
Bilan : Plan de surveillance 2017

Résistance aux SDHI chez *Erysiphe necator*, l'agent de l'oïdium de la vigne

Objectif : Développement de méthode

Rédacteurs : Séverine Fontaine, Laetitia Caddoux, Benoit Barrès

Contexte

Erysiphe necator, agent de l'oïdium de la vigne, est un parasite obligatoire qui peut se développer uniquement sur du matériel végétal jeune et réceptif (feuilles de vigne). Il est généralement difficile, à partir d'un échantillon de terrain, de disposer d'inoculum pour la réalisation de tests biologiques ce qui rend donc délicat la réalisation des tests de sensibilité aux fongicides *in vitro*. Le développement de techniques de biologie moléculaire représente donc une alternative de choix pour étudier les résistances aux fongicides chez ce phytopathogène dès lors que le mécanisme de résistance en jeu est connu et caractérisé au niveau génétique.

Les moyens de lutte contre ce phytopathogène peuvent reposer sur l'utilisation de fongicides notamment des inhibiteurs de la respiration cellulaire tels que les fongicides de la famille des SDHI ('Succinate dehydrogenase inhibitors'). Des cas de résistance à ces fongicides ont déjà été mis en évidence chez plusieurs phytopathogènes. Les mécanismes en jeu impliquent généralement une mutation de la cible de ces fongicides, le succinate déshydrogénase (SDH). Cette enzyme est constituée de quatre sous unités, les mutations impliquées dans la résistance aux SDHI sont généralement situées sur les sous unité B (SDHB) et C (SDHC) de la protéine. Chez *E. necator*, deux mutations impliquées dans la résistance aux SDHI ont été détectées sur chacune de ces unités (SDHB H242R / SDHC G169D) [Note technique commune Vigne 2018]. L'objectif du Plan de surveillance 2017, était de rechercher la présence de l'une de ces mutations dans des populations d'oïdium provenant de parcelles où une pression de sélection aux substances actives de la famille des SDHI (fluopyram, boscalide, ...) existait.

Matériels et Méthodes

1) Prélèvements

Les prélèvements, réalisés de juin à fin septembre 2017, étaient constitués de 30 feuilles ou d'une dizaine de grappes avec des symptômes d'oïdium récents. Pour 2017, des prélèvements devaient être réalisés dans 10 parcelles réparties dans 10 régions viticoles différentes (Instruction technique - DGAL/SDQSPV/2016-992). Ces populations ont été prélevées selon le protocole de prélèvement décrit en Annexe 1. En 2017, 5 parcelles ont été reçues sur les 10 parcelles prévues (Figure 1).

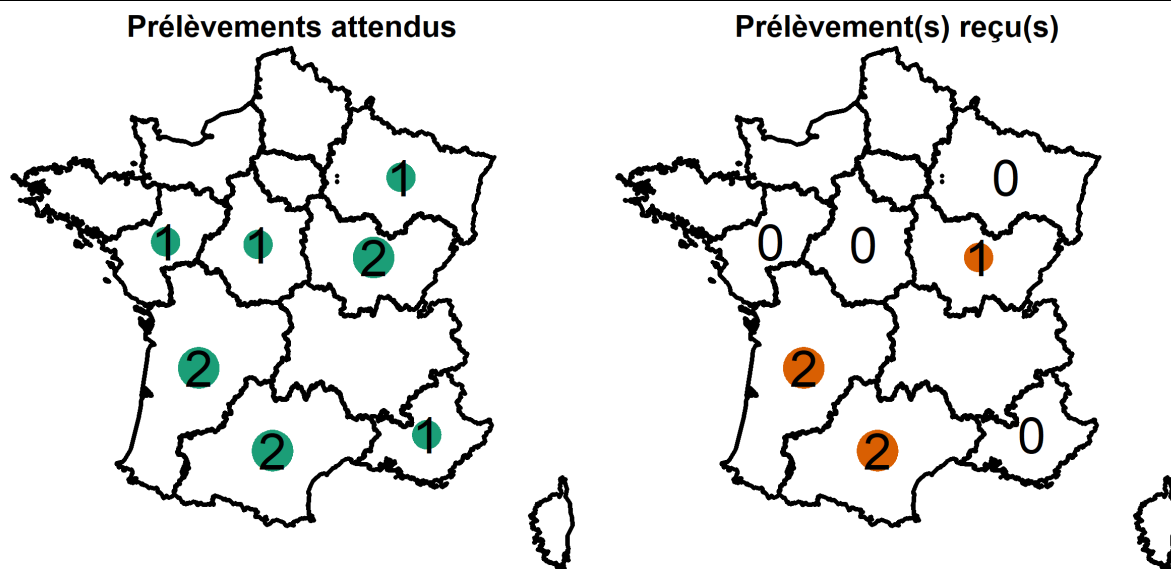


Figure 1 : Répartition des prélèvements prévus et reçus en fonction des régions.

2) Protocole de test

L'objectif de ce plan de surveillance était de séquencer les sous unités B et C du succinate déshydrogénase de l'oïdium de la vigne. Dans un premier temps des essais d'extraction d'ADN provenant d'une lésion d'oïdium et de mycélium gratté sur les baies oïdiées issues d'une même grappe ont été réalisés. Le protocole d'extraction d'ADN retenu est une extraction au CTAB avec une étape de purification au chloroforme – phénol – isoamylalcool. Puis, à partir des informations concernant les séquences présentes dans les bases de données (www.ncbi.nlm.nih.gov et www.ensemblgenomes.org) plusieurs couples d'amorces ont été définies afin de pouvoir séquencer les gènes des deux sous unités par la méthode Sanger. Les couples d'amorces définies ont permis le séquençage total des gènes des deux sous unités : SDHB et SDHC.

Résultats et Interprétations

1) Résultats du plan

Les prélèvements provenaient des régions Bourgogne (1), Occitanie (2) et Nouvelle Aquitaine (2). Dans chaque prélèvement, un nombre variable d'échantillons a pu être analysé (Annexe 2). Au total, l'ADN de 17 échantillons a été extrait et séquencé pour les deux sous unités SDHB et SDHC.

2) Interprétation

Ces premiers travaux concernant la résistance d'*E. necator* aux fongicides de la famille des SDHI ont bien permis de mettre au point une méthode pour séquencer entièrement les sous-unités B et C de la succinate deshydrogenase. *In fine*, aucune des mutations, déjà identifiée chez *E. necator*, n'a été mise en évidence dans les 17 échantillons analysés provenant de 4 parcelles exploitables ciblées pour leur pression de sélection aux SDHI (Figure 2).

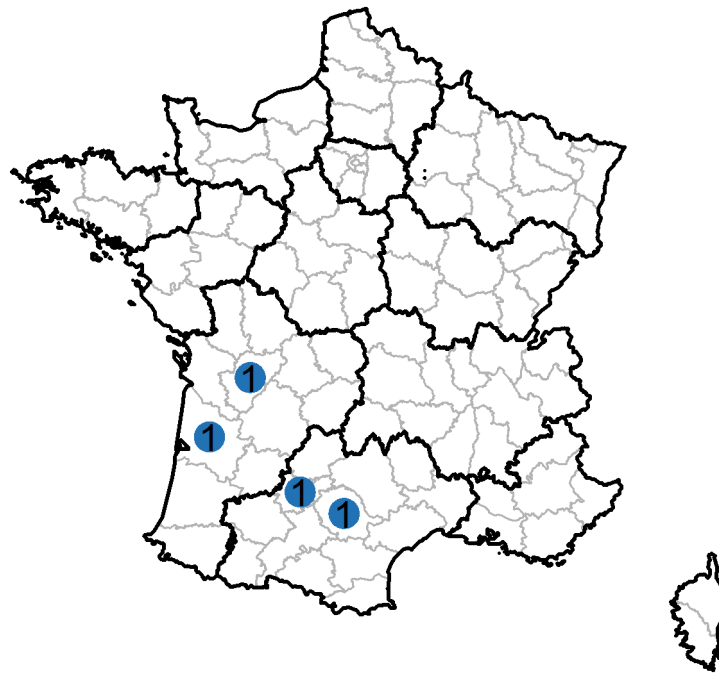


Figure 2 : Cartes des résultats de la recherche de mutation(s) liée(s) à la résistance aux SDHI chez *E. necator*. La couleur bleue représente les prélèvements dans lesquels aucune résistance n'a été détectée. La couleur rouge représente les prélèvements dans lesquels une résistance a été détectée selon le protocole utilisé. Le chiffre à l'intérieur des camemberts représente l'effectif pour lesquels un résultat a été obtenu.

Conclusion

La méthode d'analyse par séquençage Sanger développée ici, bien qu'assez facile à mettre en œuvre, oblige à l'analyse individuelle des lésions ou des grappes. À terme, il serait intéressant de développer des méthodes d'analyses avec les nouvelles techniques de séquençage afin de séquencer des zones ciblées du SDHB ou du SDHC pour plusieurs individus en même temps. Ces techniques permettraient de réaliser des analyses en population. À noter, le protocole développé ici permet de vérifier l'absence ou la présence de mutations sur le SDHB et SDHC déjà caractérisées d'un point de vue phénotypique et ne donne donc pas une vision exhaustive de la sensibilité des souches d'*E. necator* vis-à-vis des fongicides de la famille des SDHI.

Partenaires

Nous remercions Jacques Grosman, Expert national viticulture et animateur du réseau des experts nationaux de la protection des végétaux ainsi que tous les organismes qui ont participé à l'envoi des prélèvements nécessaires au plan de surveillance :

- Chambre régionale d'agriculture Bourgogne Franche-Comté - Site Bretenière
- Sciences Agro Atlantique
- Chambre Agriculture de Charente-Maritime
- Chambre Agriculture du Tarn
- Chambre Agriculture de Haute Garonne

Références

Instruction technique - DGAL/SDQSPV/2016-992 :
<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2016-992>

Note technique vigne :
https://www.r4p-inra.fr/wp-content/uploads/2018/03/NC2018_mildiou_oidium_botrytis_vigne.pdf

Date de validation / dernière édition : 05/03/19

Annexe(s)

Annexe 1

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Erysiphe necator / vigne / SDHI

Objet : Développer une méthode de biologie moléculaire pour identifier, chez l'oïdium de la vigne, des phénomènes de résistances aux SDHI liées à des modifications de la cible.

Choix des parcelles : Les prélèvements sont à réaliser dans des parcelles où il existe une pression de sélection aux substances actives de la famille des SDHI (fluopyram, boscalid,...). Le nombre de prélèvements par région est précisé dans l'annexe 3 de la Note de Service DGAL/SDQSPV/2016-992.

Période(s) de prélèvement : de juin à fin septembre – PAS D'ENVOI du 7 au 18 août

Collecte : un prélèvement est constitué comme suit

- 30 feuilles ou parties de grappes avec des symptômes d'oïdium récents
- Faire des prélèvements sur des ceps distincts et répartis sur l'ensemble de la parcelle
- Ne pas prélever de feuilles ou de grappes humides

Conditionnement :

- Pour les feuilles : Empiler-les à plat les unes sur les autres en intercalant régulièrement du papier absorbant.
- Envelopper l'ensemble des feuilles et des grappes dans du papier absorbant et placer le prélèvement dans un sachet plastique fermé bien hermétiquement.
- Regrouper ensemble les sachets contenant d'une même parcelle dans un carton rigide
- Conserver l'ensemble des prélèvements dans une glacière puis au réfrigérateur jusqu'à l'envoi

Expédition :

- compléter la fiche pour chaque prélèvement de manière exhaustive
- joindre cette fiche au prélèvement
- envoyer par Chronopost les échantillons le plus rapidement possible après le prélèvement, **en début de semaine** (du lundi au mercredi)
- prévenir le laboratoire par courriel juste avant l'envoi (severine.fontaine@anses.fr ; laetitia.caddoux@anses.fr)

NE PAS ENVOYER DE PRELEVEMENT LES SEMAINES 32 ET 33 (du 7 au 18 août)

ANSES LYON - Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires

Secteur Biologie Moléculaire

31 avenue Tony Garnier – 69364 LYON Cedex 07

Tél : 04.78.72.65.43 (standard) – 04.78.69.68.37 (ligne directe)

Fax : 04.78.61.91.45

Annexe 2

Liste et caractéristiques des prélèvements reçus, du nombre d'échantillons par prélèvement et résultats des séquençages (SDH : Succinate deshydrogenase)

référence Anses du prélèvement	date de réception	date de prélèvement	référence expéditeur de prélèvement	région	Nombre d'échantillons analysés	Résultats
17-089	20/07/2017	18/07/2017	17-021-001	Bourgogne	4	Inexploitables
17-118	02/08/2017	01/08/2017	17-33-001	Nouvelle Aquitaine	9	Pas de mutation connue identifiée sur les sous unité B et C du SDH
17-119	02/08/2017	31/07/2017	17-16-001	Nouvelle Aquitaine	2	Pas de mutation connue identifiée sur les sous unité B et C du SDH
17-120	02/08/2017	31/07/2017	17-81-001	Occitanie	3	Pas de mutation connue identifiée sur les sous unité B et C du SDH
17-141	05/09/2017	05/09/2017	17-82-009	Occitanie	3	Pas de mutation connue identifiée sur les sous unité B et C du SDH