

# Résultats des séquençages du cytochrome b de *Plasmopara viticola* sur échantillons prélevés en 2012

I.	Rappel du contexte.....	2
II.	Echantillons 12-50 et 12-367 .....	2
1.	Historique .....	2
2.	Résultat des séquençages.....	4
III.	Echantillon 12-255.....	4
1.	Historique .....	4
2.	Résultat du séquençage.....	5
IV.	Echantillon 12-328.....	5
1.	Historique .....	5
2.	Résultat du séquençage.....	5
V.	Echantillon 12-124.....	6
VI.	Conclusion .....	6

## I. Rappel du contexte

En 2011, certaines populations de *Plasmopara viticola* se sont révélées sporuler en présence de différentes doses de cyazofamid, en test biologique au laboratoire, mais aucune mutation sur les sites spécifiques Qil n'a pu être décelée par PCR. De plus, des difficultés ont été rencontrées pour la multiplication par repiquages des spores résistantes sur support végétal, en l'absence du fongicide. En 2012, la recherche de populations résistantes pour la famille des Qil s'est élargie avec une nouvelle substance active testée en sus de la cyazofamid : l'amisulbron (non autorisé en France à ce jour). Les 2 substances ont donc été testées en parallèle avec une gamme de doses (0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 et 100 mg/L), la cyazofamid en présence de sham à 80 mg/L et l'amisulbron sans sham.

Lors des tests biologiques, certaines populations ont sporulé sur amisulbron mais pas sur cyazofamid + sham. Les sporulations obtenues sur amisulbron ont pu être multipliées (repiquages et multiplication sur support végétal en présence d'amisulbron à la dose sur laquelle elles avaient initialement sporulé) puis séquencées.

Les données décrites ci-dessous concernent uniquement les résultats obtenus dans les tests avec amisulbron sans sham, soit 4 populations avec des résultats positifs sur cette substance active (sur 104 testées au total).

La zone séquencée est la **portion du gène du cytochrome b** contenant le site de fixation des Qil (Grasso *et al*, 2006) (n° d'accèsion GenBank : DQ209286) mais également le site de fixation des QoI chez *Plasmopara viticola*. Le séquençage se fait en « sens et reverse » pour pallier au problème de « bégaiement » de la Taq (lié à une zone du gène très riche en T). Le détail des prélèvements effectués pour le séquençage se trouve en annexe 1.

## II. Echantillons n°12-050 et n°12-367

### 1. Historique

Ces 2 échantillons sont issus d'une même parcelle de Bourgogne, un second prélèvement datant du 17/09 ayant été demandé pour confirmer la résistance du premier prélèvement réalisé le 25/06. Cette parcelle avait déjà été prélevée en vue d'analyses de résistance Qil les années précédentes. En 2011, aucune sporulation résistante n'avait été observée dans les tests avec cyazofamid seule (sans sham). En revanche, en 2010 (échantillon n°10-098), à partir des mêmes tests avec cyazofamid seule, des sporulations avaient été observées à toutes les concentrations testées, y compris à 100 mg/L (22% de sporulation à 100 mg/L).

En 2012, en test biologique en laboratoire, les deux échantillons ont sporulé sur amisulbron et présentent une CMI à 100 mg/L (% de sporulation à la dose 10 mg/L : respectivement 4% pour le n°12-050 et 3% pour le n°12-367). A noter que l'échantillon n°12-367 n'a été repiqué qu'une seule fois entre sa date de réception au laboratoire et sa date de test, la population testée peut donc être considérée comme très représentative de celle présente sur la parcelle.

Figure 1 : Historique de l'échantillon n°12-050

numéro d'échantillon 2012	Historique 2010-2011	2012 nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Premier test amisulbron du 06/08/2012	Résultat du séquençage (14/08/2012)	nombre de repiquage avant le deuxième test	Deuxième test amisulbron du 27/08/2012 avec et sans sham
12-050	2011 : n°11-349 CMI ]0,01 - 0,1]  2010 : n°10-098 CMI >100	6	T+		1	Sensible
			A1+			
			A10+	Pas de mutation G143A	20/08/2012 repiquage sur A10	A10-

Légende : T + ou Ax + = sporulation observée sur cette dose      T - ou Ax - = pas de sporulation sur cette dose  
 Résultats des tests       Historique des repiquages       Séquençage

Le prélèvement de spores de l'échantillon n°12-050, pour séquençage, a été effectué le 14/08/2012 sur une boîte de test à la dose 10 mg/L (A10).

Les spores n'ont pas pu être conservées avec pression de sélection. Le 27/08/2012, un second test de résistance a été effectué à partir du témoin avec, pour chaque dose, une modalité avec sham et une modalité sans sham. L'échantillon est ressorti sensible à l'amisulbron sur toutes les modalités avec et sans sham.

Pour l'échantillon n°12-367, les spores ont été prélevées pour séquençage le 5/10/2012 sur la dose 10 mg/L (A10) issue du test de résistance du 28/09/2012.

Les spores de la dose 1 mg/L, issues du même test, ont pu être repiquées sur une dose équivalente, puis sur une dose à 10 mg/L.

Figure 2 : Historique de l'échantillon n°12-367

numéro d'échantillon 2012	Historique 2010-2011	2012 nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Premier test amisulbron du 28/09/2012	Résultat du séquençage (5/10/2012)	Repiquages successifs à la dose A1	Repiquages successifs à la dose A10
12-367	2011 : n°11-349 CMI ]0,01 - 0,1]  2010 : n°10-098 CMI >100	1	T+			
			A1+		Du 5/10/2012 au 19/10/2012 3 repiquages	Du 26/10/2012 au 9/11/2012 3 repiquages
			A10+	Pas de mutation G143A		

Légende : T + ou Ax + = sporulation observée sur cette dose      T - ou Ax - = pas de sporulation sur cette dose  
 Résultats des tests       Historique des repiquages       Séquençage

## 2. Résultat des séquençages

Les séquençages révèlent, pour les deux échantillons, des séquences identiques à 100 % à la séquence DQ459465.1 *Plasmopara viticola* haplotype **Eu IS**. Ces résultats montrent donc que ces prélèvements ne possèdent pas la mutation G143A qui confère la résistance aux QoI, ni aucune autre mutation qui pourrait être responsable de la résistance aux Qil.

## III. Echantillon n°12-255

### 1. Historique

Cet échantillon provient d'une parcelle issue du réseau Magister (parcelle 238) de Champagne-Ardenne. C'est la première fois que celle-ci est prélevée pour des tests de résistance. Le prélèvement a été effectué le 30/07. Le premier test de résistance amisulbron a donné une CMI à 100 mg/L (6% de sporulation à 10 mg/L).

Après deux repiquages du témoin, un deuxième test a été réalisé le 14/09 et confirme la présence de spores résistantes avec une CMI également à 100 mg/L (2% de sporulation à 10 mg/L). Un troisième test de résistance a été effectué le 28/09/2012. Cette fois-ci, la souche s'est révélée sensible, ce qui peut probablement s'expliquer par le nombre important de repiquages sur témoin (10 à partir de la réception de l'échantillon) qui a pu sélectionner les populations sensibles.

Les sporulations des doses à 1mg/L des deux tests du 3/09/2012 et du 14/09/2012 ont pu être conservées et multipliées sur des doses à 10 mg/L. En revanche, elles se sont révélées sensibles à des doses de 50 et 100 mg/L.

Trois prélèvements en vue de séquençage ont été réalisés sur cet échantillon. Un premier a été effectué le 14/09/2012 sur des sporulations à la dose 10 mg/L issues du test du 3/09/2012. Les deux autres proviennent respectivement des doses 1 et 10 mg/L du test du 14/09/2012.

Figure 3 : Historique de l'échantillon n°12-255

numéro échantillon 2012	nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Premier test Amisulbron du 3/09/2012	Résultat du séquençage (14/09/2012)	Repiquages	Deuxième test amisulbron du 14/09/2012	Résultat du séquençage (21/09/2012)	Repiquages	Troisième test amisulbron du 28/09/2012	Repiquages	Repiquages successifs à la dose A10	
12-255	4	T+		2	T+		2	Sensible		du 12/10/2012 au 9/11/2012 5 repiquages sur A10	
		A10+			A10+	G143A					
		A1+		A1+	G143A	21/09 Repiquage sur A1 et A10	28/09/2012 mélange A1 et A10 pour 1 repiquage sur A10	5/10/2012 Repiquage sur A10, A50 et A100			A10+
		A10+	G143A	14/09/2012 1 repiquage sur A1	A1+	A10+	A10+	A10+			A50- A100-

Légende : T + ou Ax + = sporulation observée sur cette dose      T - ou Ax - = pas de sporulation sur cette dose  
 Résultats des tests     
 Historique des repiquages     
 Séquençage

## 2. Résultat du séquençage

L'échantillon n°10-255 présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* **haplotype Eu IR**. Il possède la mutation G143A sur les trois prélèvements de spores avec pression de sélection Qil, mais aucune autre mutation qui pourrait être responsable de la résistance aux Qil.

## IV. Echantillon n°12-328

### 1. Historique

Cet échantillon est le premier prélèvement effectué pour des tests de résistance provenant de cette parcelle de la région Rhône-Alpes. Lors du test de résistance amisulbron, cette population a présenté des spores résistantes avec une CMI à 100 mg/L (3% de sporulation à 10 mg/L). Le prélèvement en vue du séquençage a été réalisé le 28/09/2012 sur une boîte à la dose 10 mg/L issue de ce test du 21/09/2012. Les sporulations de la dose 1 mg/L de ce même test ont pu être repiquées avec pression de sélection à une dose de 10 mg/L. A partir de cette population résistante, un nouveau test amisulbron en gamme de doses a été effectué avec apport de sham et sans sham en comparaison, mais le test est inexploitable du fait de la mauvaise qualité des feuilles de vigne saines (support du test) à cette période de l'année qui n'a pas permis d'observer des sporulations suffisantes après contamination.

Figure 4 : Historique de l'échantillon n°12-328

numéro échantillon 2012	nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Premier test amisulbron du 21/09/2012	Résultat du séquençage (28/09/2012)	Repiquage du 28/09/2012 sur A1	Repiquage du 05/10/2012 sur A1 et A10	Repiquages du 12/10/2012 sur A10	Repiquages successifs à la dose A10	Deuxième test amisulbron du 19/11/2012 avec et sans sham gamme : 0-1-10 mg/L
12-328	3	T+						Sporulations insuffisantes dans les témoins
		A1+		A1+	A1+	A10+	Du 19/10/2012 au 9/11/2012 4 repiquages	
		A10+	G143A		A10+	A10+		

Légende : T + ou Ax + = sporulation observée sur cette dose      T - ou Ax - = pas de sporulation sur cette dose  
 Résultats des tests       Historique des repiquages       Séquençage

## 2. Résultat du séquençage

L'échantillon 10-255 présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* **haplotype Eu IR**. Il possède donc la mutation G143A, mais aucune autre mutation pouvant s'apparenter à une mutation Qil.

## V. Echantillon n°12-124

Cet échantillon est issu d'une parcelle de Poitou-Charentes qui n'avait jamais fait l'objet d'une recherche de résistance auparavant. Le test de résistance révèle une CMI à 10 mg/L (6% de sporulation à 1mg/L), cependant aucun prélèvement des sporulations à la dose 1 mg/L n'a été réalisé pour séquençage.

## VI. Conclusion

Pour la recherche de résistance aux Qil, il a été plus facile de travailler avec l'amisulbron en comparaison avec la cyazofamid. En effet, avec amisulbron les spores qui ressortaient résistantes lors des tests biologiques ont pu être conservées et multipliées avec pression de sélection, ce qui n'avait pas été possible en 2011 avec les populations résistantes à la cyazofamid, et, en 2012, tous les prélèvements effectués en vue d'un séquençage ont pu être réalisés sur des spores résistantes à l'amisulbron. Cependant, aucune mutation sur la séquence ciblée, susceptible d'entraîner la résistance de cible aux Qil, n'a été décelée sur les échantillons étudiés.

En 2012, les tests de résistance à la cyazofamid ont été réalisés en ajoutant systématiquement du sham (ce qui n'avait pas été fait en 2010, ni en 2011). Aucun échantillon résistant n'a été décelé sur ces modalités cyazofamid avec sham alors que trois échantillons identiques testés sur amisulbron sans sham ont sporulé à 10 mg/L et 1 échantillon à 1 mg/L (dose considérée comme la CMI des souches sensibles). L'hypothèse d'une résistance par la mise en place d'un mécanisme de respiration secondaire peut être posée. Pour vérifier, les échantillons 2012 résistants à l'amisulbron devaient être testés à nouveau avec et sans apport de sham. Ce test a été effectué sur l'échantillon 12-328 mais tardivement dans la saison et, à cette date, la qualité des feuilles de vigne utilisées pour les tests est grandement diminuée ; de ce fait, les résultats sont inexploitable avec une sporulation quasi nulle dans les témoins.

Pour terminer, il faut noter que, parmi les trois échantillons pour lesquels des sporulations ont été observées à des doses plus ou moins fortes sur amisulbron seul, l'un d'entre eux montre cette capacité pour les deux prélèvements successifs effectués fin-juin, puis mi-septembre (sporulations observées aux deux dates sur une même dose d'amisulbron (10 mg/L)). Or, ces deux prélèvements proviennent d'une parcelle déjà remarquée en 2010 pour sa capacité à sporuler sur une dose de 100 mg/L de cyazofamid (22% de sporulation), quoique cette observation n'ait pas été reproduite en 2011.

L'ensemble de ces résultats montre que, de toute évidence, le mécanisme de résistance n'est pas, ici, un mécanisme de cible et qu'il n'est exprimé que par quelques souches de certaines populations. Cependant ce phénomène ne peut pas être ignoré, ni considéré (avant approfondissement de l'étude) comme un mécanisme « fortuit » (qui ne se manifesterait qu'en fonction des conditions d'expérimentation).