

Résistance du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) vis-à-vis des Qil et des Qol-D

PLAN DE SURVEILLANCE 2015

Résumé :

En 2015, le suivi de la résistance du mildiou de la vigne aux fongicides a concerné uniquement les modes d'action **Qil** (Quinone inside Inhibitors : inhibiteurs du site Qi du cytochrome b : amisulbron comme représentant de la famille) et **Qol-D** (Quinone outside Inhibitors : inhibiteurs du site Qo, en position distale, du cytochrome b – terme équivalent à **QoSI** : amétoctradine). Du fait de la faible pression de mildiou en 2015, un nombre limité d'échantillons a pu être prélevé au niveau national et seulement 13 échantillons sur 24 reçus ont pu être analysés (3 régions concernées sur les douze initialement prévues). Ce suivi est effectué grâce à la mise en place de tests biologiques. L'analyse met en évidence la présence plus ou moins importante de phénotypes résistants dans les populations étudiées

Parmi les 13 populations analysées en 2015, 5 d'entre elles se sont avérées présenter des souches résistantes aux Qil et aux Qol-D ; probablement avec mise en jeu d'un mécanisme de respiration alternative, tandis que 2 autres populations (une en Aquitaine et l'autre en Franche Comté) présentaient des souches résistantes aux Qol-D, mais sensibles aux Qil. Le test de confirmation (en présence de Sham) de la population de Franche-Comté a montré que ces souches résistantes aux Qol-D et sensibles aux Qil étaient probablement porteuses d'un mécanisme de résistance de cible. En ce qui concerne la population d'Aquitaine, l'absence de souches résistantes en présence de Sham laisse supposer la mise en jeu d'un mécanisme de respiration alternative pour cette population.

Mots clés : *Plasmopara viticola*, résistance, plan de surveillance, vigne

1- Présentation - contexte

Le plan national de surveillance des phénomènes de résistance, organisé annuellement par le Ministère en charge de l'Agriculture (Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux de la Direction Générale de l'Alimentation) a pour objet de recueillir des informations sur d'éventuelles dérives de sensibilité des champignons aux fongicides. L'analyse de ces données complétées par d'éventuelles investigations complémentaires sur les pertes d'efficacité au champ permet d'élaborer les recommandations dans la note technique commune "Maladies de la vigne" et apporte des éléments complémentaires dans le cadre de la post-autorisation des produits phytosanitaires.

Le programme et le protocole de prélèvement sont élaborés au niveau national en fonction des enjeux agronomiques. Les prélèvements sont réalisés sous coordination régionale dans le cadre du réseau de surveillance biologique du territoire.

Les tests de résistance ont été réalisés par l'unité Résistance aux produits phytosanitaires (RPP) du laboratoire de l'Anses-Lyon.

En 2015, le plan de surveillance a ciblé deux familles spécifiques : les Quinone inside Inhibitors (**Qil** : cyazofamide, amisulbron) et les Quinone outside inhibitors en position Distale (**Qol-D** ou **QoSI** : amétoctradine).

Dès la première année d'analyses en 2010, la présence de quelques souches résistantes a été détectée dans quelques populations, ce qui a justifié la poursuite de ce suivi les années suivantes (47 parcelles au total entre 2011 et 2014 avec des populations présentant un pourcentage variable mais faible de souches considérées comme résistantes).

2- Description brève de la méthode utilisée

Il s'agit d'une méthode d'analyse basée sur des tests biologiques.

Les tests biologiques ne sont jamais réalisés directement sur l'échantillon. Ils sont effectués après deux étapes :

- lavage des feuilles, découpe des taches, mise en chambre humide et nouvelle sporulation des taches sous 24 heures,
- repiquage de l'inoculum obtenu sur feuilles saines pour obtenir une nouvelle sporulation au bout de huit jours.

C'est sur cette nouvelle sporulation que sont réalisés les tests. Si la quantité de spores est insuffisante, un nouveau repiquage du champignon est réalisé sur feuilles saines.

Un premier test biologique de résistance aux Qol-D et aux Qil sans Sham (inhibiteur de la respiration secondaire) sur disques foliaires est réalisé pour toutes les populations (Méthode dite « volume à volume »). Une gamme de six doses est testée afin de déceler au mieux les dérives de sensibilité.

Concentrations testées : **0 (témoin) – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 mg/L**

Les solutions fongicides sont appliquées sur les disques foliaires par dépôt de gouttes, en mélange volume à volume avec la suspension de spores : un volume de fongicide (à 0,02 – 0,2 – 2 – 20 et 200 mg/L) pour un volume de suspension de spores (à 250 000 spores/mL).

Pour les populations présentant des individus résistants à l'une et/ou à l'autre des familles chimiques, un deuxième test de confirmation avec du Sham (Salicylhydroxamic acid). Cet inhibiteur spécifique d'une oxydase alternative (AOX) permet de vérifier la mise en place d'un éventuel mécanisme de respiration alternative chez les souches en dérive de sensibilité ou, *a contrario*, de mettre en évidence un mécanisme de résistance de cible.

Nombre de répétitions :

Pour chaque analyse et pour chaque dose, une boîte de Petri contient dix disques de feuilles saines de vigne, avec, pour chaque disque, un dépôt de trois gouttes de suspension de spores.

Chacune de ces gouttes constitue une répétition, ce qui représente 30 répétitions par dose.

Notation :

Les boîtes inoculées sont placées en enceinte climatique à l'obscurité à 22°C pendant 48 à 72 heures. Les gouttes sont alors aspirées et les boîtes remises à l'étuve à 22°C avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit pendant 4 jours. Une notation visuelle, qualitative, de l'intensité de la sporulation, est faite 7 jours après l'inoculation. La notation est réalisée selon une échelle qui permet d'attribuer une note de 0 (sporulation nulle) à 4 (sporulation intense).

La moyenne des 30 notes est calculée et transformée en pourcentage d'intensité de sporulation par rapport au témoin. Le témoin doit avoir une note minimale de 2 pour valider le test.

A partir des courbes représentant le pourcentage d'intensité de sporulation par rapport au témoin, en fonction du logarithme (\log_{10}) des concentrations testées, la CI50 (Concentration Inhibitrice de 50% de la population) et la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice de 100 % de la population) sont déterminées.

3- Prélèvements des échantillons

Les échantillons sont prélevés dans des sites sensibles au mildiou, pendant la phase épidémique de la maladie, au cours des mois de mai à septembre. Par parcelle, l'échantillon est constitué d'une trentaine de feuilles prélevées sur 30 ceps différents qui portent des taches de mildiou récentes. La répartition des échantillons prélevés et analysés est donnée dans le tableau 1, ci-dessous.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons prélevés et analysés par région en 2015

Régions	Echantillons demandés	Echantillons reçus	Echantillons exploitables et analysés	Tests Qil / Qol-D
Alsace	5	0	0	-
Aquitaine	10	10	4	4
Bourgogne	8	0	0	0
Centre	5	0	0	0
Champagne	8	0	0	0
Franche-Comté	6	6	6	6
Languedoc-Roussillon	5	0	0	0
Midi-Pyrénées	5	0	0	0
Pays de la Loire	5	4	3	3
Poitou-Charentes	5	4	0	0
PACA	5	0	0	0
Rhône-Alpes	8	0	0	0
Total	75	24	13 (13 parcelles)	49

4- Résultats et discussion

Parmi les 24 échantillons reçus des différentes régions concernées par ce plan de surveillance, seulement 13 ont présenté une sporulation suffisante pour permettre la multiplication de l'inoculum

et la réalisation des tests de résistance vis-à-vis des Qil et des QoI-D. Ces 13 échantillons proviennent essentiellement de 3 régions : Aquitaine (4), Franche-Comté (6) et Pays de la Loire (3).

4-1 Résultats Qil et QoI-D – Test sans Sham

Quatre types de populations de souches de mildiou ont été identifiés (tableaux 2 à 5) :

- a - les populations **sensibles** : CI50 (< 0,1 mg/L) et CMI maximale de 1 mg/L,
- b - les populations présentant une CMI supérieure à 1 mg/L mais inférieure ou égale à 10 mg/L,
- c - les populations présentant une CMI supérieure à 10 mg/L et inférieure ou égale à 100 mg/L
- d – les populations présentant une CMI supérieure à 100 mg/L

Tableau 2 : Résultats des tests de résistance aux Qil (amisulbron) sans Sham - Valeurs de CMI - 2015

Régions	Nbre Populations avec CMI > 100 mg/L (%) : sporulation à 100 mg/L	Nbre Populations avec CMI]10 - 100] mg/L (%) : sporulation à 10 mg/L	Nbre Populations avec CMI]1 – 10] mg/L (%) : sporulation à 1 mg/L	Nbre Populations avec CMI ≤1 mg/L (Sensibles)	Total parcelles
Aquitaine	0	1 (77%)	0	3	4
Franche-Comté	0	4 (3, 32, 33, 67%)	0	2	6
Pays de la Loire	0	0	0	3	3
Total	0	5	0	8	13

Tableau 3 : Résultats des tests de résistance aux QoI-D (amétoctradine) sans Sham - Valeurs de CMI - 2015

Régions	Nbre Populations avec CMI > 100 mg/L (%) : sporulation à 100 mg/L	Nbre Populations avec CMI]10 - 100] mg/L (%) : sporulation à 10 mg/L	Nbre Populations avec CMI]1 – 10] mg/L (%) : sporulation à 1 mg/L	Nbre Populations avec CMI ≤1 mg/L (Sensibles)	Total parcelles
Aquitaine	2 (36, 100%)	0	0	2	4
Franche-Comté	5 (36, 92, 100, 100, 100%)	0	0	1	6
Pays de la Loire	0	0	0	3	3
Total	7	0	0	6	13

En 2015, les 13 populations reçues ont été soumises aux tests de résistance sans Sham vis-à-vis des Qil et des QoI-D. Huit populations présentent un profil de résistance de type Sensible (CI50 < 0,1 et CMI ≤ 1 mg/L) vis-à-vis des Qil et 6 vis-à-vis des QoI-D. En ce qui concerne les autres échantillons, ces tests de résistance sans Sham ont mis en évidence dans 2 régions (Aquitaine et Franche-Comté) la présence d'individus avec des CMI élevées : **5 populations** avec des individus résistants à la fois aux Qil (avec des CMI = 100 mg/L) et aux QoI-D (avec des CMI > 100 mg/L) et **2 populations** (1 en Aquitaine et l'autre en Franche-Comté) avec des individus résistants seulement aux QoI-D (avec des CMI > 100 mg/L).

4-2 Résultats Qil et QoI-D – Test avec Sham (80 mg/L)

Sur les sept populations présentant une CMI ≥ 1 mg/L, six ont été soumises au même test en présence de Sham à 80 mg/L. La septième (une des populations de Franche-Comté résistante aux Qil et aux QoI-D) n'a pas pu être analysée faute de sporulation suffisante pour la réalisation du test avec Sham.

Tableau 4 : Résultats des tests de résistance aux Qil (amisulbron) avec Sham - Valeurs de CMI - 2015

Régions	Nbre Populations avec CMI > 100 mg/L (%) : sporulation à 100 mg/L	Nbre Populations avec CMI]10 - 100] mg/L (%) : sporulation à 10 mg/L	Nbre Populations avec CMI]1 - 10] mg/L (%) : sporulation à 1 mg/L	Nbre Populations avec CMI ≤1 mg/L (Sensibles)	Total parcelles
Aquitaine	0	0	0	1	1
Franche-Comté	0	0	0	4	4
Total	0	0	0	5	5

Tableau 5 : Résultats des tests de résistance aux QoI-D (amétoctradine) avec Sham - Valeurs de CMI - 2015

Régions	Nbre Populations avec CMI > 100 mg/L (%) : sporulation à 100 mg/L	Nbre Populations avec CMI]10 - 100] mg/L (%) : sporulation à 10 mg/L	Nbre Populations avec CMI]1 - 10] mg/L (%) : sporulation à 1 mg/L	Nbre Populations avec CMI ≤1 mg/L (Sensibles)	Total parcelles
Aquitaine	0	0	0	2	2
Franche-Comté	1 (100)	0	0	3	4
Total	1	0	0	5	6

Les analyses avec Sham réalisées sur 6 des 7 populations ayant présenté des CMI ≥ 1 mg/L vis-à-vis des Qil et des QoI-D mettent en évidence la présence de 5 populations sensibles aux Qil et aux QoI-D et 1 population de Franche-Comté avec des individus hautement résistants aux QoI-D (CI 50 >100 mg/L, soit un niveau de résistance >1000) mais sensibles aux Qil. Ce dernier phénotype de résistance suggère fortement une résistance aux QoI-D liée à la cible.

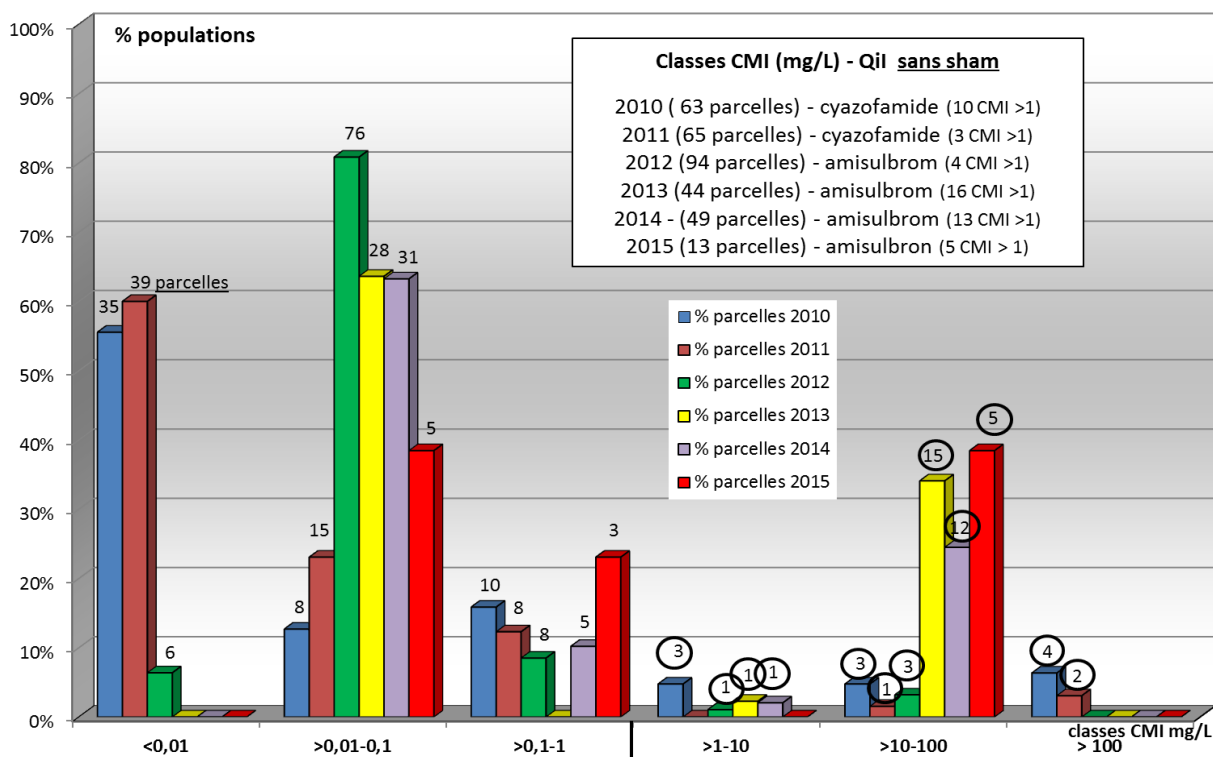
En 2014, l'analyse de résistance aux Qil et QoI-D de cette parcelle de Franche-Comté n'avait pas mis en évidence de souches résistantes que ce soit en présence ou en l'absence de Sham. Au niveau des calendriers de traitements, cette parcelle a reçu 1 application de QoI-D en 2015 et 1 en 2014. Elle a aussi reçu 1 traitement Qil en 2012 et 2 en 2011.

4-3 Evolution des données Qil, entre 2010 et 2015

La surveillance de la résistance aux Qil engagée depuis 2010 (Cf Figure 3)) a mis en évidence, avec les tests sans Sham, l'existence de plusieurs populations avec des CMI ≥ 10 mg/L, voire supérieures à 100 mg/L alors que la majorité des populations étudiées présentaient des CMI pour la plupart ≤ 1 mg/L. Mais toutes ces populations se sont avérées sensibles dans les tests avec Sham, ce qui laisse supposer la mise en place d'un mécanisme de résistance lié à une respiration alternative.

En 2015, bien que le nombre de populations analysées ait été faible (13) en raison des conditions climatiques peu favorables au mildiou, 5 populations (1 en Aquitaine et 4 en Franche-Comté) se sont révélées avoir des CMI comprises entre 10 et 100 mg/L tandis que, pour les 8 autres populations, les CMI étaient inférieures à 1 mg/L. Comme les années précédentes, ces populations à CMI élevées se sont toutes avérées sensibles dans les tests avec Sham. Les mécanismes de résistance aux Qil détectés à ce jour semblent donc toujours être liés à la mise en place d'une respiration alternative.

Figure 3 : Comparaison de la répartition (en %) des populations analysées vis-à-vis des Qil (amisulbron), entre 2010 et 2015, en fonction des CMI (exprimées en classes) Tests sans Sham



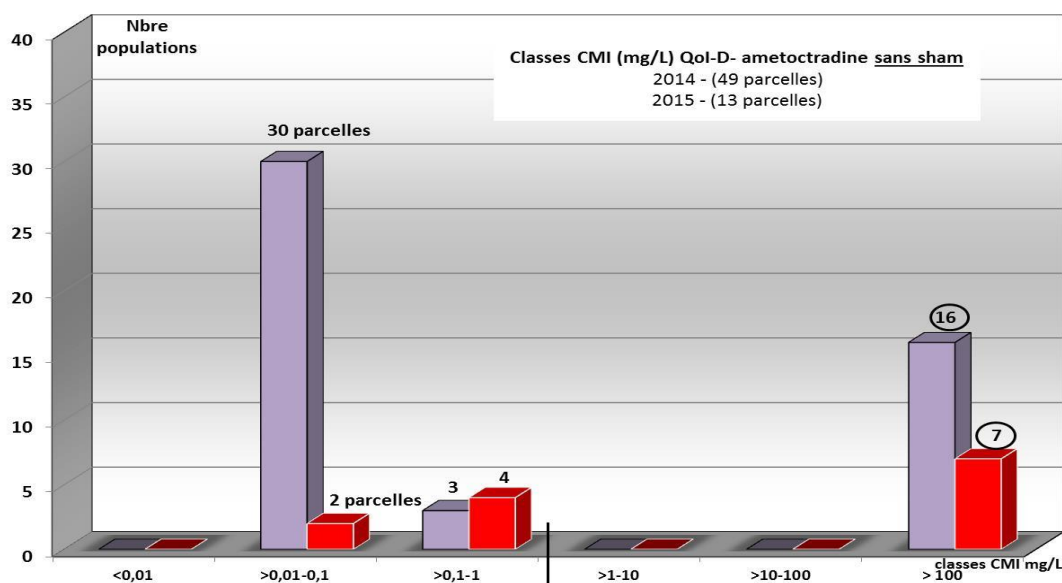
4-4 Evolution des données Qol-D, entre 2014 et 2015

La surveillance de la résistance aux Qol-D (QoSI) n'est réalisée que depuis l'année 2014.

En 2014, 49 parcelles ont été soumises aux tests avec et sans Sham. Dans les tests sans Sham (Cf figure n°4), la plupart des populations ont montré des CMI inférieures à 1 mg/L toutefois, pour 16 d'entre elles, les CMI se sont avérées supérieures à 100 mg/L. Dans les tests avec Sham, ces dernières populations ayant été classées comme sensibles, le mécanisme de résistance en jeu est probablement lié à la mise en place d'une respiration alternative.

Les résultats de 2015 (§ 4.1 et 4.2), bien que concernant seulement 13 échantillons, ont également montré l'existence de ce mécanisme lié à une respiration alternative pour 7 des populations étudiées. Mais, pour la population de Franche-Comté qui a pu être testée avec Sham, un autre mécanisme de résistance a été détecté, probablement lié à une résistance de cible. Ce mécanisme ne paraît pas entraîner une résistance croisée avec la famille des Qil.

Figure 4 : Comparaison de la répartition (en nombre) des populations analysées vis-à-vis des **Qol-D** (amétoctradine), de 2014 à 2015, **en fonction des CMI** (exprimées en classes)
Tests sans Sham



6- Conclusion – perspectives

Depuis 2010, date de la première utilisation des **Qil** au vignoble, le plan de surveillance annuel a mis en évidence la présence de souches résistantes à cette famille des Qil dans plusieurs populations de différents vignobles. Ce phénomène concernait 26% des populations étudiées en 2014 et 38% en 2015 (mais sur un nombre réduit d'échantillons). Dans tous les cas observés à ce jour au travers du plan de surveillance, le mécanisme de résistance mis en jeu vis-à-vis de cette famille est très probablement lié à la mise en place d'une respiration alternative.

En parallèle, depuis 2014, la recherche de populations résistantes aux **Qol-D** a été initiée. Des souches possédant un mécanisme de résistance par respiration alternative ont été détectées dans un certain nombre des populations étudiées en 2014 et 2015. En plus de ces souches résistantes via des mécanismes de respiration alternative, des souches avec de forts niveaux de résistance ont été isolées dans une population de Franche-Comté en 2015, présentant un mécanisme de résistance très probablement lié à la cible des Qol-D. Ces souches s'avèrent, par contre, sensibles aux Qil. Suite à cette mise en évidence, la surveillance de la résistance aux Qil et aux Qol-D sera poursuivie en 2016.

7- Partenaires scientifiques et techniques

- INRA Versailles (Anne-Sophie Walker)

- **Expert référent Résistances de la DGAL**

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

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

8- Bibliographie

- Groupe national résistance aux fongicides de la vigne (DGAI-SDQPV, INRA, IFV, APCA, CIVC), 2014 – Note nationale gestion de la résistance maladies de la vigne. Disponible sur les sites internet des DRAAF et des Chambres d'Agriculture

9- Annexes

Résultats d'analyses par région – 2015

Aquitaine : 10 échantillons (8 parcelles)							
				Résultats Tests sans Sham		Résultats tests avec Sham	
Référence échantillon Anses	Référence échantillon Expéditeur	date de réception	date d'analyse	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des QoI-D (amétoctradine)	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des QoI-D (amétoctradine)
15-032	FREDON 33	3-juin-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-034	FREDON 33	10-juin-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-060	FREDON 33	18-juin-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-059	FREDON 33	18-juin-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-116	FREDON 33	8-sept.-15	18-sept.-15	Sensible CMI = 1	Présence de souches résistantes CMI > 100	Sensible CMI ≤ 0,01	Sensible CMI ≤ 0,01
15-125	FREDON 33	16-sept.-15	18-sept.-15	Sensible CMI = 1	Sensible CMI = 1	-	-
15-126	FREDON 33	16-sept.-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-128	FREDON 33	17-sept.-15	6-nov.-15	Sensible CMI = 1	Sensible CMI = 1	-	-
15-096	CA 24 / FREDON 33	8-juil.-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-082	COTESIA 64	1-juil.-15	21-août-15	Présence de souches résistantes CMI >50	Présence de souches résistantes CMI > 100	Sensible CMI ≤ 0,01	Sensible CMI ≤ 0,01

Pays de la Loire : 4 échantillons (4 parcelles)							
				Résultats Tests sans Sham		Résultats tests avec Sham	
Anses Lyon	Expéditeur	date de réception	date d'analyse	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des QoI-D (amétoctradine)	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des QoI-D (amétoctradine)
15-112	CA 44	4-août-15	28-août-15	Sensible CMI = 0,1	Sensible CMI = 1	-	-
15-113	CA 44	6-août-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-114	CA 44	6-août-15	28-août-15	Sensible CMI = 0,1	Sensible CMI = 1	-	-
15-115	CA 44	6-août-15	28-août-15	Sensible CMI = 0,1	Sensible CMI = 0,1	-	-

Franche Comté : 6 échantillons (6 parcelles)							
				Résultats Tests sans Sham		Résultats tests avec Sham	
Référence échantillon Anses	Référence échantillon Expéditeur	date de réception	date d'analyse	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des Qol-D (amétoctradine)	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des Qol-D (amétoctradine)
15-083	SVJ 39	1-juil.-15	18-sept.-15	Sensible CMI = 0,1	Présence de souches résistantes CMI > 100	Sensible CMI ≤ 1	Présence de souches résistantes CMI > 100
15-084	SVJ 39	1-juil.-15	28-août-15	Présence de souches résistantes CMI = 100	Présence de souches résistantes CMI > 100	-	-
15-085	SVJ 39	1-juil.-15	21-août-15	Présence de souches résistantes CMI = 50	Présence de souches résistantes CMI > 100	Sensible CMI ≤ 0,01	Sensible CMI ≤ 1
15-086	SVJ 39	1-juil.-15	15-juil.-15	Présence de souches résistantes CMI = 50	Présence de souches résistantes CMI > 100	Sensible CMI ≤ 1	Sensible CMI ≤ 1
15-087	SVJ 39	1-juil.-15	15-juil.-15	Sensible CMI = 0,1	Sensible CMI = 0,1	-	-
15-088	SVJ 39	1-juil.-15	15-juil.-15	Présence de souches résistantes CMI = 50	Présence de souches résistantes CMI > 100	Sensible CMI ≤ 1	Sensible CMI ≤ 1

Poitou Charentes : 4 échantillons (3 parcelles)							
				Résultats Tests sans Sham		Résultats tests avec Sham	
Anses Lyon	Expéditeur	date de réception	date d'analyse	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des Qol-D (amétoctradine)	Vis-à-vis des Qil (amisulbron)	Vis-à-vis des Qol-D (amétoctradine)
15-099	CA 16	9-juil.-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-109	CA 17	24-juil.-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-110	CA 17	24-juil.-15	échantillon inexploitable	-	-	-	-
15-138	CA 17	23-juil.-14	échantillon inexploitable	-	-	-	-