

Résistance de l'Oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) vis-à-vis des QoI

PLAN DE SURVEILLANCE 2013

Diffusion : Mars 2014

Introduction et mise en garde de la DGAL :

Ce bilan a été réalisé par l'Anses suite à l'analyse des échantillons prélevés dans le cadre du réseau national de surveillance biologique du territoire auquel participent les partenaires engagés dans l'axe 5 du plan Ecophyto. Ce bilan contribue au rapport national sur la surveillance biologique du territoire remis au Parlement conformément aux dispositions du Code Rural. Ce bilan a vocation à être diffusé largement au sein du réseau de partenaires de la surveillance biologique du territoire.

Les plans de surveillance « résistance » sont intégrés dans le volet « suivi des Effets Non Intentionnels » du dispositif national de surveillance biologique du territoire (axe 5 du plan Ecophyto). Ils concourent à l'analyse de risque phytosanitaire et au suivi des mécanismes de résistance, contribuant ainsi à l'objectif de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.

Ces plans de surveillance constituent un outil d'alerte pour la DGAL. C'est dans cet objectif que sont définis le nombre d'échantillons et la nature des parcelles et/ou pratiques de traitements recherchées dans chaque région (Note de service DGAL/SDQPV/N2013-8086 du 15 mai 2013). Ces programmes sont construits pour une lecture nationale principalement, et ils contribuent globalement à l'amélioration des suivis post-AMM.

Pour les professionnels, la valorisation de ces résultats s'effectue essentiellement au travers des notes communes nationales (ex: mildiou et oïdium de la vigne, tavelure du pommier, sclerotinia du colza...).

Cette source d'information doit être complétée par les résultats des essais « résistances » et des monitoring pilotés par d'autres opérateurs.

RÉSUMÉ

Un plan de surveillance est réalisé, depuis six ans sur la résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides de la famille des QoI (inhibiteurs de la respiration cellulaire). L'objectif de ce plan est d'assurer un suivi de l'évolution de la résistance de l'oïdium de la vigne à cette famille de fongicides.

Le mécanisme responsable de cette résistance est lié à une mutation qui affecte la protéine cible des QoI : le cytochrome b. Cette mutation (G143A) est responsable d'un très fort niveau de résistance vis-à-vis de cette famille.

La première détection de cette résistance date de l'année 2008, dans le vignoble d'Armagnac. Depuis cette date, il apparaît que la situation s'est peu à peu dégradée pour parvenir en 2013 à un constat alarmant. En effet, bien que recherché sur un nombre de populations plus réduit que les années précédentes, l'allèle de résistance est détecté en 2013 dans la *quasi*-totalité des parcelles échantillonnées et la fréquence de cet allèle est supérieure à 75% dans trois quart des populations étudiées.

Mots-clés : *Erysiphe necator*, plan de surveillance, QoI, allèle 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 faciles à mettre en œuvre 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), puis adapté à l'Anses-Lyon fin 2009.

Les analyses réalisées pour le plan de surveillance 2013 visent à rechercher des résistances liées à la modification de la cible des fongicides de la famille des QoI (Quinone outside Inhibitors). Cette famille, à laquelle appartiennent les strobilurines, comprend un ensemble de substances actives inhibitrices du complexe de la respiration cellulaire.

La résistance à cette famille a été détectée en France, en Armagnac, en 2008 (informations relayées sur le site du FRAC : Fungicide Resistance Action Committee). Cette résistance a progressé rapidement dans la plupart des vignobles. Les recommandations de la note nationale 2013 préconisent une utilisation limitée à 1 application par an. 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. Le mécanisme de résistance 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 en position G143A.

Depuis 2008, l'unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP) de l'Anses suit l'évolution de cette résistance dans le cadre du plan de surveillance national de la DGAL « Résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides ». Le plan de surveillance 2013 avait pour objectif de poursuivre ce suivi dans neuf régions viticoles (Aquitaine, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche-Comté, Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées, Poitou-Charentes, Provence-Alpes-Côte-d'Azur, Rhône-Alpes).

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 différentes) 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 QoI (G143A) est adapté de la publication de Baudoin *et al.* (2008). Cet outil repose sur une technique de PCR quantitative. Il permet de quantifier, au sein des gènes d'une population, la proportion d'allèles mutés responsable de la résistance aux QoI.

III. Origine et nombre de prélèvements

Le plan de surveillance 2013 concernait un nombre de régions plus restreint que l'année précédente (9 *versus* 12). Au total, 48 parcelles commerciales ont été échantillonnées ainsi qu'une parcelle d'essai (Cf tableau I). Un seul prélèvement n'a pas donné de résultat exploitable. Pour deux parcelles commerciales, deux prélèvements ont été effectués, un de feuilles, l'autre de grappes. De même, pour la parcelle d'essai de la DGAL-SDQPV, plusieurs prélèvements ont été réalisés à des dates différentes, pour différentes modalités.

Au total, cette année, 55 échantillons ont été soumis à l'analyse (48 sur des parcelles commerciales et 7 sur la parcelle d'essai).

Tableau I : Nombre de parcelles prévues, prélevées et analysées selon les régions en 2013

Régions	Parcelles commerciales		Parcelles d'essais	
	Nombre prévues	Nombre reçues	Nombre reçues	Nombre de prélèvements/essais
Aquitaine	5	4		
Bourgogne	5	5		
Champagne-Ardennes	5	5		
Franche-Comté	3	5		
Languedoc-Roussillon	10	8	1	7
Midi-Pyrénées	10	6		
Poitou-Charentes	5	6		
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	5	2		
Rhône-Alpes	3	7		
TOTAL	51	48	1	7

IV. Résultats

1 - Résultats obtenus sur les prélèvements 2013

L'interprétation des analyses permet de connaître le pourcentage d'allèles portant la mutation G143A présent dans chaque échantillon.

Le tableau II présente, par région, le nombre d'échantillons appartenant à chacune des classes de fréquence de l'allèle muté (cf. annexe 1 pour les données détaillées par région) ainsi que la fréquence moyenne de l'allèle de résistance dans l'ensemble des échantillons de chaque région. Il faut noter que, pour les deux parcelles avec deux prélèvements (feuilles + grappes), seuls les résultats des analyses sur grappes ont été retenus pour cette synthèse (ceux obtenus sur feuilles figurent à l'annexe 1).

Pour les parcelles d'essais "érosion d'efficacité", seul le résultat de la modalité témoin a été retenu et comptabilisé dans la synthèse de ce plan de surveillance. Les résultats détaillés des prélèvements effectués dans les différentes modalités des essais sont présentés dans le paragraphe V.

La figure 1 permet de visualiser, pour chaque région, le pourcentage d'allèle de résistance aux QoI appartenant à chacune des classes de fréquence de l'allèle G143A.

Tableau II : Répartition des échantillons par région en fonction de la proportion d'allèle muté G143A

Régions	nombre total de parcelles analysées	Nombre d'échantillons par classe de fréquence d'allèle G143A						Fréquence moyenne de l'allèle de résistance
		Absent	Traces*	2 à 24 %	25 à 49%	50 à 74%	75 à 100%	
Aquitaine	4	0	0	0	0	2	2	85%
Bourgogne	5	0	0	0	0	0	5	97%
Champagne-Ardennes	4	0	0	2	0	0	2	55%
Franche-Comté	5	0	0	0	0	0	5	100%
Languedoc-Roussillon	9	0	0	1	1	0	7	80%
Midi-Pyrénées	6	0	0	0	0	1	5	90%
Poitou-Charentes	6	1	0	0	3	0	2	54%
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	2	0	0	0	0	0	2	100%
Rhône-Alpes	7	0	0	1	0	0	6	86%

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

Le nombre de parcelles échantillonnées par région n'est jamais très élevé (5 parcelles en moyenne) mais l'allèle de résistance aux QoI a été détecté dans les 9 régions échantillonnées. Pour toutes les régions, à l'exception de Poitou-Charentes, au moins la moitié des populations analysées présente plus de 75% d'allèle muté G143A. Pour les régions Bourgogne, Franche-Comté et Midi-Pyrénées, c'est même la totalité des populations analysées (ou la presque totalité pour Midi-Pyrénées) pour lesquelles l'allèle G143A est présent à une fréquence d'au moins 75 %. Il en est de même pour la région PACA mais sur un nombre d'échantillons très limité (2).

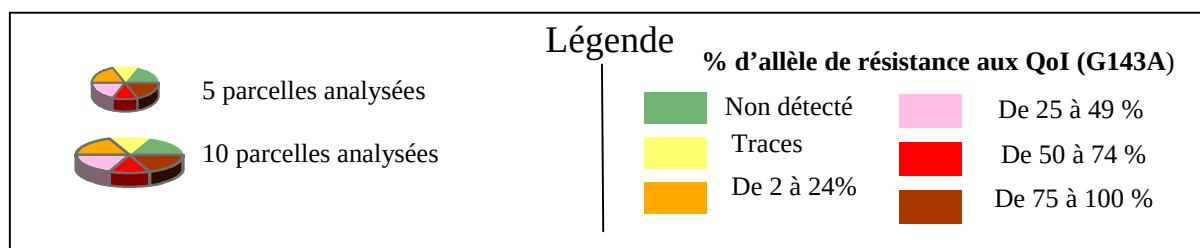
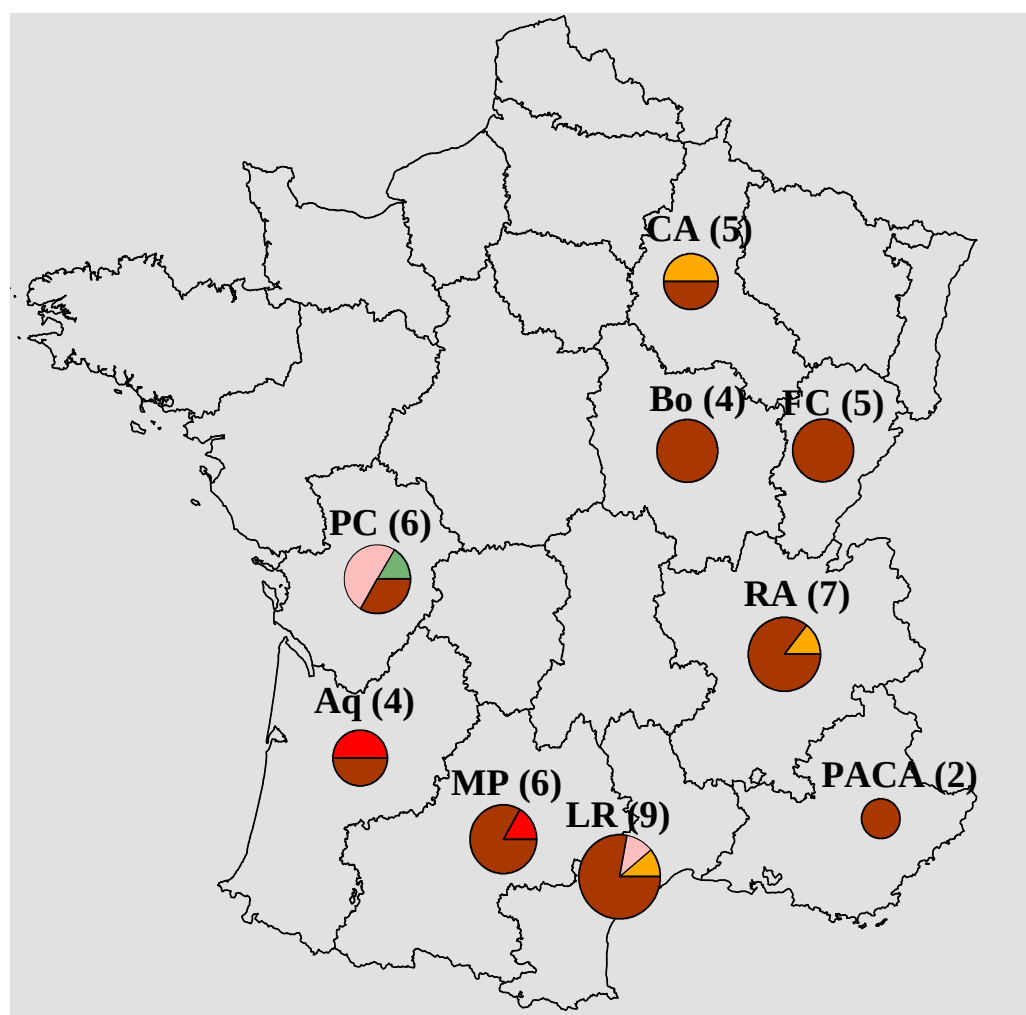
Enfin, la seule population où l'allèle muté n'a pas été détecté provient de la région Poitou-Charentes.

Bien que le nombre de parcelles analysées par région en 2013 soit nettement plus faible qu'en 2012, la comparaison des résultats entre 2012 et 2013 fait également apparaître quelques éléments remarquables :

- **en Aquitaine** : en **2012**, sur 12 populations analysées, la situation était très contrastée : 6 populations étaient classées en "absence d'allèle G143A" et 5 dans la classe "75 à 100% d'allèle G143A" ; en **2013**, sur 4 populations analysées, deux sont situées dans la classe "50 à 74% d'allèle G143A" (mais avec des fréquences de mutation très proches de 75% pour les grappes et encore supérieures pour les feuilles - Cf Annexe 1) et 2 dans la classe "75 à 100% d'allèle G143A",

- en **Champagne** : en **2012**, sur 10 populations testées, 8 étaient classées en "absence d'allèle G143A", 1 en "traces" et 1 présentait 100% d'allèle muté ; en **2013**, sur 4 populations analysées, 2 se situent dans la classe "2 à 24% d'allèle G143A" et 2 présentent 100% d'allèle muté,
- en **Poitou-Charentes** : alors que sur 11 parcelles analysées au total en 3 ans (entre 2010 et 2012), il n'avait **jamais été décelé de populations possédant l'allèle de résistance**, en **2013**, sur 6 populations, il ressort qu'une seule ne présente aucun allèle muté, 3 se situent dans la classe "25 à 49% d'allèle G143A" et 2 présentent 100% d'allèle muté.

Figure 1 : Répartition par région des échantillons 2013 en fonction de leurs pourcentages d'allèle G143A (le chiffre entre parenthèse indique le nombre de parcelles analysées pour chaque région)



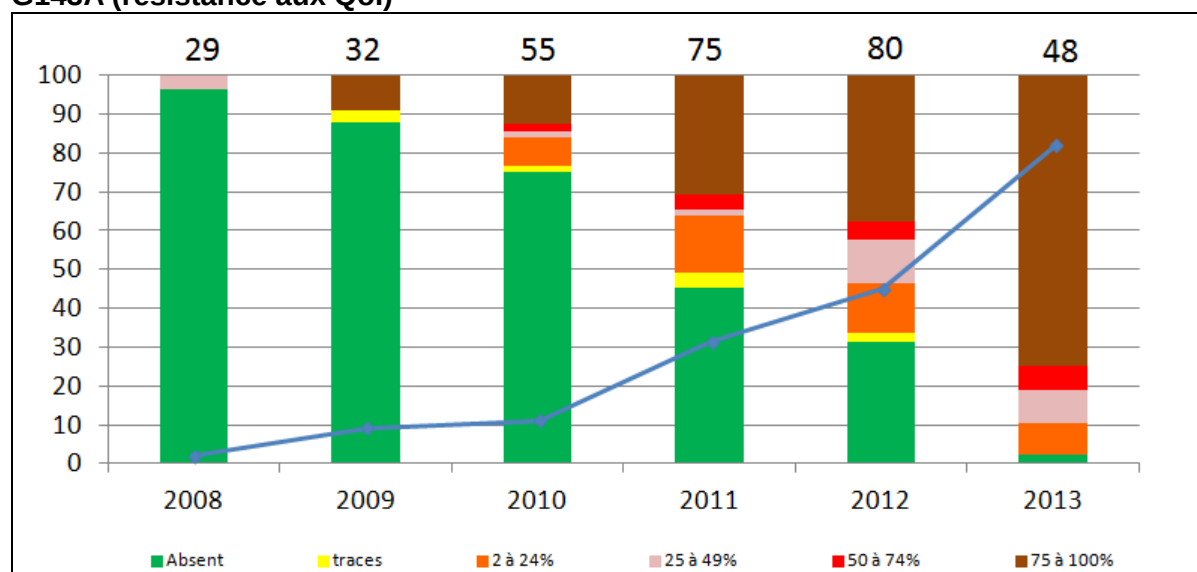
2 - Synthèse des résultats obtenus depuis 2008

Ce plan de surveillance ayant été réalisé sans discontinuité depuis 2008, il est aujourd'hui possible de présenter une synthèse des résultats obtenus depuis cette date. Le tableau III et la figure 2 représentent, de 2008 à 2013, la répartition des échantillons analysés en fonction de la fréquence de l'allèle G143 obtenue.

Tableau III : Répartition des échantillons (en pourcentage) en fonction du pourcentage d'allèle G143A par année

ANNEE	Nombre d'échantillons analysés	Pourcentage d'échantillons par classe de fréquence d'allèle G143A					
		Absent	traces	2 à 24%	25 à 49%	50 à 74%	75 à 100%
2008	28	97	0	0	3	0	0
2009	32	88	3	0	0	0	9
2010	55	75	2	7	2	2	13
2011	75	45	4	15	1	4	31
2012	80	31	3	13	11	5	38
2013	48	2	0	8	8	6	75

Figure 2 : Répartition par année des échantillons en fonction du pourcentage d'allèle G143A (résistance aux QoI)



 : Fréquence moyenne annuelle de l'allèle G143A au sein des populations analysées

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

Globalement, la fréquence de l'allèle de résistance aux QoI (mutation G143A) est en progression constante depuis 2008. En effet, malgré un nombre d'échantillons analysés très différent selon les années, la comparaison des résultats, année par année depuis 2008, montre une forte tendance à une inversion des pourcentages entre les classes "Absents" et "75 à 100% d'allèle G143A" (tableau III). On constate notamment qu'en 2012, 31% des échantillons ne présentaient pas l'allèle de résistance alors que **38%** appartenaient à la classe "plus de 75% d'allèle G143A". En 2013, ces proportions sont passées à **2%** d'échantillons sans présence de l'allèle de résistance et **75%** appartenant à la classe "plus de 75% d'allèle G143A" (avec, cependant, un nombre de parcelles analysées largement inférieur en 2013 : 48 *versus* 80 en 2012).

Il est évident que l'on assiste à une progression de la résistance aux QoI. Cette progression est d'autant plus nette depuis l'année 2011. L'évolution se situe à deux niveaux : d'une part, la proportion de populations présentant l'allèle G143A et, dans ces populations, la fréquence de cet allèle. Ainsi, entre 2012 et 2013, l'allèle G143A a été détecté dans une proportion beaucoup plus importante de parcelles (98% de parcelles avec détection de l'allèle muté en 2013 *versus* 68% en 2012) et, en moyenne, à une fréquence bien plus élevée (81.9% en 2013 *versus* 44.6% en 2012).

V. La parcelle d'essai

La recherche d'allèles de résistance aux QoI a été effectuée sur un essai "érosion d'efficacité" en région Languedoc-Roussillon. Les résultats détaillés pour chacune des modalités sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de la recherche de l'allèle de résistance de cible aux QoI (G143A) pour la parcelle d'essai "érosion d'efficacité" – 2013

Référence Anses	Référence expéditeur	Date de réception au laboratoire	Modalité	% d'allèle G143A (résistance aux QoIs)
13-138	13-LR-02essai	14/08/13	1-Stroby	100
13-152	13-LR-34-03essai 2ème envoi	03/09/13		100
13-139	13-LR-34-04essai	16/08/13	2-Flint	94,98
13-154	13-LR-34-02 2ème envoi	05/09/13		98,01
13-142	13-LR-34-03essai	16/08/13	témoin de vraisemblance	91,42
13-153	13-LR-34-01essai 2ème envoi	05/09/13		86,46
13-141	13-LR-34-01essai	16/08/13	témoin exclu	83,21

Les résultats obtenus sur les échantillons provenant de l'essai "érosion d'efficacité", doivent être impérativement comparés aux observations faites sur le terrain. Leur interprétation ne peut pas être réalisée avec les seuls résultats du laboratoire.

VI. Conclusions-Perspectives

Le plan de surveillance 2013 sur la résistance de l'oïdium de la vigne aux QoI montre que **la mutation G143A poursuit sa progression**. Ainsi, l'allèle muté est présent **dans toutes les parcelles** à l'exception d'une seule parcelle (en Poitou-Charentes) sur les 48 analysées. Dans 6 régions sur les 9 concernées par le plan de surveillance, plus des trois quart des populations analysées présentent au moins 75% d'allèle muté (Bourgogne, Franche-Comté, Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées, PACA et Rhône-Alpes). Il est donc évident que l'on assiste à une progression de la résistance aux QoI, en proportion de populations présentant l'allèle G143A et, dans ces populations, en fréquence de l'allèle muté.

VII. 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.

Expert référent vigne 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.

VIII. 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 (2011). Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci*; **67**(1): 60-69

ANNEXE : OÏDIUM DE LA VIGNE 2013, Résultats détaillés par prélèvement

Région	Référence Laboratoire	Nature de l'échantillon	Essai	% d'allèles G143A (Résistance aux QoIs)
Aquitaine	13-092	feuilles	non	100
	13-165	feuilles	non	91,8
	13-198	grappes	non	74,45
	13-199	feuilles	non	85,51
	13-202	grappes	non	74,98
	13-203	feuilles	non	96,48
Bourgogne	13-091	feuilles	non	92
	13-093	feuilles	non	94,48
	13-094	feuilles	non	100
	13-126	feuilles	non	100
	13-127	feuilles	non	100
Champagne Ardenne	13-132	feuilles	non	100
	13-133	feuilles	non	100
	13-164	feuilles	non	16,83
	13-168	feuilles	non	3,73
	13-169	feuilles	non	inexploitable
Franche Comté	13-082	feuilles	non	100
	13-083	feuilles	non	100
	13-084	feuilles	non	100
	13-136	feuilles	non	100
	13-137	feuilles	non	100
Languedoc Roussillon	13-031	feuilles	non	100
	13-052	feuilles	non	100
	13-063	feuilles	non	100
	13-077	feuilles	non	100
	13-078	feuilles	non	86,22
	13-124	feuilles	non	8,16
	13-125	feuilles	non	100
	13-138	feuilles	oui	100
	13-139	feuilles	oui	94,98
	13-141	feuilles	oui	83,21
	13-142	feuilles	oui	91,42
	13-152	feuilles	oui	100
	13-153	feuilles	oui	86,46
	13-154	feuilles	oui	98,01
	13-166	feuilles	non	36,34

Région	Référence Laboratoire	Nature de l'échantillon	Essai	% d'allèles G143A (Résistance aux Qols)
Midi Pyrénées	13-148	feuilles	non	96,65
	13-149	feuilles	non	88,29
	13-150	feuilles	non	98,69
	13-161	feuilles	non	100
	13-162	feuilles	non	68,71
	13-163	feuilles	non	90,78
Poitou Charentes	13-076	feuilles	non	100
	13-123	feuilles	non	0
	13-140	feuilles	non	100
	13-195	feuilles	non	36,21
	13-196	feuilles	non	49,67
	13-219	feuilles	non	37,12
Provence Alpes Côte d'Azur	13-053	feuilles	non	100
	13-055	feuilles	non	100
Rhône Alpes	13-057	feuilles	non	100
	13-079	feuilles	non	100
	13-080	feuilles	non	100
	13-081	feuilles	non	100
	13-087	feuilles	non	86,63
	13-088	feuilles	non	100
	13-194	feuilles	non	13,98

Inexploitable : Pour certains prélèvements, les analyses qPCR n'ont pas permis l'obtention de résultats exploitables en raison d'une amplification insuffisante de l'ADN extrait.