

RESISTANCE DE *PLASMOPARA VITICOLA* AUX INHIBITEURS DU COMPLEXE III : UN POINT SUR
LA CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES SOUCHES

S. CHERRAD ⁽¹⁾, C. HERNANDEZ ⁽²⁾, H. STEVA ⁽³⁾ et S. VACHER ⁽¹⁾

⁽¹⁾ CONIDIA, Parc d'activités en Chuel Route de Chasselay, 69650 Quincieux. France.

s.cherrad@conidia.fr, s.vacher@conidia.fr

⁽²⁾ CONIPHY, Parc d'activités en Chuel Route de Chasselay, 69650 Quincieux. France.

c.hernandez@coniphy.fr

⁽³⁾ CJH, 21 C chemin de la Girotte, 33650 La Brède. France. herve.steva@orange.fr

RÉSUMÉ

Selon le FRAC, les inhibiteurs du complexe III sont classés en trois familles : les QoI (azoxystrobine, pyraclostrobine...), les QiI avec la cyazofamide et l'amisulbrom et les QoSI avec l'amétoctradine. Plusieurs populations de *Plasmopara viticola* collectées dans les vignobles français ont montré une baisse de sensibilité aux doses discriminantes d'amétoctradine (1mg/L) et de cyazofamide (1mg/L) testées avec le SHAM. La caractérisation phénotypique et génotypique des souches monosporanges isolées à partir de ces populations a montré que la perte d'efficacité de l'amétoctradine est associée avec une substitution S34L au niveau du cytochrome b. Chez les souches développant une résistance spécifique à la cyazofamide, le gène codant le cytochrome b porte une insertion de six nucléotides « **ATGAGG** » en position 604. Cette insertion entraîne une modification de la protéine avec deux acides aminés supplémentaires (HEV -> HEDEV) dans le site Qi du cytochrome b.

Mots-clés : *Plasmopara viticola*, résistance, amétoctradine, cyazofamide, cytochrome b.

ABSTRACT

According to the FRAC classification, complex III inhibitors are classified into three groups : QoIs (azoxystrobin, pyraclostrobin...), QiIs with cyazofamid and amisulbrom and QoSIs with ametoctradin. Many populations of *Plasmopara viticola* collected in French vineyards show decrease in sensitivity at discriminatory rates of ametoctradin (1mg/L) and cyazofamid (1mg/L) tested with SHAM. Phenotypic and genotypic characterization of single-spore strains isolated from these populations revealed that the decrease in sensitivity of ametoctradin is correlated with the S34L change in the cytochrome b protein. For cyazofamid resistant strains, *Cytb* gene sequence contains a six nucleotides insertion « **ATGAGG** » at position 604. This insertion leads to protein modification with two additional amino acids (HEV --> HEDEV) in the Qi site of cytochrome b.

Keywords: *Plasmopara viticola*, resistance, ametoctradin, cyazofamid, cytochrome b.

INTRODUCTION

Le cytochrome bc1 est une enzyme clé dans le transfert d'électron de la chaîne respiratoire. Il est situé dans la membrane interne mitochondriale des cellules eucaryotes. Il catalyse le transfert d'électrons de l'ubiquinol au cytochrome c et couple le transfert d'électrons avec la translocation des protons à travers la membrane interne. Le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale comporte au niveau du cytochrome bc1 une sous unité appelée cytochrome b. Le cytochrome b est composé d'un complexe de huit hélices transmembranaires codées par le génome mitochondrial (Vallières C., 2013). Ces hélices forment les sites de fixation de certains fongicides tels que l'amétoctradine et la cyazofamide. Les inhibiteurs de la respiration mitochondriale au niveau du complexe III ou cytochrome bc1 sont largement utilisés pour contrôler le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*). Ces inhibiteurs interagissent avec les deux sites de fixation du coenzyme Q situés dans le cytochrome b, le premier orienté vers l'extérieur appelé **Qo** (Quinone **o**utside) et le deuxième à proximité de la matrice mitochondriale dénommé **Qi** (Quinone **i**nside) (figure 1) (Fisher and Meunier, 2008). Les Qols (Quinone outside Inhibitors) inhibent l'oxydation du coenzyme Q situé à la surface externe du cytochrome b. Ces fongicides uni-site sont soumis à restriction d'usage à cause de la généralisation de la résistance chez le mildiou. Les Qils (Quinone inside Inhibitors) inhibent l'oxydation du coenzyme Q situé à la surface interne du cytochrome b. Ces fongicides présentent un haut niveau d'efficacité contre les Oomycètes et sont importants dans les programmes actuels de lutte contre le mildiou de la vigne.

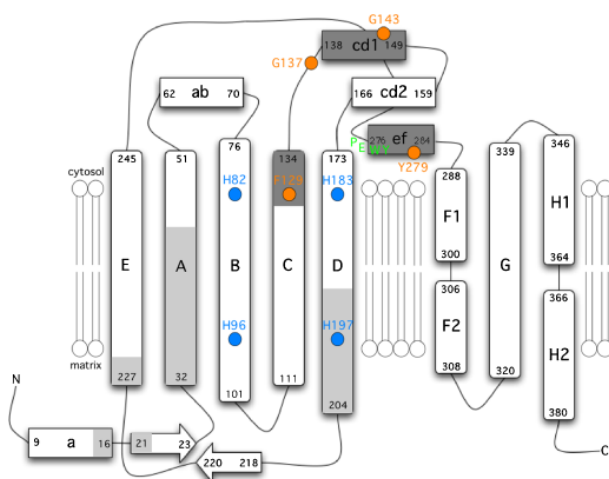


Figure 1 : Structure du cytochrome b, sous unité mitochondriale cytochrome bc1. Le site Qi est coloré en gris clair et le site Qo en gris foncé. Les mutations conférant une résistance aux Qol sont indiquées en orange (Fischer and Meunier, 2008).

(Schematic representation of the structure of cytochrome b, the mitochondrially encoded subunit of cytochrome bc1. The Qi region is in light grey; the Qo region is in dark grey. Qol resistance mutations are in orange).

Selon le FRAC, les inhibiteurs du complexe III sont classés en trois familles : les Qol (azoxystrobine, pyraclostrobine...), les Qil avec la cyazofamide et l'amisulbrom et les QoSI avec l'amétoctradine. Des travaux réalisés sur le mode d'interaction de l'amétoctradine avec le cytochrome b ont montré que cette molécule est capable d'interagir avec les deux sites Qo et Qi du cytochrome b, avec cependant une affinité plus forte pour le site Qi. L'amétoctradine interagit à des positions différentes de celles de la cyazofamide et l'amisulbrom dans le site Qi (Fehr et al., 2016; Dreiner et al., 2018).

Très rapidement, *P. viticola* a développé une forte résistance aux Qol caractérisée majoritairement par une substitution G143A sur le cytochrome b (Grasso *et al.*, 2006). Cette résistance est généralisée dans les populations naturelles. Plus récemment, des souches résistantes ont été détectées au vignoble avec d'autres inhibiteurs de la respiration comme l'amétoctradine et la cyazofamide. Au préalable, une résistance non spécifique liée à l'action de l'enzyme alternative oxydase (AOX), impliquée dans une voie alternative de la respiration, avait pu être identifiée dans des populations naturelles non soumises à la pression de sélection des QoSI ou Qil. Ces souches ont été caractérisées par des essais biologiques et le gène du cytochrome b a été séquencé pour essayer de comprendre le mécanisme de ces différentes résistances.

MATERIEL ET MÉTHODES

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE

Populations collectées et isolement de souches

Des prélèvements de feuilles infectées par le mildiou de la vigne ont été réalisés dans les principales régions viticoles françaises en 2016 et 2017. Des lots de 50 feuilles au minimum ont été collectés de façon aléatoire dans des parcelles commerciales protégées avec des programmes de traitement incluant ou non des préparations à base d'inhibiteurs du complexe III. A réception au laboratoire, des disques de 20 mm de diamètre ont été découpés dans les lésions à raison de 50 disques par échantillon. Ces disques sont placés dans des boîtes de Pétri, lavés puis séchés et mis en incubation pendant 24 heures. A partir des nouvelles sporulations, des suspensions de spores sont préparées et inoculées sur des feuilles non traitées dans le but d'obtenir un inoculum homogène et représentatif de la diversité de la parcelle.

Après 7 jours d'incubation, des tests biologiques ont été réalisés selon le mode opératoire décrit ci-après mais en utilisant uniquement des doses discriminantes des fongicides en comparaison. Les doses ont été déterminées lors des travaux de caractérisation de la ligne de base à chaque molécule (Steva, comm. pers.). Elles permettent de contrôler parfaitement le développement des phénotypes sensibles. Ainsi, chaque population a été étudiée sur l'amétoctradine utilisée à la dose de 1 mg/L seule ou en mélange avec du SHAM à la concentration de 100 mg/L. De même, la cyazofamide a été étudiée à la dose de 1 mg/L seule ou en association avec le SHAM à la dose de 100 mg/L. Le SHAM est un inhibiteur de l'alternative oxydase, et permet donc de détecter uniquement les cas de résistance liés à la cible de l'inhibiteur. Les observations de la sporulation du mildiou après inoculation sur matériel végétal traité et incubé pendant 7 jours ont permis d'isoler des souches présentant des profils de résistance différents vis-à-vis des molécules étudiées. Pour isoler des souches monosporocystes, une suspension titrée à la concentration de 100 spores/mL est préparée à partir des sporulations présentes sur les disques de feuille. Une goutte de 10 µl est déposée sur un disque de feuille de vigne non traitée. Au final, 30 disques au minimum sont inoculés avec cette suspension de spores faiblement titrée (probabilité d'avoir un sporocyste par goutte). Après incubation, les disques présentant des sporulations sont isolés et la procédure d'isolement répétée une deuxième fois. Les souches obtenues sont conservées et multipliées régulièrement pour utilisation dans les différents essais.

Tests biologiques : Présentation du test *in vivo*

Le dispositif expérimental retenu est la réalisation d'un test *in vivo* sur disques foliaires, avec une gamme de concentrations de chaque matière active et une observation de la sporulation du champignon. Des disques de 18 mm de diamètre ont été découpés dans des lots de 10 feuilles du cépage Cabernet sauvignon. Ces disques ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant des papiers filtre imbibés d'eau à raison de 10 disques par boîte.

Les formulations suivantes ont été retenues dans ce projet :

- amétoctradine (SNOOKER, 200 g/L m.a.) ;
- cyazofamide (RANMAN TOP, 160 g/L m.a.) ;
- amisulbrom (LEIMAY, 200 g/L m.a.)

Pour chaque matière active, une gamme de 7 à 8 concentrations a été adaptée à l'étude des différentes souches. Les doses varient entre 0,01 et 100 mg/L. En parallèle, toutes les doses de fongicide ont été également évaluées en mélange avec une concentration de 100 mg/L de SHAM. Les disques foliaires ont été placés en incubation dans une enceinte climatisée (21°C) et éclairée 14 heures par jour. Les gouttes ont été séchées avec du papier absorbant après 24 heures.

Une notation visuelle de la sporulation pour chaque goutte (échelle de 0 = pas de sporulation à 4 = sporulation au delà de l'impact de la goutte) a été effectuée sur les dix disques par condition après 7 jours d'incubation. L'efficacité du fongicide à une concentration donnée est calculée selon la formule suivante :

$$Efficacité = \frac{(Moyenne_{témoin} - Moyenne_{échantillon})}{Moyenne_{témoin}} \times 100$$

Après calcul de l'efficacité de chaque matière active, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée : c'est la dose procurant une efficacité de 100% sur le développement du mildiou. Cette valeur, exprimée en intervalle de doses, dépend de la gamme retenue. Pour chaque souche, les essais ont été répétés à 3 reprises dans le temps. A la fin des tests biologiques, les disques de feuilles infectées ont été congelés à -20°C pour l'extraction d'acide nucléique.

CARACTERISATION GENOTYPIQUE DES SOUCHES MONOSPORES

Extraction d'ADN et PCR

L'ADN a été extrait à partir des disques foliaires infectés par les souches monospores de *P. viticola*. Les disques congelés ont été broyés à l'azote au TissueLyser II (Qiagen, France) avec des billes en tungstène. L'extraction d'acides nucléiques à partir du broyat a été effectuée avec le kit nucleospin plant II (MacheryNagel, France) selon les recommandations du fabricant. La concentration et la qualité de l'ADN extrait ont été mesurées par spectrophotométrie avec le lecteur à microplaque Epoch (BioTek, France). L'ADN est conservé à -20°C pour les analyses PCR. Un fragment d'environ 1kb du gène codant le cytochrome b a été amplifié par PCR à partir de l'ADN des souches monospores.

La PCR a été réalisée dans un volume final de 25µl avec 30ng d'ADN en utilisant les amorces Cytb-F (5'-TGAACCTGTAAATTTAGCACAAACA-3') et Cytb-R (5'-ACAGGACATTGACCAACCCA-3') à 0,3µM. Ces amorces amplifient un fragment d'environ 1kb couvrant les substitutions S34L, G143A et l'insertion « ATGAGG ». Pour optimiser l'amplification du fragment d'intérêt, l'enzyme Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, France) a été utilisée dans les réactions de PCR selon le programme suivant : une étape de dénaturation à 95°C pendant 1 minute, 35 cycles à 95°C pendant 30 secondes et 1 minute à 60°C. Enfin une étape à 72°C pendant 1 minute est programmée. Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur LifeEco. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose par électrophorèse et les fragments d'ADN obtenus ont été séquencés chez un prestataire externe (GATC Biotech, Belgique). La migration des fragments ADN amplifiés est effectuée sur un gel d'agarose à 1,2% dans du tampon TAE (Tris Acétate EDTA).

Comparaison des séquences nucléotidiques du Cytochrome b des souches monospores

Les séquences obtenues à partir des amplicons amplifiés par PCR ont été analysées par le programme d'alignement multiple Jalview (www.jalview.org). Les séquences du *Cytb* des souches monospores ont été comparées avec la séquence putative disponible sur les bases de données (DQ459459.1). Ensuite les séquences du gène *Cytb* obtenues à partir des souches résistantes à l'amétoctradine ou à la cyazofamide ont été alignées avec les séquences des souches sensibles. L'alignement des séquences permet d'identifier les différences entre la séquence du *Cytb* putative et les séquences obtenues sur les souches monospores sensibles et résistantes.

RESULTATS

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE

VALEURS DES CMI POUR L'AMETOCTRADINE, LA CYAZOFAMIDE ET L'AMISULBROM

Le tableau 1 reporte les valeurs de CMI pour les différentes souches et les 3 matières actives comparées. Les résultats sont exprimés en intervalles de concentrations (ou en valeurs maximales) pour les molécules appliquées seules ou en mélange avec le SHAM.

Tableau 1 : Valeurs des CMI (concentration minimale inhibitrice) pour l'amétoctradine, la cyazofamide et l'amisulbrom testés sur les souches monosporocystes de *P. viticola*.

(MIC values (minimum inhibitory concentration) for ametoctradin, cyazofamid and amisulbrom tested on *P. viticola* strains)

Souches	Origine	Ametoctradine		Cyazofamide		Amisulbrom	
			+SHAM		+SHAM		+SHAM
CONI-01	Armagnac	0,1-0,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
CONI-02	Armagnac	0,1-0,3	0,1-0,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
CONI-03	Armagnac	0,1-0,3	0,1-0,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
CONI-04	Champagne	>100	0,1-0,3	10-30	<0,1	30-100	0,1-0,3
CONI-05	Cognac	0,3-1	0,3-1	30-100	10-30	3-10	0,3-1
CONI-06	Armagnac	>100	30-100	<0,1	<0,1	0,1-0,3	<0,1
CONI-07	Bordeaux	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	3-10	1-3
CONI-08	Bordeaux	>100	0,1-0,3	30-100	10-30	10-30	0,3-1
CONI-09	Bordeaux	>100	0,1-0,3	30-100	10-30	10-30	1-3
CONI-10	Bordeaux	>100	0,1-0,3	30-100	10-30	10-30	1-3
CONI-11	Champagne	>100	0,1-0,3	10-30	<0,1	30-100	0,3-1
CONI-12	Champagne	>100	0,1-0,3	10-30	<0,1	30-100	0,3-1
CONI-13	Champagne	30-100	30-100	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
CONI-14	Cognac	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1
CONI-15	Cognac	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1
CONI-16	Cognac	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1
CONI-17	Armagnac	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1

Des comportements très différents de sensibilité aux 3 matières actives ont pu être identifiés lors de ces essais. Les souches CONI-01, CONI-02 et CONI-03 sont parfaitement contrôlées par des doses faibles d'amétoctradine (0,3 mg/L) ou de cyazofamide et d'amisulbrom (<0,1 mg/l). Ces résultats sont identiques que les matières actives soient utilisées seules ou en mélange avec le SHAM.

La souche CONI-04 et les souches CONI-11/12 sont capables de se développer normalement en présence de 100 mg/L d'amétoctradine, 10 mg/L de cyazofamide et 30 mg/L d'amisulbrom. Par contre, le développement des souches est bloqué lorsque le SHAM est additionné aux différentes doses des molécules. Dans ce cas, les CMI sont inférieures à 0,3 mg/L pour l'amétoctradine et 0,1 mg/L pour la cyazofamide. Quelques nuances apparaissent entre les souches dans le cas de l'amisulbrom avec un contrôle total à 0,3 mg/L pour la souche CONI-04 et une dose efficace de 1 mg/L pour les 2 autres souches (CONI-11/12) isolées en 2017. Ces souches présentent vraisemblablement une résistance de type AOX, affectant les trois matières actives.

Les souches CONI-06 et CONI-13 ont un profil de sensibilité très différent. La CMI est supérieure à 30 mg/L pour l'amétoctradine que la molécule soit appliquée seule ou en mélange avec le SHAM. A l'inverse, ces valeurs sont faibles (<0,1 voire entre 0,1-0,3) pour la cyazofamide ou l'amisulbrom que les matières actives soient en mélange avec le SHAM ou employées seules. Ces souches présentent une résistance liée à la cible, affectant spécifiquement l'amétoctradine.

Un autre type de comportement est mis en évidence dans le cas des souches CONI-14 à CONI-17. Elles se développent en présence de 30 mg/L de cyazofamide seule ou de 10 mg/L de cyazofamide additionnée de SHAM. Avec l'amisulbrom, une croissance est notée en présence de 1 mg/L de fongicide seul ou de 0,3 mg/L avec le SHAM, ce qui reste supérieur à ce qui est observé pour les souches sensibles (<0,1 mg/l). Ces mêmes souches sont normalement contrôlées par l'amétoctradine à 0,3 mg/L avec le SHAM ou 1 mg/L sans le SHAM. Enfin, un dernier phénotype peut être caractérisé avec les souches CONI-08/09/10. L'activité des produits est comparable à celle du groupe précédent.

avec comme différence la possibilité donnée à ces dernières de se développer en présence d'amétoctradine seule à la plus forte concentration (CMI > 100 mg/L).

Ces résultats démontrent la présence de multiples phénotypes au sein des populations naturelles de mildiou de la vigne avec des résistances spécifiques identifiées soit à l'amétoctradine (souches CONI-06 ou CONI-13) soit à la cyazofamide (CONI-05, CONI-07, CONI-14/15/16/17).

CARACTERISATION GENOTYPIQUE

ANALYSE DE LA SEQUENCE DU GENE *CYTB* DES SOUCHES MONOSPORES ISOLEES

Les séquences du *Cytb* des souches résistantes ont été comparées avec la séquence putative du cytochrome b de *P. viticola* codant pour une protéine de 384 acides aminés (Référence GenBank : ABF29492.1). Ensuite, ces séquences ont été alignées avec celles obtenues à partir des souches sensibles. L'alignement avec la séquence putative montre quelques différences au niveau de la séquence nucléotidique. Ces mutations sont probablement liées à un polymorphisme naturel de l'espèce, et n'affectent pas la structure de la protéine.

LA SUBSTITUTION S34L CONFERE UNE RESISTANCE A L'AMETOCTRADINE

La comparaison des séquences *Cytb* obtenues à partir de l'ADN des souches résistantes à l'amétoctradine montre la présence d'une mutation ponctuelle. Cette mutation se traduit par la substitution d'une cytosine (position 101) par une thymine (C101T) chez les souches résistantes (codon TCA → TTA). Cette modification est observée sur les souches monospores isolées en 2016 et 2017 qui ont développées une résistance à l'amétoctradine seule et en présence de SHAM au cours du test biologique. La présence de cette mutation se traduit par la substitution de l'acide aminé serine en position 34 par une leucine (substitution S34L) sur la protéine du cytochrome b des souches résistantes (figure 3).

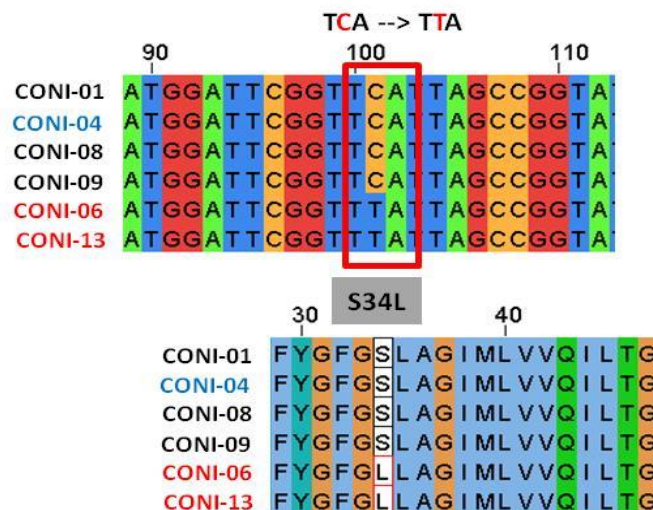


Figure 3 : Alignement des séquences du gène *Cytb* des souches monospores de *P. viticola* sensibles et résistantes à l'amétoctradine. En noir : séquences des souches sensibles à l'amétoctradine. En rouge : séquences des souches résistantes à l'amétoctradine. En bleu : séquence d'une souche AOX.

(Alignment of *Cytb* sequences of sensitive and resistant single-spore strains of *P. viticola*. In black: sequences of sensitive strains. In red: sequences of strains resistant to ametoctradin. In blue: AOX strain)

L'INSERTION DE SIX NUCLEOTIDES ATGAGG CONFERE UNE RESISTANCE A LA CYAZOFAMIDE CHEZ *P. VITICOLA*

L'amplification d'un fragment d'environ 1kb par PCR a permis de couvrir une zone plus longue du gène *Cytb*. L'alignement des séquences nucléotidiques obtenues par Jalview a permis de mettre en évidence une différence de plusieurs nucléotides. Cette variation est observée sur le cytochrome b des souches résistantes à la cyazofamide seule et additionnée de SHAM, comparées à la séquence de référence et aux séquences *Cytb* des souches sensibles. Six nucléotides supplémentaires « ATGAGG » en position 604 du gène *Cytb* sont présents sur les séquences obtenues à partir des souches résistantes à la cyazofamide (figure 4). Cette séquence modifiée entraîne une modification (HEV --> HEDEV) plus importante du cytochrome b avec une protéine plus longue (386 acides aminés) chez les souches résistantes à la cyazofamide (figure 4).

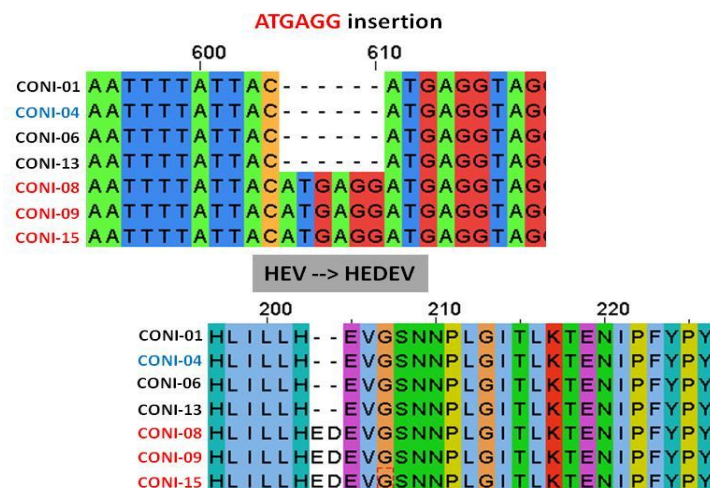


Figure 4 : Alignement des séquences du gène *Cytb* de souches monospores de *P. viticola* sensibles et résistantes à la cyazofamide. En noir : séquences des souche sensibles. En rouge : séquences des souches résistantes spécifiquement à la cyazofamide. En bleu : séquence d'une souche AOX. (Alignment of *Cytb* sequences of sensitive and resistant single-spore strains of *P. viticola* to cyazofamid. In black: sequences of sensitive strains. In red: sequences of resistant strains. In blue : AOX strain)

DES SOUCHES DE *P. VITICOLA* AVEC UNE SUBSTITUTION G143A OU LES DEUX SUBSTITUTIONS G143A ET S34L

Parmi les souches monospores isolées, plusieurs souches sont résistantes à la pyraclostrobine (Qol) et comportent une substitution G143A (résultats non présentés dans cet article). D'autres souches sont résistantes à la pyraclostrobine et l'amétoctradine et portent les deux substitutions G143A et S34L au niveau du cytochrome b (figure 5).

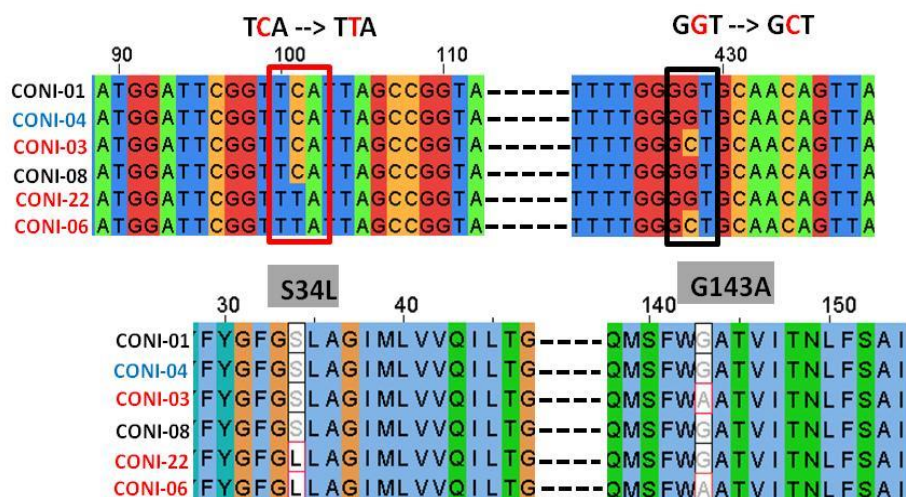


Figure 5 : Alignement des séquences du gène *Cytb* des souches monospores de *P. viticola* sensibles et résistantes à la pyraclostrobine et/ou l'amétoctradine. En noir : séquence de souches sensibles aux deux molécules. En rouge : séquences des souches résistantes. En bleu: séquence d'une souche AOX. (Alignment of *Cytb* gene sequences of sensitive and resistant single spores strains of *P. viticola* to pyraclostrobin and/or ametoctradin. In black: sequence of sensitive strain. In red: sequences of strains resistant to pyraclostrobin and ametoctradin. In blue : AOX strain)

RELATION ENTRE PHÉNOTYPE ET GÉNOTYPE

Le tableau 2 établit la relation entre les différents phénotypes et les mutations caractérisées pour chaque souche.

Tableau 2 : Valeurs des CMI (amétoctradine, cyazofamide et amisulbrom) des souches de *P. viticola* et mutations identifiées. (MIC values for ametoctradin, cyazofamid and amisulbrom of *P. viticola* strains and detected mutations)

Souches	Amétoctradine +SHAM		Cyazofamide +SHAM		Amisulbrom +SHAM		Mutations		
							G143A	S34L	Insertion HEDEV
CONI-01	0,1-0,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	-	-
CONI-04	>100	0,1-0,3	10-30	<0,1	30-100	0,1-0,3	-	-	-
CONI-02	0,1-0,3	0,1-0,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	X	-	-
CONI-03	0,1-0,3	0,1-0,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	X	-	-
CONI-11	>100	0,1-0,3	10-30	<0,1	30-100	0,3-1	X	-	-
CONI-12	>100	0,1-0,3	10-30	<0,1	30-100	0,3-1	X	-	-
CONI-06	>100	30-100	<0,1	<0,1	0,1-0,3	<0,1	X	X	-
CONI-13	30-100	30-100	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	X	X	-

CONI-05	0,3-1	0,3-1	30-100	10-30	10-30	0,3-1	-	-	X
CONI-07	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	3-10	1-3	-	-	X
CONI-14	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1	-	-	X
CONI-15	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1	-	-	X
CONI-16	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1	-	-	X
CONI-17	0,3-1	0,1-0,3	30-100	10-30	1-3	0,3-1	-	-	X
CONI-08	>100	0,1-0,3	30-100	10-30	10-30	0,3-1	-	-	X
CONI-09	>100	0,1-0,3	30-100	10-30	10-30	1-3	-	-	X
CONI-10	>100	0,1-0,3	30-100	10-30	10-30	1-3	-	-	X

Aucune modification génétique n'a pu être identifiée pour les souches sensibles, ni pour la souche CONI-04 qui se développe à de fortes concentrations des 3 molécules appliquées seules sans le SHAM mais qui présente un profil de souche sensible après addition de SHAM. Cette souche est représentative des phénotypes présentant une résistance non spécifique de type AOX.

Les souches portant la mutation S34L montrent une forte résistance à l'amétoctradine, associée ou non au SHAM, et restent sensibles aux Qil. Dans notre échantillonnage, ces souches portent également la substitution G143A associée à la résistance aux Qols (résistance multiple) mais ne sont pas associées à la résistance de type AOX.

Toutes les souches qui ont l'insertion ATGAGG en position 604 montrent une forte résistance à la cyazofamide associée au SHAM, et une résistance modérée à l'amisulbrom associée au SHAM. Dans notre échantillonnage, cette substitution n'est jamais associée à la substitution S34L (également dans le site Qi), affectant l'efficacité de l'amétoctradine, ni à la substitution G143A, affectant l'efficacité des strobilurines.

DISCUSSION

Au cours de nos recherches sur le mildiou de la vigne, plusieurs populations non contrôlées par l'amétoctradine ou la cyazofamide ont été détectées dans nos bio-tests en 2016 et 2017. Ces populations ont été exploitées pour isoler des souches monospores afin de comprendre le ou les mécanismes à l'origine de ces résistances. Une caractérisation phénotypique des souches a été possible par la maîtrise des tests biologiques réalisés *in vivo* sur disques foliaires en présence de plusieurs concentrations de différents inhibiteurs étudiés seuls ou associés avec le SHAM. Des phénotypes résistants non spécifiques de type AOX ont été régulièrement détectés. Ils présentent la particularité de se développer en présence d'amétoctradine, de cyazofamide ou d'amisulbrom mais sont inhibés à de faibles doses de ces mêmes molécules après ajout de SHAM dans la solution fongicide. Notre étude confirme que l'effet de la voie AOX peut être variable d'une souche à l'autre (valeurs de CMI différentes caractérisées sur une même molécule) et ne s'exprime pas avec la même intensité sur l'amétoctradine, la cyazofamide ou l'amisulbrom. Par contre, plusieurs phénotypes résistants spécifiques à l'amétoctradine ou aux Qil (cyazofamide et amisulbrom) ont pu être caractérisés.

L'analyse des séquences nucléotidiques a révélé la présence d'une mutation ponctuelle au niveau du gène *Cytb* des souches résistantes à l'amétoctradine. Cette mutation entraîne une substitution S34L au niveau de la protéine des souches résistantes. L'acide aminé serine (position 34) est localisé au niveau du site quinone interne (**Qi**) des hélices formant la protéine du cytochrome b (Fisher and Meunier, 2008). Selon les travaux de Dreinert et ses collaborateurs (2018), l'amétoctradine pourrait se fixer sur les deux sites Qo et Qi du cytochrome b. La substitution de la serine par une leucine semble affecter l'action de l'amétoctradine sur ces souches. Par contre, l'amétoctradine est décrite dans la classification FRAC comme un Inhibiteur du site Quinone externe (**Qo**) du cytochrome b de type QoSI « Stigmatelin binding type » alors que cet acide aminé (S34) est situé dans le site Qi. Plusieurs souches résistantes à l'amétoctradine et à la pyraclostrobine appartenant à la famille des Qol ont été isolées. Ces souches sont porteuses des deux substitutions S34L et G143A au niveau du cytochrome b. La mutation G143A est largement décrite chez le mildiou et d'autres champignons phytopathogènes (Grasso *et al.*, 2006 ; Fisher and Meunier, 2008).

Une autre mutation a été détectée au niveau du *Cytb* dans le cas de souches isolées sur la cyazofamide et résistantes spécifiquement aux Qil. Cette modification se manifeste par une insertion de six nucléotides « ATGAGG » au niveau du *Cytb* de toutes ces souches résistantes et isolées en France en 2016 et 2017. La protéine codée par ce gène contient deux acides aminés supplémentaires (386 aa) comparée à celle des souches sensibles (384 aa). Cette modification de la cible des Qils (cytochrome b) est décrite pour la première fois en relation avec un phénotype de résistance. L'insertion des deux acides aminés est localisée dans le site (**Qi**) correspondant au site d'action de la cyazofamide décrit dans la littérature (Fisher and Meunier, 2008). Cette insertion n'affecte pas le mode d'action de l'amétoctradine, par contre elle réduit l'efficacité de la cyzofamide et de l'amisulbrom dans les conditions de nos bio-tests, que la molécule soit utilisée seule ou additionnée de SHAM. Ces molécules sont diversement affectées par cette insertion, les facteurs de résistance étant très élevés (>300) avec la cyazofamide et plus faibles (>10) avec l'amisulbrom.

CONCLUSION

Nos travaux complètent les connaissances sur la résistance du mildiou de la vigne aux fongicides inhibiteurs du complexe III. Ils démontrent qu'il existe dans les populations naturelles deux mécanismes de résistance : un mécanisme non spécifique lié à l'AOX et un autre spécifique lié à la

modification de la cible avec 3 allèles (G143A, S34L et insertion HEDEV) comme décrits dans cette étude. Dans le cas des mécanismes de résistance spécifiques, la gestion ne concerne que le mode d'action (QoI ou Qil) impacté par la modification de cible. Une alternance des différents modes d'action dans un même programme de traitement pourra être envisagée pour gérer l'évolution de la résistance à chaque mode d'action. Par contre, la résistance de type AOX concerne toutes les molécules et nécessite obligatoirement une gestion commune au vignoble de l'ensemble des inhibiteurs du complexe III.

Ces mécanismes sont en théorie indépendants mais peuvent se cumuler chez certaines souches. Nous avons identifié quelques phénotypes (AOX+G143A, AOX+HEDEV, G143A+S34L), mais toutes les combinaisons possibles (en particulier une résistance spécifique à l'amétoctradine et aux Qil) n'ont pas été détectées dans cette étude. Cela peut être lié à une moindre fitness de ces phénotypes ou bien à un échantillonnage limité et non dirigé vers la recherche de ces souches. Une poursuite de ces travaux initiés en 2016 s'impose pour surveiller l'apparition éventuelle de nouveaux phénotypes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Dreinert A., Wolf A., Mentzel T., Meunier B., Fehr M., 2018 - The cytochrome *bc1* complex inhibitor Ametoctradin has unusual binding mode. *Biochim Biophys Acta*, 1859/8/567-576.
- 2- Fehr M., Wolf A., Stammler G., 2016 - Binding of the respiratory chain inhibitor ametoctradin to the mitochondrial *bc1* complex. *Pest Management Science*, 72/591-602.
- 3- Fisher N. and Meunier B., 2008 - Molecular basis of resistance to cytochrome *bc 1* inhibitors. *FEMS Yeast Res*, 8/2/183-192.
- 4- Grasso V., Palermo S., Sierotzki H., Garibaldi A., Gisi U., 2006 - Cytochrome *b* structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*, 62/6/ 465-472.
- 5- Vallières C., 2013 - Agents antimicrobiens ciblant le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale : caractérisation de nouveaux inhibiteurs et étude du développement des résistances. HAL : tel-00840029