

**AFPP- 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS-8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**RESISTANCE DE *PLASMOPARA VITICOLA* AUX FONGICIDES QOIs : VARIABILITE ET
COMPETITIVITE**

M-F. CORIO-COSTET¹, M-C. DUFOUR¹, J. CIGNA¹, P. ABADIE^{1,2}, WJ. CHEN^{1,3}

1: INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave d'Ornon, France ; 2: INRA, UMR 1202 BIOGeCo, Laboratoire de génétique des arbres forestiers, 69 route d'Arcachon, 33612, Cestas, France; 3 : Institute of Oceanography, National Taiwan University, No.1 Sec. 4 Roosevelt Rd., Taipei 10617, Taiwan

RESUME :

Depuis son introduction en Europe *Plasmopara viticola* (mildiou de la vigne) développe régulièrement des résistances aux produits phytosanitaires, y compris à des molécules récentes telles que les inhibiteurs de la respiration mitochondriale de type QoI (Quinone outside Inhibitor). L'analyse du gène codant pour l'enzyme cible (cytochrome b) révèle la présence d'une mutation majeure en position G143A, impliquée dans l'acquisition de cette résistance. L'étude de la variabilité de cette zone du génome mitochondrial démontre l'existence d'au moins deux phénomènes d'apparition de la résistance indépendants chez le mildiou de la vigne en Europe. À partir de 1015 isolats de mildiou collectés dans le vignoble français en 2003 et 2004, nous montrons la prévalence de 4 haplotypes majeurs que nous avons appelés IS, IR, IIS et IIR. L'haplotype I est le plus fréquent (77,44%). La distribution des allèles de résistance en début de saison représente 23,25% en France. L'évaluation de différents paramètres impliqués dans le développement de l'agent pathogène durant son cycle de reproduction asexuée et la mise au point d'un indice de fitness (IA) ont permis d'estimer le coût de la résistance. Des tests de compétitivité réalisés entre une souche sensible et deux résistantes aux QoIs complètent cette étude qui montre que les souches résistantes possèdent un aussi bon potentiel de survie que les souches sensibles durant la phase asexuée en conditions de laboratoire, lequel dépend essentiellement de leur fitness.

Mots-clés : Mildiou de la vigne, résistance fongicide, variabilité mitochondriale, QoIs, fitness

SUMMARY:

**RESISTANCE OF *PLASMOPARA VITICOLA* TO QOI FUNGICIDES: VARIABILITY AND
COMPETITIVENESS**

The efficacy of QoI fungicides against grape downy mildews in European vineyards has decreased significantly in the last years. A single nucleotide polymorphism, G143A in the cytochrome b gene of *Plasmopara viticola* was detected to confer QoI resistance. Polymorphism analyses on the mitochondrial genome showed that 4 major haplotypes (IR, IS, IIR, IIS) coexisted in French vineyards. In France, the most frequent haplotype (IR, IS) reached 77.44% in *P. viticola* populations. The resistant alleles (IR, IIR) frequencies ranged from 0 to 75% with an average of 23.25%. Based on determination of the fitness index (Fi), QoI-resistant strains did not exhibit a cost and often tended to have good fitness. To assess these results, competition assays with different mixtures of sensitive and resistant strains using biological and molecular (Q-PCR) tests were done. The competitiveness of resistant isolates varied according to their aggressiveness index, suggesting that there is no noticeable cost of QoI resistance in controlled conditions in *P. viticola*.

Keywords: Grapevine, downy mildew, fungicide resistance, fitness,

INTRODUCTION

Plasmopara viticola, l'agent responsable du mildiou de la vigne, natif du nord de l'Amérique, a été introduit en Europe en 1878 et son contrôle nécessite de nombreuses interventions phytosanitaires. Pour limiter la maladie, de nouvelles molécules sont mises régulièrement sur le marché, dont les fongicides Qol (Quinone outside inhibitor) qui sont des inhibiteurs du cytochrome b, impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Jordan *et al.*, 1999). Introduit en France en 1998, deux ans plus tard les premiers cas de résistance étaient détectés dans le vignoble français (Magnien *et al.*, 2003). La sélection d'une mutation majeure en position G143A du gène du cytochrome b caractérise l'acquisition de la résistance de nombreux agents pathogènes dont le mildiou de la vigne aux fongicides Qols (Grasso *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2007). Une étude phylogénétique d'une large portion du génome mitochondrial (2281 pb) incluant le gène du cytochrome b a permis de démontrer l'existence de différents haplotypes (IS, IR, IIS, IIR) qui indiquent d'une part l'existence d'au moins deux événements indépendants pour la sélection de la résistance, mais également l'existence de différents groupes génétiques (voire sous-espèces) sur le continent américain (Chen *et al.*, 2007, Corio-Costet *et al.*, 2008). En France, des études de variabilité génétique réalisées à l'aide de marqueurs microsatellites confirment l'existence d'une seule espèce de mildiou en Europe qui présente une forte variabilité génétique en début de saison (Corio-Costet *et al.*, 2006).

Cependant, il existe peu de données concernant la valeur sélective (fitness) des souches de mildiou résistantes au Qols et leur maintien dans les populations. Une étude montre qu'une population artificielle contenant seulement 5% d'isolats résistants tend à augmenter sa sensibilité aux Qols (Genet *et al.*, 2006) et que dans un mélange d'isolats sensibles et résistants (99:1 ; 90:10), la population devient sensible après deux cycles de développement sur disques de feuilles (Sierotzki *et al.*, 2008). Pour comprendre l'évolution de la résistance aux fongicides, il est nécessaire de réaliser des mesures de fitness, laquelle peut être définie comme la capacité à survivre et à se reproduire d'un allèle, d'un individu ou d'un groupe, ou la capacité d'un organisme à contribuer ultérieurement à un pool de gènes (Vanderplank, 1982). Elle peut être estimée soit par des mesures de différentes composantes telles que la capacité à se reproduire, la pathogénie ou par évaluation de la compétitivité entre deux populations sur une plante hôte. La capacité des agents pathogènes en conditions naturelles à acquérir des mutations sans perte de fitness est largement méconnue, mais quelques études assurent que l'apparition de la résistance aux fongicides n'est pas forcément liée à une perte de fitness en absence de fongicide (Anderson, 2005). L'apparition rapide de la résistance aux fongicides Qols et le comportement des isolats résistants dans les populations suggèrent une bonne valeur sélective de ces isolats. Nous avons testé cette hypothèse en estimant la valeur sélective de 11 souches sensibles et 12 souches résistantes aux Qols sur la base de mesures de différents paramètres (temps de latence, taux de sporulation, fréquence d'infection) et de tests de compétitivité (Corio-Costet *et al.*, 2008a, b).

MATERIEL ET METHODE

Collection d'isolats et production d'inoculum

1015 symptômes de mildiou ont été collectés en 2003 et 2004 dans le vignoble français. Chaque symptôme provient d'une lésion isolée prélevée en début de saison. Les isolats sensibles ou résistants aux Qols utilisés pour les tests de fitness et de compétitivité ont été collectés en 2003 dans le vignoble bordelais. Ils proviennent tous d'isolement mono sporangiaux et sont conservés sur des feuilles de vigne au congélateur à -20°C. La production d'inoculum est réalisée sur des feuilles de vigne comme décrit par Chen *et al.*, 2007.

Détermination de la sensibilité aux fongicides

La sensibilité aux fongicides a été testée sur des disques de feuilles de vigne de cépage Cabernet-Sauvignon, après pulvérisation de différentes doses de fongicides sur la face

inférieure des disques. Trois gouttes de 10µl contenant 20 000 sporanges par ml ont été déposés, une fois les disques feuilles secs. L'inoculation ainsi que les lectures des tests ont été réalisés comme décrit par Genet *et al*, 1997 et Corio-Costet *et al*, 2006 après incubation dans une chambre de culture à 22°C. Le Qol utilisé a été la famoxadone (3-anilino-5-méthyl-5-(4-phenoxyphenyl)-1, 3-oxazolidine-2,4-dione) (WG 50%, Dupont de Nemours).

Paramètres de la fitness

Plusieurs paramètres ont été mesurés et comparé entre les souches sensibles et résistantes : la période de latence, le nombre de spores obtenu par spore déposé après 7 jours de croissance, et la fréquence d'infection en utilisant des méthodes similaires à celles décrites par Tooley *et al.*, 1986. Toutes les mesures sont réalisés en triplicat, dans des boîtes de Pétri contenant chacune 5 disques de feuilles inoculés avec 3 gouttes d'une suspension de sporange à 2500 spores/ml. Deux expériences indépendantes ont été effectuées.

Période de latence (PL)

La période de latence a été déterminée par une observation journalière des disques et la détection de l'apparition de la première sporulation. Elle est exprimée comme la période (en heures) nécessaire pour obtenir 50% de la sporulation totale pour une souche considérée. Pour chaque souche nous avons disposé de 45 données par expérience.

Sporulation

La production de spore (N_t / N_{t0}) est obtenue après lavage des 5 disques de chaque boîte (3) dans une fiole de 16 ml d'isoton II et le nombre de sporanges produit par boîte (15 gouttes d'inoculum) est mesuré (N_t) à l'aide d'un compteur à particule. L'expérience est répétée au moins deux fois, produisant 6 mesures pour chaque isolat correspondant à la sporulation obtenue pour 562 sporange déposés (N_{t0}).

Fréquence d'infection (FI)

La fréquence d'infection a été définie comme la proportion de disques de feuilles inoculés sur lesquels une lésion s'est développée. Le nombre de point d'inoculation (3 gouttes de 15 µl à 2500 sp/ ml) ayant conduit à une lésion est comptabilisé après 7 jours d'incubation. L'expérience est répétée au moins deux fois indépendamment dans le temps.

Indice d'agressivité (IA)

De l'ensemble des paramètres un indice de fitness est calculé selon la formule $IA = \ln (N_t / N_{t0} \times IF \times 1/LP)$.

Tests de compétitivité

La compétitivité relative de deux paires de souches a été évaluée (R7/S2) et (R11/S2) à partir d'un mélange de spores résistantes et sensibles dans les proportions suivantes : 20 :80, 50 :50, et 80 :20. Le mélange d'inoculum est amené à la proportion désirée du mélange R/S à la concentration de 40 000 spores par ml final. Quatre boîtes de Pétri contenant 5 disques de feuilles sont inoculées pour chaque mélange et tous les 7 jours (1 cycle) quatre nouvelles boîtes sont à nouveau inoculées. Afin d'évaluer la proportion de souche résistante présente après chaque cycle de multiplication, nous réalisons soit un test biologique avec des feuilles traitées avec 100 mg/L de famoxadone (mesure du pourcentage de croissance), soit un test de quantification des sporanges obtenus par Q-PCR pour quantifier les allèles résistants présents dans les mélanges.

L'ensemble des données de fitness a été soumis à une analyse de variance (ANOVA). La valeur des groupes sensible et résistant a été comparée à l'aide d'un test de Tukey ($P < 0,05$), les essais de Q-PCR avec un test de Fisher ($P < 0,05$), et l'analyse de la fréquence des haplotypes avec un Chi2.

Méthodes moléculaires

Détection des haplotypes

La détection des haplotypes a été réalisée selon les méthodes décrites précédemment par Corio-Costet *et al*, 2006, et Baudoin *et al.*, 2008. Après extraction de l'ADN comme décrit par

Chen *et al.*, 2008, l'ADN mitochondrial est amplifié spécifiquement avec les amorces décrites par Baudoin *et al.*, 2008. Puis à l'aide d'enzyme de restriction spécifiques (Sat1 et Hinf1) qui coupent les séquences amplifiées par PCR en des loci précis, il est possible grâce à la présence de mutations spécifiques des différents haplotypes IS, IR, IIR et IIS de générer des fragments spécifiques de chaque haplotype visualisable sur gel d'agarose (Corio-Costet *et al.*, 2006).

Méthode de Q-PCR

La méthode de PCR quantitative, pour la détection et la quantification de la présence de l'allèle de résistance G143A sur le gène du cytochrome b de *P. viticola* dérive de la méthode décrite par Sirven et Beffa, 2002. Des sondes d'ADN spécifiques ont été dessinés afin d'amplifier spécifiquement l'un des allèle décrits dans Corio-Costet *et al.*, 2009. La détection est réalisée avec le marqueur de fluorescence bleue SYBR green. L'amplification et la détection sont réalisées sur une machine PCR thermofast dans des plaques de 96 puits dans les conditions suivantes : un cycle à 94°C dur ant 15 min, suivi de 40 cycles à 94°C 10 s, 60°C avec les sondes adéquates 10s, et à 72°C du rant 20s. L'émission de la fluorescence est calculée à 72°C. Les données sont analysées par le logiciel de la machine. Pour chaque échantillon la quantité d'ADN cible est quantifié en utilisant des courbes de calibration appropriées (*Ct* (cycle threshold)).

RESULTAT

Distribution des haplotypes dans le vignoble français

À partir de 1015 isolats collectés en début de saison en 2003 et 2004, nous avons évalué la présence des différents haplotypes mitochondriaux dans le vignoble français à l'aide d'outils moléculaires détectant les SNP (single nucleotide polymorphism) spécifiques de chaque haplotype.

Tableau 1: Distribution des différents haplotypes mitochondriaux de *P. viticola* dans le vignoble français en 2003-2004.

Table I : Distribution of *P. viticola* mitochondrial haplotype in French vineyard

Régions françaises	N	Année de collecte	Haplotypes mitochondriaux (%)			
			IS	IR	IIS	IIR
Bordeaux	506	2003	50.2	23.9	22.7	3.2
Champagne	122	2003	73.8	22.1	4.1	0
Dordogne	84	2003	47.6	21.5	30.9	0
Loire	121	2003	69.4	8.3	22.3	0
Vallée du Rhône	86	2003	80.2	5.8	14.0	0
Bourgogne	33	2004	36.4	30.3	12.1	21.2
Jurançon-Gers	63	2004	38.1	34.9	27.0	0
Moyenne			56.45 ±17.7	20.99 ± 10.7	20.3 ± 9.4	2.26 ± 7.9

Comme dans les études précédentes (Corio-Costet *et al.*, 2006 ; 2008 ; Chen *et al.*, 2008) l'haplotype I (IS, IR) est largement majoritaire (77,44%), et l'haplotype II (IIR, IIS) ne représente que 22,56%. Concernant la résistance aux Qols, la situation semble variable selon les régions et les échantillons prélevés. L'état de résistance varie de 51,5 % d'isolats résistants en Bourgogne à 5,8% dans la vallée du Rhône, avec une moyenne de 23,25% sur

l'ensemble des vignobles. À noter que la présence de l'haplotype II résistant est plutôt rare excepté en Bourgogne.

Sensibilité des souches sensibles et résistantes de la collection

L'étude de la fitness des souches sensibles et résistantes a été réalisée sur 11 souches sensibles appartenant aux haplotypes IIS (7) et IS (4) et sur 12 souches résistantes appartenant essentiellement à l'haplotype IR (9/12). Les valeurs des CI_{50} des souches sensibles à la famoxadone varient de 0,05 à 0,28 mg/L, avec une valeur moyenne de 0,115 mg/L. Toutes les souches résistantes, possédant une CI_{50} supérieure à 1000 mg/L, possèdent également la mutation conférant la résistance en position G143A.

Tableau II : Origine et caractéristique haplotypique des isolats utilisés pour l'étude de la fitness de *P. viticola*

Table II : Characteristics of isolates used in fitness studies

Souches ¹	Région d'origine	année	Haplotype mitochondrial (I or II)	CI_{50} moyenne (mg/ml \pm SEM)
S1	Champagne	2003	IIS	0,115 \pm 0,013
S2	Bordeaux	2003	IS	
S3	Bourgogne	2003	IIS	
S4	Bordeaux	2003	IIS	
S5	Bordeaux	2003	IIS	
S6	Bordeaux	2003	IIS	
S7	Champagne	2003	IS	
S8	Bordeaux	2003	IIS	
S9	Bourgogne	2003	IIS	
S10	Rhône Valley	2003	IS	
S11	Alsace	2003	IS	
R1	Bordeaux	2003	IR	>1000
R2	Bordeaux	2003	IIR	
R3	Midi-Pyrenees	2003	IR	
R4	Freiburg	2003	IR	
R5	Midi-Pyrenees	2003	IR	
R6	Midi-Pyrenees	2003	IR	
R7	Midi-Pyrenees	2003	IR	
R8	Bordeaux	2003	IR	
R9	Bordeaux	2003	IR	
R10	Bordeaux	2003	IR	
R11	Bordeaux	2003	IIR	
R12	Bordeaux	2003	IIR	

Evaluation des paramètres de fitness des 23 souches testées.

L'évaluation de la période de latence (PL), du taux de sporulation et de la fréquence d'infection (FI) entre les deux groupes de souches, en conditions de laboratoire, révèle d'une manière générale une variabilité importante au sein de chaque groupe. Aucune différence significative de la période de latence entre les deux groupes n'a été trouvée (tableau 3). La période latence varie de 140 à 86,5 heures dans le groupe des souches sensibles, avec une moyenne de 102,7 heures. De manière similaire cette période de latence varie de 89 à 139 heures au sein du groupe résistant avec une moyenne de 100,9 heures.

Tableau III : Paramètres de la fitness des souches sensibles et résistantes aux Qols.

Table III : Fitness parameters of sensitive and Qol resistant isolates

Isolat	Sensibilité aux Qol	Période de latence (heures)	Sporulation ^a (Nt/Nt ₀)	Fréquence d'infection	IA (Ln (Nt/Nt ₀ · FI / PL)
S1	S	86,5	1022	0,94	2,41
S2	S	88	534	0,98	1,78
S3	S	97	783	0,91	1,99
S4	S	103	896	0,76	1,99
S5	S	110	421	0,42	0,48
S6	S	96	332	0,86	1,09
S7	S	107,5	351	0,72	0,86
S8	S	97	783	0,91	1,99
S9	S	103	783	0,79	1,77
S10	S	97,5	1267	0,97	2,53
S11	S	140	537	0,97	1,28
Moyenne^b		102,7 ± 1,57	704 ± 139	0,84 ± 0,035	1,75 ± 0,65
R1	R	89,5	565	1	1,84
R2	R	108,5	555	0,96	1,59
R3	R	91,5	1015	1	2,41
R4	R	104,5	550	1	1,66
R5	R	93,25	996	0,99	2,36
R6	R	103	802	0,93	1,98
R7	R	92,5	844	0,94	2,15
R8	R	93,25	901	0,94	2,21
R9	R	95	1048	0,91	2,31
R10	R	96	1508	1	2,75
R11	R	139	693	0,96	1,57
R12	R	105	484	0,68	1,14
Moyenne^b		100,9 ± 1,32	830 ± 171	0,94 ± 0,02	2,05 ± 0,45

^a: la sporulation est exprimée comme le ratio du nombre de spores produites après 7 jours de croissance / le nombre de spores déposées. ^b: Les moyennes sont exprimées +/- la déviation standard.

La production de spores est également très variable selon les souches, avec des souches sensibles produisant de 332 à 1287 sporanges par sporange déposé et des souches résistantes produisant de 484 à 1508 sporanges. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes qui montrent respectivement une moyenne de production de 704 à 830 sporanges pour les groupes sensible et résistant. Au sein d'un même groupe certaines souches produisent 3 fois plus de sporanges qu'une autre souche (ex : S6 et S10, ou R12 et R10).

Concernant la fréquence d'infection (FI) (tableau III), une différence significative est observée ($P= 0,02$) entre les deux groupes de souches, avec respectivement une FI de $84 \pm 0,035$ et de $0,94 \pm 0,02$ pour les groupes sensible et résistant.

À partir de l'ensemble de ces paramètres, nous avons calculé un indice d'agressivité (AI) des souches), lequel ne montre aucune différence significative ($P = 0.147$) entre les deux groupes de souches avec des valeurs moyennes de $1,75 \pm 0,65$ pour le groupe sensible et de $2,05 \pm 0,45$ pour le groupe résistant.

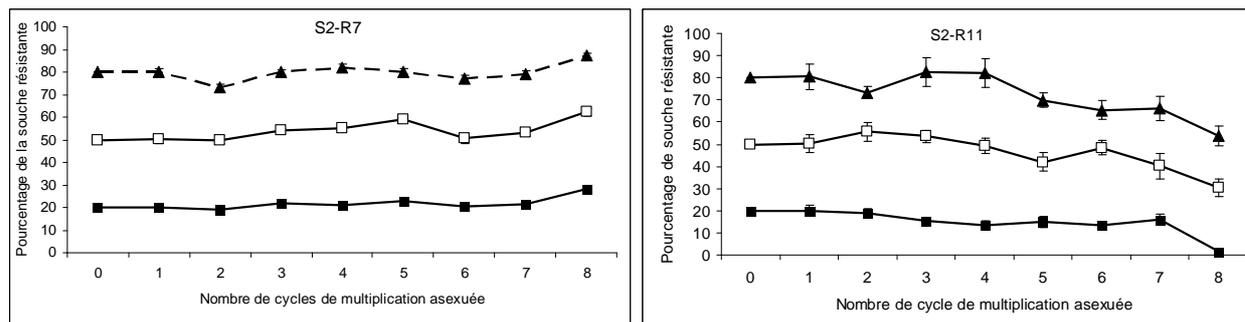
Compétitivité de deux souches résistantes aux Qols

Afin d'estimer la compétitivité d'isolats résistants aux Qols, nous avons mis en mélange dans différentes proportions une souche sensible (S2) possédant un IA (1,78) représentatif de la moyenne du groupe avec deux souches résistantes aux Qols (R7 et R11) ayant des AI respectivement de 2,15 et 1,57. Le développement de mélanges contenant 20%, 50% ou

80% d'isolats résistants en mélange avec la souche S2 a été suivi sur 8 cycles de reproduction asexuée consécutifs.

Figure 1 : Evolution de la fréquence des deux isolats résistants R7 et R11 au cours de 8 cycles successifs de multiplication asexuée. Le mélange initial contient soit 20% (-■-), 50% (-□-) ou 80% (--▲--) de sporanges résistants. Chaque point correspond à la moyenne de 6 répétitions.

Figure 1 : Dynamic changes in the frequency of QoI resistant isolates in sporangial populations harvested from grapevine leaf disks inoculated with three mixtures of QoI sensitive S2 and QoI resistant isolates R7 and R11 in various proportions (20:80(-■-), 50:50 (-□-) or 80:20 (--▲--). during eight asexual generations.



Le changement de fréquences des souches résistantes dépend largement de la fitness des souches et de leur indice d'agressivité (AI). Le premier mélange S2-R7, montre une stabilité de la souche résistante quelle que soit la proportion de mélange considéré. On note même pour le mélange à 50 :50 et à 20-80 une légère augmentation significative de la proportion d'isolats résistants ($P < 0,05$). La souche R7 est une souche compétitrice en absence de fongicide QoI.

Concernant la seconde paire de souches testée, une diminution progressive de la teneur en souche résistante dans le mélange est observée à partir du quatrième cycle, pour aboutir après 8 cycles de reproduction à une diminution de 20 à 25% du mélange initial 80 :20 et 50 :50. Encore plus marqué, après 8 cycles du mélange contenant 20% de souches résistantes il ne reste plus que 1,27% de la souche R11 dans le mélange. La souche R11 s'avère un mauvais compétiteur en absence de pression de sélection.

DISCUSSION-CONCLUSION

Répartition de la résistance

En accord avec les résultats décrits précédemment dans le vignoble français (Chen et al, 2007 ; Corio-Costet 2006, 2008a, b), l'haplotype I est le plus largement répandu avec une moyenne de 77,44% (IS, IR). Concernant la résistance, les données obtenues en 2003 et 2004, montre que la résistance représente 23,25% des isolats collectés en début de saison. Le rôle des haplotypes mitochondriaux et leur importance dans le maintien et la dispersion de la résistance mériteraient d'être clarifié. Pourquoi si peu d'haplotype II ? Pourquoi la Bourgogne aurait-elle autant d'haplotype II ?

Des études antérieures montraient qu'en 2002 et 2003 60% des isolats étaient résistants dans le vignoble français et que la résistance se maintenait en 2005 et 2006 (Sierotzki *et al*, 2005, 2008). Cependant, selon la date de prélèvement et la méthode utilisée (isolats ou populations) les fréquences de résistance observées ne sont pas identiques dans tous les vignobles. Elles dépendent essentiellement de la pression fongicide et de la fitness des populations présentes.

Fitness et compétitivité

L'un des facteurs majeurs affectant l'évolution de la résistance aux fongicides est certainement la fitness des isolats résistants. Nous avons montré dans cette étude qu'il

n'existe pas globalement de différence significative entre le groupe de souches sensible et celui des résistantes pour l'ensemble des paramètres étudiés, à savoir la vitesse de croissance, le taux de sporulation et la qualité de l'infection dans nos conditions expérimentales. Seule la fréquence d'infection évaluée au niveau individuel révèle un léger avantage pour le groupe de souches résistantes.

Concernant la compétitivité, l'étude réalisée montre que selon les souches considérées, la proportion d'isolats résistants peut demeurer stable voire même augmenter sur plusieurs cycles de multiplication asexuée, ou bien chuter en fonction de l'indice d'agressivité des souches. Ainsi, la compétitivité semble-t-elle dépendre très largement de l'indice d'agressivité des souches qu'elles soient sensibles ou résistantes aux Qols. Dans la littérature, des auteurs montrent que des ratios de 90:10 ou 99:1 conduisent rapidement à la disparition des souches résistantes après seulement deux cycles (Sierotzki *et al*, 2008), mais les auteurs ne donnent pas quelles sont les mutations présentes dans le gène du cytochrome b. En effet, au côté de la mutation majeure G143A, qui est décrite comme n'affectant nullement le fonctionnement de la mitochondrie (Esser *et al*, 2004) il existe des mutations mineures, telle F129L (présente à moins de 0,2% dans le vignoble français), qui peuvent à l'inverse limiter le fonctionnement mitochondrial et éventuellement conduire à un coût de la résistance. Dans cette étude, les séquences réalisées du cytochrome b des souches choisies montrent exclusivement la présence de la mutation G143A.

Conclusion générale

Notre étude indique que les souches résistantes aux fongicides Qols n'exhibent pas de coût apparent pour cette résistance et que la compétitivité des souches dépend essentiellement de l'indice d'agressivité des souches mises en présence. Ce point est conforté par le suivi de souche sur le terrain en absence de pression de sélection où durant la saison végétative le taux de souches résistantes demeure stable (Corio-Costet *et al.*, 2006, 2008). Toutefois, cette résistance est à héritabilité mitochondriale, et après chaque cycle de reproduction sexuée, le taux de souches résistantes décroît et par conséquent la proportion de souches résistantes l'année N+1 en absence de pression de sélection (Toffolati *et al*, 2007).

N'ayant pas détecté de coût de la résistance aux Qols nous pouvons émettre les trois hypothèses suivantes : 1° la résistance aux fongicides Qols basée sur la mutation G143A n'induit aucun coût et aucune perte de fitness, 2° le coût existe mais seules les souches possédant la fitness la meilleure ont été sélectionnées et donc le coût n'est pas apparent, 3° le coût existe, mais rapidement des mutations compensatrices ont été sélectionnées et permettent aux souches résistantes d'atteindre une fitness moyenne. Finalement, les souches résistantes semblent pouvoir survivre aussi bien que les souches sensibles et seul le maintien de la résistance semble affecté suite à l'héritabilité mitochondriale en absence de pression de sélection.

Si nous voulons mieux maîtriser la dispersion et le maintien de la résistance aux fongicides, prendre en compte le coût de la résistance ainsi que les supports génétiques impliqués paraît nécessaire pour une meilleure compréhension des phénomènes d'évolution des populations de pathogènes soumis à des pressions de sélection

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'IFV, le CIVC, la protection des végétaux et les chambres d'agriculture pour la collecte des échantillons. Nous remercions également G Taris, L. Douence, S Richart-Cervera et S Gambier pour leur aide technique, JL Genet pour la famoxadone et la Région Aquitaine et l'INRA pour leur soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson J. B., 2005 - Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 547-556

Baudoin A. I., Olaya G., Delmotte F., Colcol J. F., Sierotzki H., 2008 - Qol resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic united states. *Plant Management Network. Plant Health Progress*. Doi:10.1094/PHP-2008-0211-02-RS

Chen WJ., Delmotte F., Richard-Cervera S., Douence L., Greif C., Corio-Costet MF., 2007 - At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied Environ. Microbiol.* 73: 5162-6172.

Corio-Costet M-F ., Delmotte F., Martinez F., Giresse X., Raynal M., Richart-Cervera S., Douence L., Panon ML., Chen WJ., 2006 - Resistance aux Qois du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) : origine et diversité. 8th Int. Conf on Pest and Diseases, AFPP, Tours, 5-6 décembre, France).pp 612-620 CD-Rom.

Corio-Costet M-F ., Martinez F., Delmotte F., Douence L., Richart-Cervera S., Chen WJ., 2008 - Resistance of *Plasmopara viticola* to Qois fungicides : Origin and Diversity. In: Modern fungicides and antifungal compounds V. Dehne H.W., Deising H.B., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E.,and Lyr H (eds). DPG, Braunschweig, Germany, 107-112

Corio-Costet MF., Dufour MC., Cigna J., Abadie P., Martinez F., Chen WJ., 2008 - Resistance of *Plasmopara viticola* to Qol fungicides : origin, diversity and fitness. *J Plant Pathol*, 90, 31.6, p S2.136

Corio-Costet MF., Dufour MC., Cigna J., Abadie P., Chen WJ., 2009 - Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to Qol fungicides. special issue downy mildew, Ed A Lebeda. Soumis à *Eur J Plant Pathol*,

Esser L., Quinn B., Zhang M. Q., Elberry M., Yun L., Yunn C. A., Xia, D., 2004 - Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for the cytochrome bc (1) complex. *Journal of Molecular Biology*, 341, 381-302

Genet J.-L., Steva H., Vincent O., Cazenave C., 1997 - A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *EPPO bulletin*, 27, 217-225.

Genet J.-L., Jaworska G., Deparis F., 2006 - Effect of dose rate and mixture of fungicides on selection for Qol resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pesticide Management Science*, 62, 188-194.

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. *Pesticide Management Science*, 62, 465-472

Jordan D. B., Livingston R. S., Bisaha J. J., Duncan K. E., Pember S. O., Picollelli M. A., Schwartz R. S., Sternberg J. A., Tang X., 1999 - Mode of action of famoxadone. *Pesticide Science*, 55, 105-108.

Magnien C., Micoud A., Glain M., Remuson F., 2003 - Qol resistance of downy mildew-monitoring and tests 2002. (Paper presented at the 7th Int. Conf. on Pest and Diseases 2003, 8 pages. AFPP Eds, CD-Rom.

Tooley P. W., Sweigard J. A., Fry W.E. , 1986 - Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* from sexual and asexual populations. *Phytopathology* 76, 1209-1212.

Sierotzki H., Kraus N., Pepin S., Ferandes N. Gisi H., 2008 - Dynamics of Qol resistance in *Plasmopara viticola* (In H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, & H. Lyr (Eds.),

Modern fungicides and Antifungal compounds V (pp. 151-157). DPG Selbstverlag, Braunschweig.)

Sierotzki H., Kraus N., Assemat P., Stanger C., Cleere C., Windass J., Gisi H., 2005 - Evolution of resistance to Qol fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe. (In H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, & H.

Sirven C., Beffa R., 2003 - Resistance to fenamidone: monitoring by real-time quantitative PCR on *Plasmopara viticola*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56, 523-5332.

Toffolatti S. T., Serrati L., Sierotzki H., Gisi U., Vercesi A., 2007 - Assessment of Qol resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pesticide Management Science* 63, 194-201.

Wong, F. P. & Wilcox, W.F. (2000). Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*, 84, 275-281

Vanderplank, J. E. 1982 - *Host-pathogen Interactions in plant Disease*. New-York, USA, Academic Press, 27 pp.