

**LA RESISTANCE AUX FONGICIDES CHEZ L'AGENT DU MILDIU DE LA VIGNE (*PLASMOPARA VITICOLA*) - RESULTATS DES PLANS DE SURVEILLANCE DE LA DGAL-SDQSPV DE 2015 A 2017**

S. FONTAINE<sup>1</sup>, F. REMUSON<sup>1</sup>, L. CADDoux<sup>1</sup>, M. LE GUELLEC<sup>1</sup>, J. GROSMAN<sup>2</sup>, B. BARRÈS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Anses, INRA, USC CASPER, Lyon, France

<sup>2</sup> DGAL - Sous-direction de la qualité, de la santé et de la protection des végétaux.

**RÉSUMÉ**

Le suivi des résistances du mildiou de la vigne vis-à-vis de fongicides inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire (amisulbrom, amétoctradine et cyazofamide), du fluopicolide et de la zoxamide a été réalisé annuellement dans le cadre du plan de surveillance de la DGAL de 2015 à 2017. Les analyses comportaient des tests biologiques et biomoléculaires. Les résultats révèlent une situation préoccupante pour les inhibiteurs du complexe III, avec une augmentation des populations présentant une résistance liée à la surexpression de l'alternative oxydase (AOX), affectant les trois inhibiteurs, et la détection régulière de résistances de cible à l'amétoctradine et la cyazofamide. Concernant le fluopicolide et la zoxamide, seuls des tests biologiques ont été réalisés. Des populations avec des souches résistantes ont été détectées ponctuellement en 2016 et 2017 uniquement pour le fluopicolide.

Mots-clés : Mildiou de la vigne, résistance, QiI, QioI, fluopicolide, zoxamide.

**ABSTRACT**

FUNGICIDES RESISTANCE IN VINE DOWNY MILDEW (*PLASMOPARA VITICOLA*) - RESULTS OF ANNUAL SURVEY FROM 2015 TO 2017 ON THE DIRECTION OF FRENCH PLANT PROTECTION  
Annual survey of downy mildew fungicides resistance was carried out from 2015 to 2017 under the direction of Ministry of Agriculture. This monitoring concerned : three 3 complex III inhibitors (amisulbrom, ametoctradin and cyazofamid), fluopicolide that affects spectrin-like proteins in the cytoskeleton and zoxamide that inhibits cellular division by acting on  $\beta$ -tubulin. Biological and biomolecular assays were performed for the analyses about the complex III inhibitors. Results reveal a worrying situation for these fungicides because of an increase in populations of resistance determined by the overexpression of the alternative oxidase (AOX); target site resistance was also detected for ametoctradin and cyazofamid. For fluopicolid and zoxamide, only biological assays were performed. Populations with resistant strains were detected punctually in 2016 and 2017 only for fluopicolid.

Keywords: downy mildew, resistance, QiI, QioI, fluopicolid, zoxamide.

## INTRODUCTION

Cette étude présente la synthèse des résultats des tests de résistance du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) entre 2015 et 2017, issu du plan national de surveillance des phénomènes de résistance. Ce plan est mis en place annuellement dans le contexte du suivi des effets non intentionnels des pratiques agricoles, intégré dans le plan Ecophyto. Piloté par la Sous-Direction de la Qualité, de la Santé et de la Protection des Végétaux de la Direction Générale de l'Alimentation, il a pour objet de recueillir des informations sur d'éventuelles dérives de sensibilité des bio-agresseurs aux produits de protection des plantes. Les prélèvements de matériel végétal sont réalisés selon un plan établi par les experts de la DGAL, de l'Anses-CASPER et de l'INRA, selon une analyse de risque prenant en compte les demandes du terrain. Les résultats de ce plan de surveillance permettent d'établir des recommandations dans le cadre de la note technique commune (Gestion des résistances des maladies de la vigne).

Entre 2015 et 2017, le plan de surveillance des phénomènes de résistance chez *P. viticola* a concerné cinq fongicides : la zoxamide, un inhibiteur de la division cellulaire via une action sur la  $\beta$ -tubuline, le fluopicolide qui affecte le cytosquelette cellulaire par son action sur les spectrines et trois inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire : l'amisulbrom, la cyazofamide et l'amétoctradine. Ces trois substances actives interagissent avec le cytochrome *b*, protéine transmembranaire de la membrane mitochondriale. L'amisulbrom et la cyazofamide se fixent sur le site de fixation du coenzyme Q à l'intérieur de la membrane mitochondriale : ce sont des QiI (Quinone inside Inhibitors). L'amétoctradine était précédemment considérée comme QoSI (Quinone outside Stigmatellin binding Inhibitor). Une étude récente sur son mode de liaison, a révélé que ce fongicide peut interagir avec les sites Qi et Qo (Dreinert et al., 2018) du cytochrome *b*, et présente une meilleure affinité pour le site Qi, d'où son reclassement parmi les QioI (Quinone outside inside Inhibitor). Pour ces cinq fongicides, des tests biologiques de sensibilité ont été réalisés au laboratoire sur des populations collectées dans les différentes régions viticoles françaises. Pour l'amisulbrom, les tests ont été réalisés avec et sans inhibiteur de la respiration secondaire afin de discriminer les résistances liées à une modification de la cible de celles non liées à la cible, i.e. impliquant une voie alternative de la respiration. Cette voie, située en amont du cytochrome *b*, résulte de la surexpression d'une alternative oxydase (AOX) (Wood and. Hollomon, 2003 - Fehr et al, 2015). Cette étude présente également le déterminisme moléculaire de la résistance de cible à l'amétoctradine observée dans des populations de *P. viticola*, ainsi que l'outil moléculaire pour détecter l'allèle impliqué dans cette résistance.

## MATERIEL ET MÉTHODE

### ÉCHANTILLONNAGE ET MULTIPLICATION *IN VITRO* DE *P. VITICOLA* AVANT LES TESTS DE RESISTANCE AUX FONGICIDES

Les prélèvements au terrain ont été réalisés de juin à septembre dans des parcelles où une pression de sélection avec au moins l'une des substances actives étudiée existe (amisulbrom, cyazofamide, amétoctradine, fluopicolide ou zoxamide). Dans chacune des parcelles échantillonnées, trente à quarante feuilles présentant des symptômes de mildiou ont été collectées au hasard. Le nombre annuel de prélèvements reçus a varié en fonction de la pression de la maladie : 13 en 2015, 53 en 2016 et 33 en 2017. Au laboratoire, après élimination des anciennes sporulations par lavage à l'eau, les lésions de mildiou sont placées en chambre humide à 20°C pendant 24 heures afin d'obtenir de nouvelles sporulations. Celles-ci permettent l'obtention d'une suspension de sporanges qui est ensuite utilisée pour la multiplication *in vitro* de *P. viticola*. L'inoculation des sporanges est réalisée sur la face abaxiale de morceaux de feuilles de *Vitis vinifera* (cv. Cabernet Sauvignon) sur milieu water agar amendé en kinétine. Après un passage à 20°C et à l'obscurité, l'excès d'eau a été aspiré entre 48 et 72 heures après inoculation, puis les feuilles sont restées à 20°C sous une photopériode (16h de jour/8h

d'obscurité). Les tests biologiques ont été effectués avec les sporulations obtenues une semaine après inoculation si la quantité de sporanges était suffisante. Sinon, des inoculations hebdomadaires ont été répétées (pendant 1 à 4 semaines) jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante de sporanges pour procéder aux tests biologiques.

Pour les analyses de biologie moléculaire, deux stratégies d'échantillonnage différentes ont été réalisées. En 2015 et 2016, les sporanges de *P. viticola* ont été collectés sur les feuilles infectées *in vitro*, après au moins une étape de multiplication en laboratoire. En 2017, afin de réduire les biais que pourrait induire l'étape de multiplication *in vitro*, des lésions uniques ont été prélevées directement sur les feuilles. Pour chaque vignoble échantillonné, 30 lésions de 6 mm de diamètre provenant de 30 feuilles différentes ont été placées individuellement dans un microtube. Les sporanges et les lésions individuelles ont été maintenus à -80°C jusqu'à l'extraction des ADN.

### **TESTS DE RESISTANCE AUX FONGICIDES**

La sensibilité aux fongicides de chaque population échantillonnée a été déterminée avec la méthode des disques foliaires décrite par Micoud *et al* (2015). Brièvement, pour chaque substance active et concentration testées, trois gouttelettes de 15 µL d'une solution constituée d'un mélange à volume égal d'une suspension de sporanges (à une concentration de  $2 \cdot 10^5$  sporanges/mL) et d'une solution de fongicide sont déposées sur la face abaxiale de chaque disque de feuille (10 disques au total par modalité). L'intensité de la sporulation à chaque point d'inoculation a été estimée visuellement 7 jours après inoculation. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport au témoin non traité (*i.e.* sans fongicide).

En fonction des années, les tests biologiques ont été réalisés avec différentes substances actives. Pour les inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire : les tests ont été réalisés de 2015 à 2017 avec l'amisulbrom (Philagro, France) et l'amétoctradine (BASF, Allemagne). En 2017, la cyazofamide (ISK Biosciences, Japon) a également pu être testée sur certaines populations. Pour les trois substances actives, deux concentrations de fongicides ont été testées :  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , qui est une dose discriminante (équivalent à un FR>30 basé sur la CMI) et  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Pour l'amisulbrom, les tests biologiques sont réalisés selon deux modalités : avec et sans inhibiteur de la respiration secondaire *via* l'ajout d'acide salicylhydroxamique à  $80 \text{ mg.mL}^{-1}$  (SHAM - Sigma-Aldrich®) en sus de la substance active. La comparaison des résultats obtenus avec et sans SHAM permet de distinguer la résistance liée à la respiration secondaire (AOX), responsable d'une résistance croisée aux inhibiteurs du complexe III (dénommée « résistance AOX » dans la suite), d'un mécanisme de résistance spécifique, comme la modification de la cible du fongicide. Pour la cyazofamide et l'amétoctradine seules les modalités avec SHAM ont été réalisées. En 2016 et 2017 deux substances actives supplémentaires ont été testées pour une partie des échantillons : la zoxamide et le fluopicolide. Les tests de résistance à la zoxamide ont été effectués en gamme de doses (0 - 0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Pour le fluopicolide, les doses discriminantes de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (équivalent à un FR>30 basé sur la CMI) et  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  ont été retenues pour différencier les souches sensibles des souches résistantes.

### **TESTS BIOMOLECULAIRES**

#### Isolement de l'ADN pour les tests de biologie moléculaire

Le broyage du matériel fongique a été réalisé après ajout d'une bille d'acier dans chaque microtube et l'utilisation d'un TissueLyser II (Qiagen®) afin de réaliser deux cycles de broyage de 30s à 30Hz. Les extractions d'ADN de *P. viticola* ont ensuite été réalisées selon une procédure CTAB-alcool isoamylique / chloroforme (Dufour *et al* ; 2011).

#### Séquençage du cytochrome *b*

En raison de la longueur du gène du cytochrome *b* (environ 1100 pb), le séquençage a été effectué avec deux paires d'amorces : « Pv-P5 (TGAATTTAATAGTCCTTGGTA from Chen et al. 2011) / PvCytb1rev (GGATGACCTAAAGTATTAGG) » et « PvCytb2sens (CGCCGTTGATAATCCAACAT) / PvCytb2Rev (ATCCAGCCGATACTGAACCA) ». Chaque couple d'amorces permet l'amplification d'un fragment d'environ 800 pb. Les deux amplicons se chevauchent partiellement (environ 200 pb) et ils permettent l'obtention de la séquence complète du gène du cytochrome *b*. Les deux amplifications de PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel 30 µL contenant 15 µL du kit multiplex Qiagen®, 0,6 µM d'amorces sens et anti-sens et 10 à 100 ng d'ADN. Les cycles PCR consistaient en une activation de la Taq à 95°C pendant 15 min, suivie de 35 cycles de PCR comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, une étape d'hybridation pendant 60s à une température de 55°C et 62°C, pour les couples Pv-P5/PvCytb1 et PvCytb2sens/PvCytb2Rev, respectivement puis d'une étape d'élongation de 60s à 72°C. Une étape d'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 5 min. Les produits de PCR ont été séquencés en utilisant la méthode Sanger par Genewiz® (South Plainfield, États-Unis).

#### PCR allèle spécifique pour détecter la résistance de cible à l'amétoctradine

Un alignement complet de la séquence du cytochrome *b* d'échantillons résistants et sensibles a révélé qu'un polymorphisme nucléotidique (SNP) était lié à une résistance de cible à l'amétoctradine (voir la section résultats). Un outil moléculaire avec deux PCR spécifiques à chacun des allèles (AS-PCR) a été développé afin d'identifier l'allèle sauvage de l'allèle muté. Pour chaque amorce sens, l'extrémité 3' se termine sur le SNP et est spécifique au nucléotide sauvage ou mutant (amorce sauvage spécifique «Pv-Cytb-S34S-F3; amorce mutante spécifique Pv-Cytb-S34L-F1»). L'amorce anti-sens était commune aux deux AS-PCR. L'amplification par PCR a été effectuée dans un volume réactionnel final de 25 µL contenant 1 x de multiplex Qiagen, 0,62 µM de chacune des amorces (Pv-Cytb-S34S-F3 : ATTATTTTTATGGATTCGGTTC ou Pv-Cytb-S34L-F1 : ATTATTTTTATGGATTCGGTTT avec Pv-Cytb-R1 : ACCAACCGTTATTTACATCAC ; les bases soulignées sont des « Locked Nucleic Acids ») et 1 µL d'ADN. Le cycle de PCR consistait en une activation de la Taq à 95°C pendant 15 minutes, suivie d'une PCR « touchdown » avec une dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 65°C pendant 30s pendant les 20 premiers cycles et à 64°C. Pour les 15 derniers cycles. L'étape d'élongation a été effectuée à 72°C pendant 60s. Une élongation finale de 5 min à 72°C a été réalisée. Les produits de PCR ont été séparés en utilisant une cartouche de type « screening » du système Qiaxcel® (QX Size Marker 100 bp-2,5 kb ; QX Alignment Marker® 15 pb - 3 kb ; méthode AM420).

## RESULTATS

### TESTS DE RESISTANCE AUX FONGICIDES

#### Tests de résistance aux inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire :

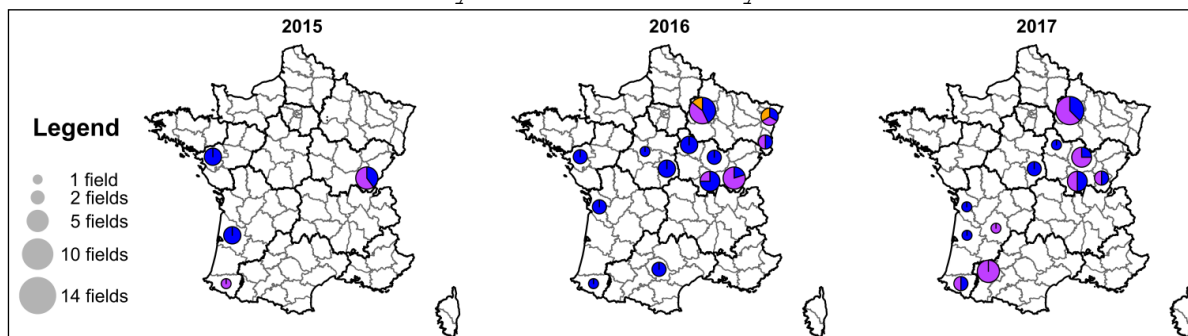
##### Sensibilité des populations à l'amisulbrom et résistance AOX :

De 2015 à 2017, les tests de résistance à l'amisulbrom sans SHAM ont été réalisés sur 85 populations (12 en 2015, 42 en 2016 et 31 en 2017). Plus de 42% des échantillons (37) présentaient des sporulations à 1 mg.L<sup>-1</sup> d'amisulbrom. A l'exception de deux prélèvements de 2016, toutes ces populations devenaient sensibles à l'amisulbrom en présence de SHAM. Pour les deux populations résistantes au mélange amisulbrom + SHAM, les résultats obtenus n'ont pas été confirmés lors d'un second test biologique et ils n'ont donc pas donné lieu à de plus amples investigations.

Pour les 35 autres populations, l'implication de l'alternative oxydase est clairement démontrée par le retour d'une sensibilité à l'amisulbrom lors de l'ajout de SHAM. La sensibilité des populations de *P. viticola* à l'amisulbrom en présence ou non de SHAM est réalisée dans notre laboratoire depuis 2012. L'analyse de l'évolution de la résistance de type AOX de 2012 à 2017, avec un modèle linéaire généralisé, montre un accroissement significatif de la fréquence des populations présentant ce phénotype (données non présentées). En conclusion, les populations présentant des souches dites AOX sont annuellement détectées dans les vignobles du nord-est (Bourgogne-Franche-Comté et Champagne) et en 2017, la résistance AOX non spécifique est également bien présente dans le sud-ouest (Figure 1). En 2017, cette résistance a été détectée dans plus de la moitié des parcelles (18 parcelles/31).

**Figure 1 :** Cartographie de la distribution des populations de *P. viticola* résistantes AOX en France de 2015 et 2017. La taille des diagrammes est proportionnelle au nombre de populations analysées par département. Le bleu et le violet représentent, respectivement, les populations sensibles et résistantes AOX. L'orange représente les populations où une résistance de cible à l'amisulbrom a été détectée mais non confirmée lors d'un 2<sup>ième</sup> test.

**Figure 1:** Maps of the distribution of AOX resistance populations of *P. viticola* in French between 2015 and 2017. Pie chart areas are proportional to the number of populations sampled in a department. Blue and purple represent sensitive and AOX resistance populations, respectively. Orange represents populations in 2016 where target site resistance to amisulbrom was detected but not confirmed by a second bioassay.



#### Sensibilité des populations à la cyazofamide + SHAM

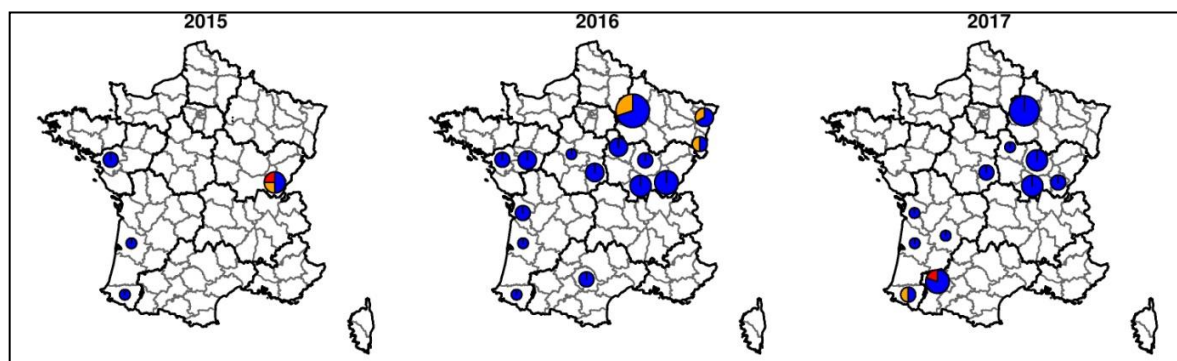
Les tests biologiques de résistance à la cyazofamide en présence de SHAM ont été réalisés en 2017, sur 18 prélèvements provenant de 10 départements différents du sud-ouest et du nord-est de la France. Deux populations, provenant du Gers, étaient résistantes à 1 mg.L<sup>-1</sup> de cyazofamide + SHAM.

#### Sensibilité des populations à l'amétoctradine + SHAM :

De 2015 à 2017, les tests biologiques avec de l'amétoctradine + SHAM ont été réalisés sur 83 populations (8 en 2015, 44 en 2016 et 31 en 2017). Neuf populations ont présenté des sporulations en présence du mélange amétoctradine (1 mg.L<sup>-1</sup>) + SHAM. Ces populations, présentant un mécanisme de résistance n'impliquant pas la respiration alternative (AOX), ont été détectées ponctuellement lors des trois années de monitoring. Ainsi, en 2015, les deux parcelles concernées par la résistance spécifique étaient situées dans le département du Jura (Figure 2). Une seule de ces populations était toujours résistante lors du second test biologique. En 2016, 5 populations, toutes originaires de vignobles situées dans le nord-est de la France, se sont avérées résistantes à l'amétoctradine en présence de SHAM lors de premier test seulement (Figure 2). En 2017, seules deux parcelles, situées dans le sud-ouest, présentaient cette résistance spécifique à l'amétoctradine (Figure 2). Une seule était toujours résistante lors du second test biologique.

**Figure 2** : Cartographie des populations de *P. viticola* analysées lors des tests biologiques avec l'amétoctradine + SHAM entre 2015 et 2017. La taille des diagrammes est proportionnelle au nombre de parcelles analysées par département (cf. Figure 1). Le bleu et le rouge, représentent, respectivement, les populations sensibles et résistantes. L'orange représente les populations où la résistance de cible à l'amétoctradine n'a pas été confirmée lors d'un second test biologique.

**Figure 2:** Maps of the distribution of target site resistance to ametoctradin populations of *P. viticola* in French vineyards determined by bioassays between 2015 and 2017. Pie chart areas are proportional to the number of populations sampled in a department (cf. Figure 1). For bioassays maps, blue and red represents sensitive and resistant populations, respectively. Orange represents populations where target site resistance to ametoctradin was detected but not confirmed by a second bioassay.

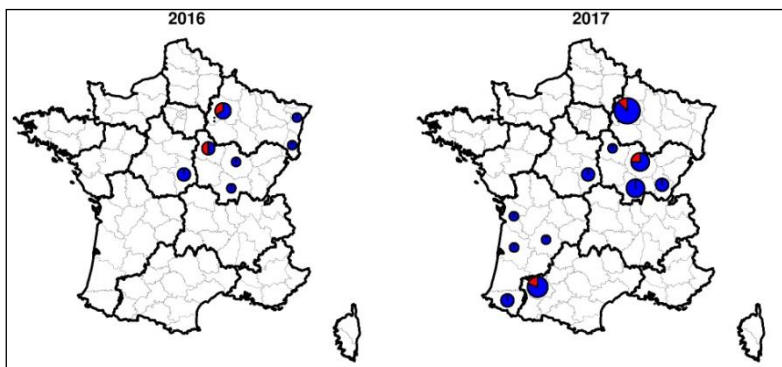


#### Sensibilité des populations au fluopicolide

Les tests de résistance au fluopicolide ont été réalisés en 2016 et 2017 sur, respectivement, 11 et 31 prélèvements. Des populations résistantes à la dose de 1 mg.L<sup>-1</sup> et au-delà, ont été détectées dans cinq populations (2 en 2016 et 3 en 2017) (Figure 3).

**Figure 3** : Cartographie par départements des populations de *P. viticola* analysées lors des tests biologiques avec le fluopicolide en 2016 et 2017. La taille des diagrammes est proportionnelle au nombre de parcelles analysées pas département (cf. Figure 1). Le bleu et le rouge, représentent, respectivement, les populations sensibles et résistantes.

**Figure 3:** Map of the distribution of mapping of populations of *P. viticola* analyzed in biological tests with fluopicolid in 2016 and 2017. Pie chart areas are proportional to the number of populations sampled in a department (cf. Figure 1). Blue and red, respectively, represent susceptible and resistant populations.



#### Sensibilité des populations à la zoxamide

Les tests de résistance vis-à-vis de la zoxamide ont été réalisés en 2016 et 2017 sur, respectivement, 18 et 23 populations de 14 départements différents.

Aucune population résistante n'a été détectée à la dose correspondant à la CMI des souches sensibles : 1 mg.L<sup>-1</sup>.

## TESTS BIOMOLECULAIRES

### Recherche de la substitution S34L impliquée dans la résistance de cible à l'amétoctradine

Les séquençages du cytochrome *b* de sporulations obtenues en présence d'amétoctradine + SHAM de deux populations (références 15-083 et 17-083) ont mis en évidence la présence d'une mutation ponctuelle dans le gène du cytochrome *b* (numéro d'accèsion: MF102263 pour 15-083 et MG757168 pour 17-083). Cette mutation induit le remplacement d'une sérine par une leucine au niveau du codon 34 (S34L). Ces deux populations ne présentaient pas de sporulations en présence de 1 mg.L<sup>-1</sup> d'amisulbrom + SHAM ou de cyazofamide + SHAM. Seule une des deux populations, porteuse de la substitution G143A (15-083), était également résistante à l'azoxystrobine.

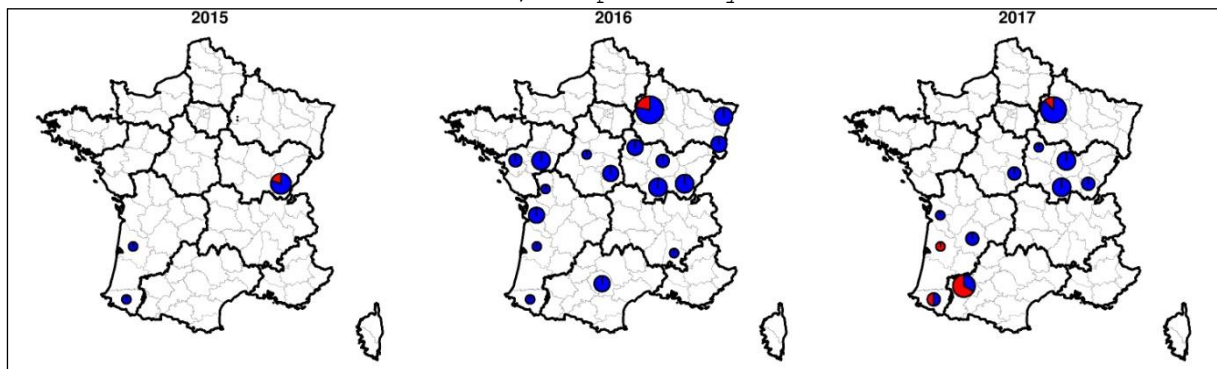
Un outil de biologie moléculaire a été développé afin de rechercher la présence de l'allèle muté (S34L) et non muté via une PCR allèle spécifique. Ainsi de 2015 à 2017, la détection de la substitution S34L a été effectuée sur 89 populations. En 2015, sur les sept vignobles analysés, la substitution a été détectée dans une seule population (en «Bourgogne - Franche-Comté»). En 2016, sur les 49 vignobles testés, l'allèle S34L a été détecté dans deux populations (3%), situées Champagne (Figure 4).

En 2017, les analyses ont été réalisées directement sur des lésions individuelles de mildiou reçues au laboratoire. La substitution S34L a été détectée dans 22 lésions individuelles sur les 1011 analysées (2,2%). La substitution était présente dans sept vignobles différents sur les 34 testés (18%); six d'entre eux étaient situés dans les vignobles du sud-ouest et un en Champagne (Figure 4). La substitution n'a généralement été détectée que dans quelques lésions sur les 30 analysées, à l'exception d'un prélèvement, où 36% des lésions testées possédaient la substitution S34L. Dans 75% des cas, les deux allèles (c'est-à-dire mutants et non mutants) ont été détectés ensemble dans les lésions.

La comparaison des résultats obtenus à l'aide de l'analyse biomoléculaire et des tests biologiques révèle des divergences entre les deux tests. Sur les dix vignobles où l'allèle mutant a été détecté, 5 échantillons étaient résistants lors du premier test biologique avec de l'amétoctradine + SHAM, et seuls 2 l'étaient toujours lors du 2ème test. Dans quatre vignobles, les tests biologiques n'ont pas mis en évidence de souches résistantes. Enfin, le dernier prélèvement n'a pas fait l'objet de test biologique.

**Figure 4** : Cartographie de la présence de la substitution S34L dans les populations de *Plasmopara viticola* échantillonnées en France de 2015 à 2017. La taille des diagrammes est proportionnelle au nombre de parcelles échantillonnées par département (cf. Figure 1). Le rouge et le bleu représentent, respectivement, les populations où la substitution a été ou n'a pas été détectée.

**Figure 4**: Maps of the distribution of S34L substitution in populations of *P. viticola* in French vineyards by biomolecular assays between 2015 and 2017. Pie chart areas are proportional to the number of populations sampled in a department (cf. Figure 1). Red and blue represent population where the S34L substitution was detected or not, respectively.



#### Séquençage du gène codant pour le cytochrome *b* des sporulations résistantes de cible à la cyazofamide

Les sporulations présentes avec cyazofamide en présence de SHAM ont été récoltées pour les deux populations résistantes en tests biologiques. Le séquençage du cytochrome *b* a montré la présence de l'insert E203-DE-V204, conséquence de la duplication de six nucléotides. D'autres auteurs (Cherrad *et al.* 2018 et Lebaudy *et al.* 2018) confirment la détection d'une résistance liée à la cible pour la cyazofamide et l'associent à l'insertion E203-DE-V204 affectant le cytochrome *b*.

## DISCUSSION

Le plan de surveillance annuel concernant la résistance de *P. viticola* à différentes familles de fongicides a permis de confirmer la présence de populations présentant une résistance non spécifique aux inhibiteurs du complexe III *via* la respiration secondaire. Ce suivi montre également la présence de deux résistances de cible affectant le cytochrome *b* : la substitution S34L impliquée dans la résistance à l'amétoctradine et l'insert E203-DE-V204 associé à la résistance à la cyazofamide. Enfin, cette étude révèle l'existence de populations de *P. viticola* résistantes au fluopicolide en France.

#### Occurrence de la résistance AOX aux inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire

La voie de la respiration alternative qui confère une résistance croisée du mildiou aux fongicides inhibiteurs du complexe III (azoxystrobine, pyraclostrobine, cyazofamide, amisulbrom et amétoctradine) s'est avérée bien présente dans le vignoble français et en progression depuis 2012.

Ce mécanisme est considéré comme une voie moins efficace pour la production d'énergie comparée à la chaîne classique de transfert d'électrons (Wood and Hollomon, 2003) et son impact dans les vignobles reste à préciser. Néanmoins, une étude a montré que la résistance AOX peut engendrer des facteurs de résistance élevés (>100) *in vitro* vis-à-vis de différents inhibiteurs du complexe III (Fehr *et al.*, 2015). Ce mécanisme pourrait donc permettre la survie d'une plus grande population de *P. viticola* et ainsi augmenter le risque de sélection d'autres mécanismes de résistance, notamment de cible (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008 ; Wood and Hollomon, 2003 ; Miguez *et al.*,



2004). En cela, l'augmentation de la fréquence de cette résistance est préoccupante.

#### La résistance de cible à l'amétoctradine dans les vignobles français

Notre étude a révélé la présence de souches de *P. viticola*, résistantes spécifiquement à l'amétoctradine via un mécanisme de modification de la cible. Ce mécanisme est lié à une substitution de l'acide aminé en position 34 du cytochrome *b* (S34L), constituant le site Qi. Notre étude montre qu'une mutation dans le site Qi, est susceptible d'être à l'origine d'une perte de sensibilité à l'amétoctradine chez *P. viticola* sans entraîner de résistance, à la dose discriminante testée (1 mg.L<sup>-1</sup>), vis à vis des QiI (amisulbrom et cyazofamide) ou des QoI (azoxystrobine, test en dose discriminante à 10 mg.L<sup>-1</sup>).

À ce jour, la présence et la fréquence de résistance de cible à l'amétoctradine dans les populations françaises de *P. viticola* semblent être faibles. En 2017, la substitution S34L a été recherchée en analysant des lésions foliaires individuellement. Les allèles sauvages et résistants ont généralement été détectés simultanément dans la lésion. Ce fait peut s'expliquer par la co-infection de la lésion, phénomène déjà décrit dans plusieurs pathosystèmes (Tollenaere *et al.*, 2012 ; Lopez-Villavicencio *et al.*, 2007) ou par l'hétéroplasmie (présence de plus d'un type d'ADN mitochondrial dans la même cellule). Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces co-détections sont le fait de souches en mélange ou d'un mélange d'ADN mitochondrial dans une souche.

Les divergences entre les résultats obtenus lors des tests biologiques et l'outil moléculaire soulignent la complémentarité des deux méthodologies. De telles divergences entre des tests *in vitro* et biomoléculaires ont déjà été rapportées pour *P. xanthii* (Vielba-Fernandez *et al.*, 2018) et étaient liées à de l'hétéroplasmie. Une autre cause potentielle de divergence pourrait résulter des étapes de multiplications nécessaires pour les tests biologiques, cette étape étant toujours délicate pour les parasites biotrophes. Il est possible que les mitochondries mutantes (en cas d'hétéroplasmie) ou les mutants (en cas de souches sensibles et mutantes dans la population) soient perdues lors de l'étape de multiplication, soit à cause de la dérive génétique ou d'un potentiel coût biologique associé à la substitution S34L.

Cette hypothèse d'une pénalité de fitness serait en accord avec le faible nombre de populations (deux sur huit) dans lequel nous avons pu confirmer le phénotype résistant lors du second test biologique, qui nécessite une ou des étape(s) de multiplication(s) supplémentaire(s). Déterminer le coût biologique potentiel de la substitution S34L nécessite de plus amples investigations et apparaît important pour la connaissance de l'impact de cette résistance au terrain et sa gestion future.

#### La résistance de cible à la cyazofamide

Les tests de résistance à la cyazofamide, réalisés en 2017, n'apportent pas une vision exhaustive de la présence de cette résistance en France. Les deux populations résistantes présentent une résistance liée à un mécanisme de cible déjà identifié l'insertion de deux acides aminés entre les positions 203 et 204 du cytochrome *b* (E203-DE-V204). L'une des parcelles avec des souches résistantes à la cyazofamide comportait également des souches avec une résistance liée à la cible pour l'amétoctradine.

#### La résistance au Fluopicolide

Entre 2016 et 2017, les tests de résistance au fluopicolide ont permis de détecter ponctuellement des populations résistantes dans 5 parcelles sur les 42 prélevées. L'une de ces parcelles comportait également des souches avec une résistance de cible à l'amétoctradine (S34L).

## CONCLUSION

Le contrôle de *P. viticola* dans les vignobles est un enjeu phytosanitaire important. La surveillance de l'émergence des phénomènes de résistances dans les populations de mildiou de la vigne est à ce titre stratégique. La situation des fongicides ciblant les inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire est préoccupante à deux titres. En premier lieu, la résistance non liée à la cible de type AOX qui confère une résistance croisée à tous les inhibiteurs du cytochrome b est en progression dans les vignobles français. Ce phénomène peut représenter une base pour une évolution vers des souches plus compétitives, et donc plus problématiques, dans le futur. La deuxième inquiétude vis-à-vis de ces fongicides est l'apparition de résistances liées à la cible, pour certaines substances actives, qui pourraient grandement affecter le contrôle de *P. viticola* si leur fréquence progressait. A ce jour, la résistance à l'amétoctradine et la résistance à la cyazofamide ont été identifiées. Les mutants sont toutefois pour l'instant soit peu fréquents, soit présents uniquement localement. Leurs évolutions spatiales et temporelles seront à surveiller de près ces prochaines années. Des populations résistantes au fluopicolide ont également été identifiées. A ce jour, seule la zoxamide semble épargnée par la résistance dans les populations de mildiou de la vigne.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient toutes les personnes qui ont participé à la collecte et à l'envoi des prélèvements. Ce projet a été partiellement financé et soutenu par l'Anses via la taxe sur les ventes de produits phytosanitaires. Le produit de cette taxe est affecté à l'Anses pour financer la mise en place du système de surveillance des effets néfastes des produits phytopharmaceutiques, appelé «phytopharmacovigilance» (PPV), institué par la loi française du 13 octobre 2014 sur l'avenir de l'agriculture.

## BIBLIOGRAPHIE

- Cherrad S., Hernandez C., Steva H., Vacher S., 2018 - Résistance de *Plasmopara viticola* aux Inhibiteurs du complexe III : Un point sur la caractérisation phénotypique et génotypique des souches. 12ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes: Tours, France.
- Chen W.-J., Delmotte F., Cervera S.-R., Douence L., Greif C., Corio-Costet, M.-F., 2007 - At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16, 5162-5172.
- Corio-Costet M.-F., Dufour M.-C., Cigna J., Abadie P., Chen, W.-J., 2011 - Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 2, 315-329.
- Dreinert A., Wolf A., Mentzel T., Meunier B., Fehr M., 2018 - The cytochrome bc 1 complex inhibitor Ametoctradin has an unusual binding mode. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*; 1859, 8, 567-576
- Fehr M., Wolf A., Stammler G., 2015 - Binding of the respiratory chain inhibitor ametoctradin to the mitochondrial bc1 complex. *Pest Management Science*; 72, 3, 591-602.
- Fernández-Ortuño D., Torés J.-A., De Vicente A., Pérez-García A., 2008 - Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*; 11, 1, 1.
- Kunz S., Lutz B., Deising H., Mendgen K., 1998 - Assessment of Sensitivities to Anilinopyrimidine- and Strobilurin-fungicides in Populations of the Apple Scab Fungus *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology*; 46, 5-6, 231-238.

Lebaudy A., Araki S., De Amarin V., Derumier A., Archer E., Giraud F., 2018 - Identification of a mutation in the *cytb* gene associated to resistance to cyazofamid in Grape Downy Mildew. *12ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes*: Tours, France

Lopez-Villavicencio M., Jonot O., Coantic A., Hood M.-E., Enjalbert J., Giraud T., 2007 Multiple infections by the anther smut pathogen are frequent and involve related strains. *PLoS Pathogens*; 3, 11.

Micoud A., Remuson F., Le Guellec M. and Grosman J., 2015 - La résistance de *Plasmopara viticola* aux fongicides - Résultats des plans de surveillance de la DGAL-SDQPV en 2012 et 2014. In *AFPP - 11ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes*: Tours, France, 1-10.

Miguez M., Reeve C., Wood P.-M. and Hollomon D.-W., 2004 - Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Management Science*; 60, 1, 3-7.

Tollenaere C., Susi H., Nokso-Koivisto J., Koskinen P., Tack A., Auvinen P., Paulin L., Frilander M.-J., Lehtonen R., Laine A.-L., 2012 - SNP design from 454 sequencing of *Podosphaera plantaginis* transcriptome reveals a genetically diverse pathogen metapopulation with high levels of mixed-genotype infection. *PLoS One*; 7, 12.

Vielba-Fernandez A., Bellón-Gómez D., Tores J.-A., de Vicente A., Perez-Garcia A., 2018 - Fernandez-Ortuno D., Heteroplasmy for the cytochrome b gene in *Podosphaera xanthii* and its role in resistance to QoI fungicides in Spain. *Plant Disease*.

Wood P.-M., Hollomon D.-W., 2003 - A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science*; 59, 5, 499-511.