



Résistance de l'Oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) vis-à-vis des Inhibiteurs de la C14 - Stérol Déméthylase (IDMs) et des Qols

PLAN DE SURVEILLANCE 2011

RÉSUMÉ

En 2011, le plan de surveillance a porté principalement sur une famille de fongicides inhibiteurs de la respiration cellulaire : les Qols (strobilurines). Le suivi de la résistance aux Qols se traduit par la recherche de la mutation G143A affectant la cible de cette famille de fongicides. Cette mutation est responsable d'un très fort niveau de résistance vis-à-vis des Qols.

D'abord cantonnée à la zone de l'Armagnac, la situation s'est détériorée en 2010 où des souches résistantes ont été détectées dans sept autres régions viticoles. Le plan de surveillance 2011 montre que la résistance aux Qol continue sa progression en fréquence de parcelles touchées et en taux d'allèles mutés dans les populations. En effet, l'allèle de résistance est présent dans plus de la moitié des parcelles analysées et dans neuf régions sur les 11 concernées par cette surveillance. Parmi les régions les plus représentées en nombre d'échantillons en 2011, celles qui paraissent les plus concernées par cette résistance de cible (>50% d'échantillons avec plus de 50% d'allèle muté détecté) sont les suivantes : Languedoc Roussillon, Midi Pyrénées et Rhône Alpes.

Pour 2011, le suivi de la résistance aux IDMs (IBS du groupe I), qui consiste à la recherche de la mutation Y136F de la 14- α -stérol déméthylase, n'a concerné que des parcelles d'essai « érosion d'efficacité ».

Mots-clés : *Erysiphe necator*, Qols, allèles de résistance, qPCR.



I. Rappel du contexte

Le champignon *E. necator*, parasite obligatoire, se développe difficilement en conditions de laboratoire. Il est donc souvent délicat d'obtenir un inoculum suffisant pour mettre en œuvre des tests biologiques de sensibilité aux fongicides (germination de spores *in vitro*). Les outils d'analyses basés sur des techniques de biologie moléculaire sont donc plus appropriés pour ce phytopathogène. Dans le cas présent, les analyses pour rechercher des allèles de résistance sont réalisées par PCR quantitative (qPCR) après extraction des ADN. Cet outil d'analyse a été mis au point par l'équipe de l'UMR en Santé Végétale de l'INRA de Bordeaux (Dufour *et al.*, 2011) et transmis à l'Anses-Lyon fin 2009.

Une résistance de cible consiste en la substitution d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s) dans un site clé d'une protéine essentielle au fonctionnement cellulaire et qui est la cible du fongicide. Ce changement réduit l'affinité fongicide-protéine et induit une diminution voire une perte de l'efficacité de la molécule chimique. Les analyses réalisées visent à rechercher des résistances de cible à deux familles de fongicides couramment utilisées dans les programmes de lutte contre les maladies cryptogamiques de la vigne : les inhibiteurs de la 14- α -déméthylase (IDMs – Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols de groupe I) et les inhibiteurs du complexe de la respiration cellulaire de la famille des QoIs (inhibiteurs de la face externe du centre d'oxydation du cytochrome b) tels que les strobilurines. La résistance aux IDMs, apparue depuis une trentaine d'années, reste limitée dans la majorité des vignobles grâce à une restriction du nombre de traitements à trois IDMs par an depuis 1992 et à l'alternance des familles chimiques utilisées. Un des mécanismes de résistance majeur à cette famille a été identifié comme étant lié à une mutation ponctuelle du gène de la cible : la 14- α -stérol déméthylase. Une adénosine chez les isolats sensibles est remplacée par une thymine chez les isolats résistants ce qui entraîne, au niveau protéique, la substitution d'une phénylalanine par une tyrosine en position 136 (Y136F) (Délye *et al.*, 1997). Les analyses de qPCR mises en œuvre dans le cadre de ce plan de surveillance, permettent de détecter uniquement ce mécanisme de résistance. Le suivi de cette résistance, réalisé depuis 2008, avait montré une augmentation du nombre de cas de souches résistantes entre les deux premières années de monitoring (16% des parcelles analysées en 2008 vs 40% en 2009) suivie d'un palier entre 2009 et 2010 (30% des parcelles en 2010). En 2011, la recherche de cette résistance de cible n'a concerné que les échantillons en provenance de parcelles d'essais.

Concernant les QoIs, molécules plus récentes, des résistances ont été détectées en France en Armagnac en 2008 (informations relayées sur le site du FRAC : Fongicide Resistance Action Committee). Le mode d'action de ces fongicides consiste en l'inhibition de la chaîne respiratoire cellulaire via un blocage du site d'oxydation du cytochrome b. De nombreux agents cryptogamiques (29) ont développé un ou des mécanismes de résistance à cette famille de produits phytosanitaires, susceptibles de compromettre leur efficacité au champ. Le mécanisme le plus fréquent réside dans une mutation ponctuelle du gène mitochondrial du cytochrome b. La substitution d'une guanine par une cytosine, entraîne au niveau protéique le changement d'une glycine en une alanine de l'acide aminé 143 (G143A). Jusqu'en 2009, cette résistance est restée limitée au département du Gers. En 2010, la situation s'est détériorée puisque, outre la région Midi-Pyrénées, des populations contenant des souches résistantes ont été observées dans sept autres régions viticoles : Aquitaine, Bourgogne, Champagne Ardenne, Franche Comté, Languedoc Roussillon, Pays de Loire et Rhône Alpes.

Depuis 2008, l'unité Résistance aux produits phytosanitaires (Rpp) est sollicitée dans le cadre du plan de surveillance national de la DGAL « Résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides ». La



programmation (répartition et protocoles de prélèvement des échantillons) est mise en œuvre par l'expert vigne et la personne ressource de la DGAL. La collecte des échantillons de feuilles ou de grappes oïdiées, réalisée par les SRAL, les FREDON ou des organismes professionnels, est centralisée par l'unité.

Le plan de surveillance 2011 avait un objectif majeur : suivre l'évolution de la résistance de cible aux QoIs dans les différentes régions viticoles. A ces analyses de surveillance, s'ajoutent également des analyses pour rechercher les allèles de résistance de cible aux IDMs et aux QoIs dans des échantillons en provenance de parcelles d'essais d'érosion d'efficacité. Ces données apportent des informations essentielles pour apprécier l'évolution, au terrain, des allèles de résistance en fonction des pratiques phytosanitaires.

II. Description brève de la méthode utilisée

Comme les années précédentes, chaque prélèvement reçu est constitué d'une trentaine de feuilles ou d'une dizaine de grappes oïdiées. Pour les prélèvements foliaires, un pool de 15 rondelles de feuilles oïdiées, issues de 15 feuilles, est constitué pour chaque parcelle à l'aide d'un emporte-pièce. Pour les grappes, l'échantillonnage est effectué par grattage des baies attaquées afin de collecter le mycélium d'*E. necator*. Les extractions d'ADN sont réalisées selon une méthode CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium).

L'outil de détection et de quantification de l'allèle de résistance aux QoIs (G143A) est adaptée de la publication de Baudoin *et al.* (2007) tandis que la méthode concernant la résistance aux IDMs (Y136F) a été développée par l'INRA de Bordeaux (U.M.R. en Santé Végétale). Ces deux outils reposent sur des techniques de PCR quantitative. Ils permettent de quantifier, au sein des gènes d'une population, la proportion d'allèles mutés impliqués dans la résistance aux IDMs ainsi que la proportion d'allèles mutés responsable de la résistance aux QoIs. Il est important de noter que pour la résistance aux IDMs, la méthode employée ne permet pas de détecter l'ensemble des mécanismes de résistance connus à cette famille de fongicide, mais seulement celui impliquant la mutation Y136F.

III. Echantillons reçus

Onze régions étaient ciblées par le plan de surveillance 2011 (cf tableau I). Au total 75 parcelles ont été échantillonnées, 72 d'entre elles sont des parcelles commerciales, les 3 restantes sont des parcelles d'essais. Le nombre de prélèvements effectués sous forme de feuilles oïdiées ou de grappes est équivalent. Pour treize des parcelles commerciales, les échantillons étaient constitués à la fois de feuilles et de grappes. Plusieurs prélèvements différents ont également été réalisés sur les parcelles d'essais d'expérimentation en fonction des modalités. Au total, 103 échantillons ont été analysés cette année. La majorité des prélèvements sont arrivés avant le mois de septembre (80%).



Tableau I : Nombre de parcelles prévues, prélevées et nombre d'échantillons analysés selon les régions

Régions	PARCELLE COMMERCIALES			PARCELLE D'ESSAIS	
	nombre de parcelles prévues (N.S. 2011)	Nombre de parcelles prélevées	nombre d'échantillons analysés*	nombre d'essais prévus et prélevés	nombre d'échantillons analysés
Aquitaine	8	13	13	-	-
Alsace	5	-	-	-	-
Bourgogne	8	12	14	1	2
Centre	3	3	3	-	-
Champagne Ardenne	8	8	11	-	-
Franche Comté	3	3	5	-	-
Languedoc Roussillon	8	13	15	1	8
Midi Pyrénées	10	7	7	1	8
Pays de Loire	5	2	4	-	-
Poitou Charentes	5	5	5	-	-
PACA	8	2	2	-	-
Rhône Alpes	6	4	6	-	-
TOTAL	77	72	85	3	18

* Le nombre d'échantillons est supérieur au nombre de parcelles car des échantillons de feuilles et de grappes ont été prélevés sur certaines parcelles

IV. Résultats-Discussion

1. Plan de surveillance « Résistance de cible aux Qols » (mutation G143A)

L'interprétation des données obtenues pour chaque échantillon permet de connaître le pourcentage d'allèles portant la mutation G143A. Les résultats sont présentés dans le tableau II et sur une carte en Annexe 1. Pour chaque région, ce tableau donne la répartition des échantillons analysés en fonction des classes de pourcentage d'allèles mutés. De plus, la figure 1 présente, pour chaque région, le nombre d'échantillons appartenant à chacune des classes pour les deux années 2010 et 2011. Pour les parcelles où plusieurs échantillons (feuilles + grappes) ont été prélevés, seul l'échantillon ayant le résultat le plus élevé a été comptabilisé dans ce bilan. Pour les parcelles d'essais érosion, seul le résultat de la modalité témoin a été retenu et comptabilisé dans le plan de surveillance. Les résultats détaillés des prélèvements effectués dans les différentes modalités des essais érosion sont présentés dans le paragraphe 2.

Globalement et dans la continuité de 2010, la fréquence de l'allèle de résistance aux Qols, (mutation G143A) apparaît en progression (tableau II). En effet, la mutation a été détectée dans 52 % (vs 22% en 2010) des parcelles analysées, réparties dans neuf régions sur les 11 concernées par le plan de surveillance. Quant au pourcentage de parcelles présentant la mutation à un taux supérieur à 50%, il est globalement en forte augmentation par rapport à 2010 (11% vs 34,6%) La comparaison des résultats de 2010 et de 2011, région par région, confirme cette appréciation globale, notamment pour les régions Aquitaine, Champagne Ardenne, Midi Pyrénées et Rhône Alpes pour lesquelles le nombre d'échantillons analysés est à peu près identique à celui de 2010. Dans ces régions, la proportion d'échantillons présentant plus de 50% d'allèles mutés est en progression (voire en très



forte progression comme en Rhône Alpes dont les échantillons viennent tous du Beaujolais et Midi Pyrénées dont les échantillons ont été prélevés dans les départements du Gers (6/8), du Tarn (1/8), du Lot (1/8)).

Il est important de noter par ailleurs qu'en **2011** :

- la région Languedoc Roussillon, peu échantillonnée en 2010, montre une forte présence de l'allèle muté (>50%) dans plus de la moitié des 14 parcelles analysées.
- pour trois parcelles, l'allèle de résistance reste très faiblement présent car il n'a pu être quantifié précisément (deux en région Centre et une en Franche Comté).
- l'allèle de résistance n'a pas été détecté dans les parcelles analysées pour deux régions seulement : la région Poitou-Charentes (situation identique à l'année précédente) et les Pays de Loire (où l'allèle de résistance avait néanmoins été détectée dans une parcelle sur quatre analysées l'année dernière). Pour cette dernière région, la faiblesse de l'échantillonnage 2011 (2 parcelles) peut expliquer ces différences.

Tableau II : Répartition des parcelles, par région, en fonction de la proportion d'allèles mutés G143A d'*Erysiphe necator*

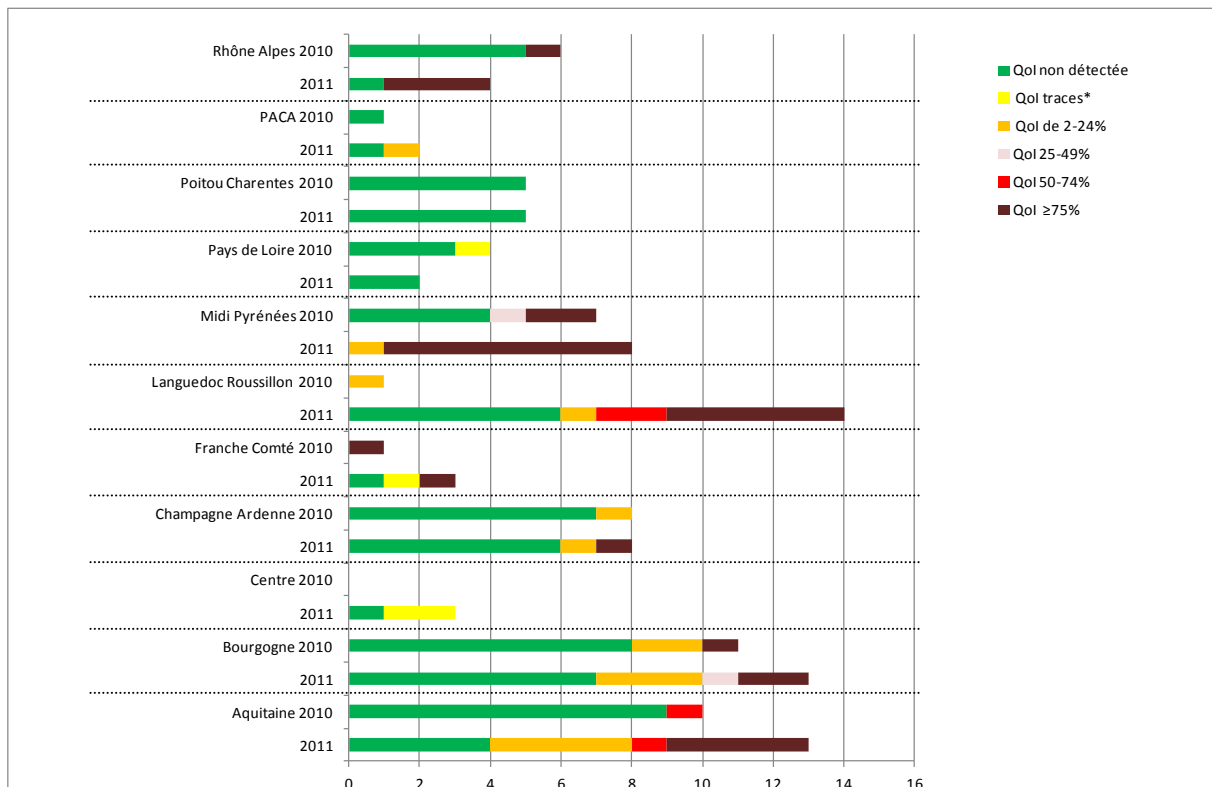
Régions	% d'allèles résistants aux QoI (G143A)						Total parcelles
	Non détecté	Trace*	[2-25[[25-50[[50-75[>75	
Aquitaine	4		4		1	4	13
Bourgogne	7		3	1		2	13
Centre	1	2		0			3
Champagne Ardenne	6		1	0		1	8
Franche Comté	1	1				1	3
Languedoc Roussillon	6		1		2	5	14
Midi Pyrénées			1			7	8
Pays de Loire	2						2
Poitou Charentes	5						5
PACA	1		1				2
Rhône Alpes	1					3	4
TOTAL	34	3	11	1	3	23	75

* Traces : résultat à la limite du seuil de détection de la méthode

Pour les parcelles pour lesquelles plusieurs échantillons ont été analysés, le résultat le plus défavorable a été conservé pour ce tableau.



Figure 1 : Répartition des parcelles en fonction du pourcentage d'allèles G143A (résistance aux QoIs) pour chaque région pour les deux années 2010 et 2011



* Traces : résultat à la limite du seuil de détection de la méthode

2. Les parcelles d'essais

La recherche d'allèles de résistance aux IDMs et aux QoIs a été effectuée sur trois essais « érosion d'efficacité » répartis dans les régions Bourgogne, Languedoc Roussillon et Midi Pyrénées (cf tableau III).

Pour la **Bourgogne**, des prélèvements sous forme de feuilles et de grappes ont été effectués à la même date sur l'ensemble des modalités témoin. Les deux prélèvements présentaient plus de 75% d'allèle de résistance aux QoIs et seul l'échantillon constitué de grappes possédait également des allèles de résistance aux IDMs (8%).

Pour la région **Languedoc Roussillon**, deux séries de prélèvement de grappes ont été réalisés le 26/06/11 puis le 25/07/11. Les deux séries étaient constituées de quatre prélèvements de grappes dans les quatre parcelles témoins correspondant aux quatre répétitions de l'essai. Dans cet essai, mis en place en 2011, aucun allèle de résistance aux QoIs n'a été détecté à chacune des deux dates de



prélèvement. Pour les IDMs, la situation est hétérogène puisque des allèles de résistance ont été détectés dans un échantillon prélevé le 26/06 (48%).

Pour la région **Midi Pyrénées**, deux séries de prélèvements ont été effectuées dans une parcelle du Gers. La première série, réalisée le 27/06/11 était constituée de feuilles et de grappes prélevées dans les témoins. La seconde série, du 23/08/11, était constituée de prélèvements de grappes provenant des témoins et des cinq modalités de l'essai. A l'exception des prélèvements de grappes provenant du témoin du 27/06/11, des allèles de résistance aux QoI ont été détectés dans tous les prélèvements à des degrés divers selon les modalités (les modalités 1 et 2 présentant les plus forts taux, de l'ordre de 30 - 35%, alors que seule la modalité 1 semble avoir subi une pression de sélection QoI). Des allèles de résistance aux IDMs ont été également détectés dans tous les prélèvements à l'exception des prélèvements de feuilles dans le témoin du 26/06/11. Comme pour les QoI, les pourcentages d'allèle de résistance aux IDMs sont hétérogènes selon les modalités (mais toujours supérieurs à 50%). Pour les prélèvements de fin août, les modalités avec 100 % d'allèles résistants sont les modalités ayant reçu au moins une application d'IDMs pendant l'essai.

Ces résultats seraient à recouper avec les notations d'efficacité réalisées dans ces essais.



Tableau III : Résultats de la recherche des allèles de résistances de cible aux Qols (G143A) et aux IDMs (Y136F) pour les parcelles d'essais « érosion d'efficacité »

Région	Référence Laboratoire	Date prélèvement	Organes prélevés	Réf Expéditeur	Modalité	% d'allèles résistants aux Qols	% d'allèles résistants aux IDMs	Qols	IDMs	quinoxifene	autres
Bourgogne	11-205	25/07/2011	Feuilles	BO-71-exp01	exp 01	≥75	0	0	0	0	0
	11-206		Grappes	BO-71-exp01	exp 01	≥75	8	0	0	0	0
Languedoc Roussillon	11-65	28/06/2011	Grappes	LR MVVIOI111-01	témoin	0	0	0	0	0	0
	11-66		Grappes	LR MVVIOI111-02	témoin	0	0	0	0	0	0
	11-67		Grappes	LR MVVIOI111-03	témoin	0	48	0	0	0	0
	11-68		Grappes	LR MVVIOI111-04	témoin	0	0	0	0	0	0
	11-209	25/07/2011	Grappes	LR-MVVIOI 111-témoin19	témoin	0	0	0	0	0	0
	11-210		Grappes	LR-MVVIOI 111-témoin10	témoin	0	0	0	0	0	0
	11-211		Grappes	LR-MVVIOI 111-témoin14	témoin	0	0	0	0	0	0
	11-208		Grappes	LR-MVVIOI 111-témoin6	témoin	0	0	0	0	0	0
Midi Pyrénées	11-58	27/06/2011	Grappes	MP-32-01 témoin	Témoin	0	100	0	0	0	0
	11-59		Feuilles	MP-32-02 témoin	Témoin	17	0	0	0	0	0
	11-328*	23/08/2011	Grappes	MP-32-OI-07-témoin	témoin	16	65	0	0	0	0
	11-329*		Grappes	MP-32-OI-08-moda1	modalité 1	34	89	3	0	0	5
	11-330*		Grappes	MP-32-OI-09-moda2	modalité 2	31	100	0	3	0	5
	11-331*		Grappes	MP-32-OI-10-moda3	modalité 3	5	100	0	3	0	5
	11-332*		Grappes	MP-32-OI-11-moda4	modalité 4	7	58	0	0	3	5
	11-334*		Grappes	MP-32-OI-12-moda5	modalité 5	14	100	1	1	1	5
NR: Non Renseigné											
* essai redistribué en 2011											

V. Conclusions-Perspectives

Les analyses réalisées cette année montrent que la résistance aux Qol, causée par la mutation G143A, continue sa progression. En effet, l'allèle muté est détecté dans plus de la moitié des parcelles analysées et dans neuf régions sur les 11 concernées par cette surveillance. Parmi les régions les plus représentées en nombre d'échantillons en 2011, celles qui paraissent les plus concernées par la résistance de cible aux Qols (plus de 50% d'échantillons avec plus de 50% d'allèle muté détecté) sont les suivantes : Languedoc Roussillon, Midi Pyrénées et Rhône Alpes. Les régions Aquitaine et Champagne Ardenne enregistrent également une progression plus ou moins importante par rapport à 2010. Enfin, il est important de noter qu'en 2011 comme en 2010, la résistance de cible



aux QoIs n'a toujours pas été détectée dans les prélèvements de la région Poitou-Charentes (dix parcelles échantillonnées au total sur les deux années).

Les résultats, présentés dans ce bilan, semblent donc indiquer que, malgré les recommandations de la Note Nationale 2011, limitant le nombre d'applications pour l'ensemble des vignobles français (avec une plus grande restriction pour le Gers), la fréquence des souches avec des allèles de résistance aux QoIs continue de progresser dans certaines régions.

Quant aux résultats obtenus sur les échantillons prélevés dans les essais « érosions d'efficacité », leur interprétation ne peut pas être réalisée avec les seuls résultats du laboratoire. Ils doivent être impérativement comparés aux observations faites sur le terrain.

VI. Partenaires scientifiques et techniques

INRA de Bordeaux (UMR Santé Végétale)

Ce projet est fait en lien avec l'INRA de Bordeaux pour la mise en œuvre de la méthode moléculaire. (Cf: Marie-Cécile Dufour, Séverine Fontaine, Josselin Montarry, Marie-France Corio-Costet Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science* 67 ; 60-69).

Expert référent vigne de la DGAL

M. Jacques Grosman – DRAAF-SRAL Rhône Alpes – 165 rue Garibaldi – BP 3202 – 69401 Lyon cedex 03 – France.

Personne Ressource DGAL Maladies Cryptogamiques de la Vigne

M. Claude Magnien – DRAFF-SRAL Bourgogne – 8 rue Jacques Germain - BP177 – 21205 Beaune Cedex - France

Réseau des DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles de la Surveillance Biologique du Territoire pour la participation aux prélèvements.

VII. Bibliographie

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*, doi:10.1094/PHP-2008-0211-02-RS

Dufour MC, Fontaine S, Montarry J and Corio-Costet MF, Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci*; **67**(1): 60-69 (2011).

Délye C., Laigret F. and Corio-Costet M.F. (1997). A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor, *Applied and Environmental Microbiology* 63, pp. 2966–2970.



ANNEXE 1: Oïdium de la vigne- Surveillance 2011- QoIs

