germany, Abs.
- **Leroux P. et Delorme R., 1997** - La respiration cellulaire, une cible toujours d'actualité pour divers groupes de produits phytosanitaires. Phytoma-La Défense des végétaux, 494, 17-23.
- **Olaya G., Zheng D. and Köller W., 1998** - Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. Pesticide Science, 54, 230-236.
- **Steinfeld U., Sierotzki H., Parisi S., Poirey S., Gisi U., 2001** - Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. Pest Management Science, 57, 787-796.
- **Steinfeld U., Sierotzki H., Parisi S., Poirey S., Gisi U., 2002** - Comparaison of resistance mechanism to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. Modern Fungicides and Antifungal Compound III. Edition H.W. Dehne, U. Gisi *et al.* Verlag Th. Mann GmbH&Co.KG, Gelsenkirchen.

## Résumé

En France, les premiers cas de résistance de la tavelure du pommier (*Venturia inaequalis*) aux strobilurines ont été détectés aux alentours de 2002. Le suivi de cette résistance *via* des tests de germination de spores *in vitro* est difficile compte tenu du taux de germination variable et généralement faible des spores prélevées sur les échantillons de terrain. Le mécanisme de résistance le plus souvent rencontré vis-à-vis de ce type de fongicide résulte d'une mutation G143A dans le gène codant pour le cytochrome b. La mise au point de techniques de détection de cette mutation, par PCR, permet de disposer d'un outil précieux pour suivre cette résistance. Des analyses réalisées à la fois par tests *in vitro* et par PCR de 2004 à 2006 ont permis d'élaborer une cartographie de la résistance de *V. inaequalis* aux strobilurines et de son évolution au niveau du territoire. Il s'avère que la mutation G143A prédomine dans les populations résistantes du champignon, notamment des régions arboricoles du Sud-Ouest et du Sud-Est et s'est étendue entre 2004 et 2006.

Cette étude fait également suspecter en France l'existence de mécanismes de résis-

tance autres que celle provoquée par la mutation G143A.

**Mots-clés :** tavelure du pommier, résistance, strobilurines, tests PCR, test *in vitro*.

## Summary

APPLE SCAB (*VENTURIA INAEQUALIS*): RESISTANCE TO STROBILURINS IN FRANCE FROM 2004 TO 2006 AS REVEALED BY SPORE GERMINATION AND PCR ASSAYS  
In France, the first cases of apple scab (*Venturia inaequalis*) resistance to strobilurins were detected around 2002. Monitoring this resistance by means of *in vitro* spore germination assay is difficult because the rate of field sample spore germination is variable and usually low.

The most common resistance mechanism for this type of fungicides is a result of a mutation in the cytochrome b gene (G143A). Biomolecular techniques were developed to detect this mutation in apple scab and were proved to be very useful. Analyses were carried out with *in vitro* spore germination and PCR assays on field samples from 2004 to 2006. This allowed us to map the *V. inaequalis* resistance to strobilurins and to monitor its progression in France. The mutation G143A appeared geographically widespread (especially in the South West and South East of France). This study points out the existence in France of other resistance mechanisms than the G143A mutation mechanism.

**Key words :** Apple scab, Resistance, Strobilurins, PCR assay, *in vitro* assay.