

**AFPP – 8<sup>ème</sup> CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES  
TOURS – 5 ET 6 DECEMBRE 2006**

**TAVELURE DU POMMIER (*Venturia inaequalis*)  
DETECTION DE LA RESISTANCE AUX STROBILURINES  
PAR TEST BIOLOGIQUE ET PAR PCR-RFLP**

S. FONTAINE <sup>1</sup>, F. REMUSON <sup>1</sup>, A. MICOUD <sup>1</sup>,  
L. FRAISSINET-TACHET <sup>2</sup>, D. MELAYAH <sup>2</sup>, R. MARMEISSE <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Service Régional de la Protection des Végétaux – DRAF Rhône-Alpes – 165 rue Garibaldi  
– B.P. 3202 – 69401 LYON Cedex 3 - France

<sup>2</sup> UMR CNRS 5557 - Ecologie Microbienne - Equipe Symbiose Mycorhizienne – Université  
Claude Bernard Lyon 1 – 43 Bd du 11 Novembre 1918 – 69 622 Villeurbanne Cedex

**RESUME :**

En France, les premiers cas de résistance de la tavelure du pommier (*Venturia inaequalis*) aux strobilurines ont été détectés aux alentours de 2002. Le suivi de cette résistance via des tests *in vitro* en germination de spores est difficile compte tenu du taux de germination variable des spores prélevées sur les échantillons de terrain. Le mécanisme de résistance le plus souvent rencontré vis à vis de ce type de fongicides résulte d'une mutation du gène du cytochrome b (G143A). La mise au point d'une technique de détection de cette mutation chez *V. inaequalis* par PCR-RFLP permet de disposer d'un outil précieux pour suivre cette résistance. Des analyses réalisées par test *in vitro* et par PCR-RFLP en 2004 et 2005 sur des échantillons de terrain ont permis de constater une présence importante de la mutation G143A (notamment dans les régions arboricoles du Sud Ouest et du Sud Est), mais également de suspecter l'existence d'éventuels autres mécanismes de résistance en France.

Mots clés : Tavelure du pommier, Résistance, Strobilurines, PCR-RFLP, Test *in vitro*

**SUMMARY :**

**APPLE SCAB (*VENTURIA INAEQUALIS*) DETECTION OF STROBILURIN RESISTANCE  
BY USING BIOLOGIC TEST OR PCR-RFLP**

In France, the first cases of apple scab (*Venturia inaequalis*) resistance to strobilurins were detected around 2002. Monitoring this resistance by means of *in vitro* spore germination tests is difficult because the rate of field sample spore germination is variable. The most common resistance mechanism for this type of fungicides is a result of a mutation in the cytochrom b gene (G143A). A PCR-RFLP technique was developed to detect this mutation in apple scab and proved a very useful monitoring tool for this resistance. Analyses were performed *in vitro* spore germination and PCR-RFLP tests on field samples in 2004 and 2005, showing that the mutation G143A is geographically widespread (especially in the South West and South East orchard regions of France). These analyses also point to the existence of other resistance mechanisms in France.

Key-words : Apple scab, Resistance, Strobilurins, PCR-RFLP, *in vitro* test

## INTRODUCTION

La tavelure du pommier, provoquée par le champignon Ascomycète *Venturia inaequalis* Cook, se caractérise par l'apparition de taches sur les feuilles et les fruits et affecte fortement la qualité du fruit. Elle a un impact économique important en arboriculture et reste la maladie la plus répandue sur pommier. Les moyens de lutte contre ce champignon, outre des mesures prophylactiques et agronomiques, résident dans l'utilisation de produits phytosanitaires parmi lesquels figurent les strobilurines, fongicides de la famille des QoI. Ces fongicides interagissent avec le centre d'oxydation du cytochrome b du complexe III de la chaîne respiratoire (Leroux et Delorme, 1997) et bloquent ainsi la chaîne respiratoire.

Les premières utilisations des strobilurines sur la tavelure remontent au printemps 1998. Les premières pertes d'efficacité de ces fongicides ont été constatées en France dès 2002. Des phénomènes de résistance liés à cette famille de produits ont également été observés chez divers autres phytopathogènes : l'oïdium du blé *Blumeria graminis* (Sierotzki *et al.*, 2000<sup>a</sup>), le mildiou de la vigne *Plasmopara viticola* (Heaney *et al.*, 2000), l'anthracnose du bananier *Mycosphaerella fijensis* (Sierotzki *et al.*, 2000<sup>b</sup>). Le mécanisme de résistance aux strobilurines le plus souvent rencontré résulte d'une mutation de cible qui affecte le gène mitochondrial codant pour le cytochrome b. Cette mutation se traduit par un changement de glycine en alanine de l'acide aminé en position 143 (G143A) et provoque une baisse d'affinité de la molécule chimique avec le cytochrome b.

Dans le cadre de ses missions, le laboratoire de la Protection des Végétaux de Rhône-Alpes est chargé de la surveillance et du suivi de l'apparition de résistance aux fongicides chez *V. inaequalis*. Jusqu'à présent, cette surveillance a été réalisée via des tests biologiques par germination de spores *in vitro*. Cette résistance semblant principalement induite par une mutation de cible, il est apparu intéressant de développer une technique de détection par biologie moléculaire afin de disposer, pour la tavelure du pommier, d'un test rapide et ainsi de s'affranchir du pouvoir germinatif aléatoire des spores issues des échantillons analysés.

Cette note présente des éléments méthodologiques permettant la détection de la mutation G143A par PCR-RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") chez la tavelure du pommier, ainsi qu'une synthèse des résultats des analyses réalisées par tests biologiques et moléculaires en 2004 et 2005 sur des échantillons prélevés dans plusieurs régions de production où la tavelure est présente.

## MATERIEL ET METHODE

### MATERIEL FONGIQUE ET VEGETAL

#### Souches fongiques de référence utilisées en PCR

Des cultures mycéliennes monospores de *V. inaequalis* isolées en 2002 et 2003 sont conservées au laboratoire sur milieu PDA. L'une des souches ("SFR2") constitue la souche de référence sensible aux strobilurines ; elle provient d'un verger non traité du département de la Loire. Les souches "140" et "160" ont pour origine des vergers commerciaux du Tarn et Garonne, leurs Facteurs de Résistance élevés (FR>2900 en croissance mycélienne sur milieux amendés en krésoxim-méthyl) permettent de les considérer comme des souches résistantes. Pour la mise au point du test PCR, des prélèvements de mycélium ont été réalisés sur chacune de ces cultures. Ces prélèvements ont été conservés à -20°C.

Parallèlement, des cultures mycéliennes de *Botrytis cinerea*, *Rhizopus spp*, *Penicillium spp* conservées sur milieu PDA ont été utilisées pour vérifier la spécificité du test PCR.

#### Vergers de référence utilisés en test *in vitro* (vergers sensibles)

La production de spores à partir de cultures mycéliennes nécessite la mise en place d'une technique lourde et longue. Pour cette raison, les références sensibles utilisées pour les tests biologiques par germination de spores sont constituées par des isolats provenant de vergers considérés comme sensibles (arbres non traités situés sur des sites éloignés de toute zone de vergers commerciaux). Chaque année, des prélèvements sont effectués dans ces vergers de la région Rhône-Alpes. Les tests de germination pratiqués sur ces prélèvements ont servi de références pour l'interprétation des tests biologiques.

### Origine des échantillons analysés

Les prélèvements ont été effectués dans des vergers commerciaux et d'expérimentation situés dans les principaux bassins de production français. Dans tous ces vergers, malgré des programmes de traitements anti-tavelure adaptés, le parasite n'a pas été correctement maîtrisé, d'où l'hypothèse de l'apparition d'une résistance vis à vis des substances actives utilisées, notamment vis à vis des strobilurines. Pour chaque verger étudié, 30 à 50 feuilles, portant de jeunes taches sporulantes de tavelure, ont été récoltées en différents points de la parcelle au printemps, en été ou en automne.

## **TEST MOLECULAIRE**

### Matériel analysé

Pour chaque verger étudié, les échantillons analysés par PCR-RFLP ont été obtenus en prélevant, à l'emporte pièce de 6 mm, 30 lésions de tavelure. Ces 30 rondelles de feuilles tavelées ont été réunies et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pour tester la spécificité des amorces, des feuilles de pommiers saines ont également été prélevées et stockées de manière similaire. Enfin, des prélèvements individualisés de lésions ont également été réalisés dans deux vergers où la résistance avait été diagnostiquée. Ces prélèvements ont également été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Extraction de l'ADN et PCR-RFLP

Les échantillons (rondelles de feuilles tavelées ou mycélium de souches de référence) ont été broyés en poudre fine dans un mortier, en présence d'azote liquide. L'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction Nucleospin Plant (Macherey-Nagel). Pour les amplifications par PCR, le milieu réactionnel de 25  $\mu\text{L}$  contient 2 unités de Taq polymérase (Invitrogen), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampon taq 10x, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 0,5  $\mu\text{M}$  de chacune des amorces (PS1 : GTT ACA GCC TTC CTG GGT TAT et PR1 : AGG CCT CCC CAC AGA AAT TCG) et 1  $\mu\text{L}$  d'extrait d'ADN génomique. L'amplification a été réalisée dans un thermocycler GeneAmp 9700 (Applied biosystem) selon les conditions suivantes : dénaturation initiale de 3 min à  $94^{\circ}\text{C}$ , suivie de 30 cycles comprenant chacun 30 sec à  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 sec à  $55^{\circ}\text{C}$  et 50 sec à  $72^{\circ}\text{C}$  et une élongation finale de 10 min à  $72^{\circ}\text{C}$ .

La mutation G143A entraîne la création d'un site de restriction (GCNGC) reconnu par *Fnu4HI* (New England BioLabs). La digestion de 10  $\mu\text{L}$  de produit d'amplification PCR a été réalisée en présence de 1,5 unités d'enzyme dans son tampon pour un volume réactionnel de 25  $\mu\text{L}$ . Les produits de restriction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 2,5% puis visualisés sur une table UV après coloration au bromure d'éthidium.

Pour déterminer la sensibilité de la technique, des échantillons d'ADN ont été extraits à partir de lésions individualisées, analysés par PCR-RFLP pour déterminer le génotype de ces dernières (résistant ou sensible) et dosés au spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000). Les ADN de 5 lésions de génotype résistant ont été retenus pour effectuer des séries de dilution dans une solution d'ADN de lésions sensibles. Ces dilutions ont été réalisées à partir d'extraits présentant des concentrations variables (30, 25 ou 10 ng/ $\mu\text{L}$  d'ADN total), afin de déterminer l'éventuel impact des variations de rendement d'extraction sur la détection de souches résistantes dans un pool d'ADN. Sept séries de dilution indépendantes ont été réalisées avec les solutions d'ADN. Chacune des gammes comportait 3 dilutions pour lesquelles l'ADN issu de taches résistantes représentait 10%, 17% ou 25% de l'ADN total.

## **TESTS BIOLOGIQUES**

Cette étude a été conduite *in vitro* par des tests en germination de spores sur milieu gélosé. Pour chaque échantillon provenant des vergers commerciaux, une suspension de spores a été réalisée à partir de lésions foliaires sporulantes. A une concentration moyenne d'environ 100 000 spores/mL, la suspension a été étalée sur un milieu eau – agar amendé en fongicide.

Chaque suspension de spores a été soumise à une gamme de concentrations de substance active (krésoxim-méthyl en 2004 ; krésoxim-méthyl et trifloxystrobine en 2005). La gamme retenue, commune aux 2 substances actives étudiées, était définie comme suit :

0 – 0,001 – 0,003 – 0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 – 100 – 300  
mg de substance active / L de milieu.

Des suspensions de spores issues de tavelure provenant de vergers sensibles ont été systématiquement étudiées en parallèle. Les boîtes ont été incubées, à l'obscurité, à 20 - 22°C pendant 48 heures. Les spores germées ont été dénombrées sous microscope et le pourcentage de germination par rapport au témoin (dose de fongicide : 0 mg/L ) a été calculé. Pour chacune des substances actives, les Concentrations d'Inhibition à 50% (CI 50) et les Concentrations Minimales d'Inhibition (CMI) ont été estimées graphiquement à partir des courbes représentant le pourcentage de germination par rapport au témoin, en fonction du logarithme ( $\log_{10}$ ) des concentrations testées. Le rapport entre la CI50 ainsi estimée et la moyenne des CI50 des vergers de référence sensibles a permis de calculer le Facteur de Résistance (FR) de chaque population étudiée.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### MISE AU POINT D'UN TEST MOLECULAIRE

Ce test moléculaire permet l'amplification, à l'aide des amorces PS1-PR1, d'une portion du gène cytochrome b telle que le fragment obtenu comprenne le site de la mutation G143A. Ce site muté est spécifiquement reconnu par l'enzyme Fnu4HI. Cette enzyme clive en deux fragments le produit PCR du gène muté, ce qui permet de discriminer l'allèle de résistance par rapport à l'allèle sauvage non clivé, sensible aux strobilurines.

#### Spécificité

Les amplifications PCR réalisées à partir d'ADN de souches de référence sensible ("SFR2") et résistantes ("140" et "160"), donnent un fragment de la taille attendue de 490 pb. Le séquençage du fragment amplifié à partir de chacune de ces trois souches puis leur alignement avec la séquence du cytochrome b de *V. inaequalis* (accession AF004559) permettent de vérifier l'alignement parfait pour "SFR2" et une substitution d'une guanine par une cytosine responsable de la mutation G143A pour les souches résistantes "140" et "160". Aucune amplification n'a été obtenue à partir des ADN extraits des feuilles saines de pommier et des cultures de *B. cinerea*, *Rhizopus spp.* et *Penicillium spp.* ce qui démontre que les amorces utilisées amplifient spécifiquement l'ADN de *V. inaequalis*.

Après incubation avec l'enzyme de restriction Fnu4HI, les produits PCR amplifiés à partir de la souche sensible "SFR2" ne sont pas digérés alors que les profils de digestion obtenus avec les souches résistantes "140" et "160" font bien apparaître deux bandes de tailles attendues d'environ 100 pb et 400 pb. Ce dernier résultat permet de vérifier que l'enzyme de restriction Fnu4HI est capable de détecter la mutation G143A dans les souches résistantes de *V. inaequalis* et que les fragments PCR ainsi digérés sont correctement séparés après électrophorèse en gel d'agarose.

#### Sensibilité

Les ADN extraits de lésions individualisées ont permis d'effectuer des dilutions d'ADN issu de lésions "résistantes" dans de l'ADN de lésions "sensibles".

Sur 3 des 5 lésions résistantes analysées (AII 50a, CII 15 et CIII 6) (tableau I), la résistance est détectée alors que l'ADN de lésions résistantes représente 10% de l'ADN total. Pour les 2 autres lésions (AII 48b, CII 21), la sensibilité du test s'est avérée moins grande (17%).

Il est à noter que 2 lésions résistantes (CIII 6 et CII 21) ont été testées avec des concentrations d'ADN total différentes (10 et 25 ng/ $\mu$ L). Pour chacune de ces 2 lésions, le pourcentage d'ADN résistant à partir duquel la mutation est détectée est identique quelle que soit la concentration en ADN total. Ainsi, pour ces 2 lésions, le niveau de sensibilité de la technique ne semble pas dépendant de la concentration en ADN donc du rendement d'extraction.

Tableau I : Estimation de la sensibilité de la technique PCR-RFLP  
 Table I : Estimation of the sensitivity of the PCR-RFLP technique

Nom de la lésion résistante diluée	Concentration en ADN total (ng/μL)	% d'ADN de lésion résistante à partir duquel la résistance est détectée par PCR-RFLP
All 48b	31	17%
A II 50a	10	10%
CII 15	10	10%
CII 21	25	17%
	10	17%
CIII 6	25	10%
	10	10%

#### RESULTATS DES ANALYSES DE 2004 ET 2005 PAR PCR - RFLP ET EN TEST *IN VITRO*

Entre les 2 années 2004 et 2005, 187 vergers commerciaux ont fait l'objet de prélèvements pour analyse de la résistance aux strobilurines. Les échantillons ont pu être analysés soit par PCR-RFLP (123 échantillons), soit par test biologique (19), soit par les 2 méthodes (45).

#### Résultats des analyses en test biologique

Vergers de référence : les données obtenues montrent que les populations de tavelure issues de 7 vergers de référence sensibles paraissent assez homogènes quant à leur sensibilité aux 2 substances actives (tableau II).

Tableau II : CI 50 et CMI des souches sensibles de *V. inaequalis*  
 Table II : EC 50 and MIC of the sensitive strains of *V. inaequalis*

Vergers	Dép <sup>t</sup>	Année	% G. témoin	Krésoxim-méthyl		Trifloxystrobine	
				CI 50	CMI	CI 50	CMI
Verger AM	38	2004	42 %	0,004	0,01	Pas d'analyse	
Verger CB	01	2004	20 %	0,005	0,03	Pas d'analyse	
Verger DB3	69	2004	48 %	0,004	0,01	Pas d'analyse	
Verger FRB	42	2004	15 %	0,006	0,01	Pas d'analyse	
		2005	10 %	0,006	0,03	0,0041	0,01
Verger VB	69	2004	76 %	0,0035	0,01	Pas d'analyse	
		2005	28 %	0,0024	0,03	0,002	0,01
Verger FRM	42	2005	12 %	0,0026	0,01	0,002	0,01
Verger FRV	42	2005	10 %	0,0014	0,01	0,002	0,01
moyenne				0,004		0,003	
min-max				0,0014 - 0,006	0,01 - 0,03	0,002 - 0,004	0,01

Légende - % G. témoin : % de germination de l'échantillon sur milieu eau-agar

Legend - % G. témoin : % of sample germination on a water-agar artificial medium

Les critères de sensibilité observés (CI 50 et CMI) sont très cohérents, aussi bien entre les différents vergers (alors que ceux-ci ne sont pas implantés dans des zones voisines) que pour un même verger, au cours du temps (cas des 2 vergers FRB et VB analysés en 2004 et 2005). Par ailleurs, pour les 4 vergers confrontés à la fois au krésoxim-méthyl et à la trifloxystrobine, chacune de ces 4 populations semble réagir de façon similaire aux 2 strobilurines. A noter, cependant, que les taux de germination obtenus dans les témoins non traités sont très hétérogènes d'une population à l'autre et, pour un même verger, d'une année sur l'autre. Ils sont pratiquement tous inférieurs à 50% et, pour certains, restent très faibles. Cet élément "taux de germination" est un critère difficilement maîtrisable chez la tavelure et il constitue un facteur très limitant pour la réalisation et l'interprétation de ces tests biologiques. Malgré cette restriction, l'homogénéité des résultats conduit à considérer les valeurs moyennes de CI 50 et de CMI obtenues comme des valeurs de référence pour l'interprétation des analyses en vergers commerciaux.

Vergers commerciaux : sur les 187 prélèvements analysés en test biologique au cours des années 2004 et 2005, les taux de germination observés dans les témoins non traités sont très variables et généralement relativement faibles. Seuls 64 d'entre eux (32 en 2004 et 32 en 2005), montrent des taux de germination supérieurs ou égaux à 10% et donnent lieu à un résultat considéré comme interprétable. Tous les échantillons de 2005 analysés par test biologique (33) ont également été soumis à une PCR. Par contre, en 2004, 19 prélèvements n'ont été analysés qu'en test biologique. Les résultats concernant ces 19 échantillons sont regroupés dans le tableau III ci-dessous (les données des autres échantillons analysés par les 2 techniques sont présentées et commentées dans la partie "comparaison des tests moléculaires et des tests biologiques").

Tableau III : Résultats 2004 avec **Krésoxim-méthyl** – Facteurs de Résistance décroissants  
Table III : Results 2004 with **Kresoxim-methyl** – Resistance factors decreasing

Groupe	Régions	N° éch.	% G. témoin	FR	% G. à 0,3 mg/L	CMI
I a	Rhône-Alpes	400	24 %	> 60 000	83 %	> 300
	Midi-Pyrénées	287	19 %	1377	100 %	10
		286	15 %	1067	73 %	10
		292	20 %	889	80 %	30
I b	Midi-Pyrénées	290	17 %	33	29 %	10
	Alsace	214	20 %	13	0 %	0,3
	PACA	241	15 %	13	20 %	10
	Midi-Pyrénées	294	26 %	10	12 %	10
II a	Aquitaine	154	41 %	9	27 %	> 300
	Pays de Loire	332	33 %	7	0 %	0,3
		194	62 %	6	21 %	1
II b	PACA	176	12 %	5	8 %	1
	Centre	204	38 %	3	0 %	0,3
	Aquitaine	147	28 %	2	4 %	1
	Midi-Pyrénées	217	18 %	2	17 %	30
		215	21 %	1	38 %	100
		232	21 %	0,7	0 %	0,3
		233	21 %	0,5	24 %	30
234		12 %	0,2	0 %	0,1	

Légende - % G. témoin : % de germination de l'échantillon sur milieu eau-agar  
- % G. à 0,3 mg/L : % de germination à la dose 0,3 mg/L de substance active  
Legend - % G. témoin : % of sample germination on a water-agar artificial medium  
- % G. à 0,3 mg/L : % of germination at the dose of 0,3 mg/L of active ingredient

Sur l'ensemble de ces données, si l'on considère uniquement les valeurs des Facteurs de Résistance, 8 parcelles (groupe I) montrent des FR supérieurs ou égaux à 10 et peuvent être considérées comme présentant une résistance. Parmi ces 8 parcelles, 4 d'entre elles (groupe I a) se distinguent par des FR très élevés et des populations de spores qui germent encore à plus de 70% à 0,3 mg/L (dose qui représente 10 fois la CMI observée pour les vergers "sensibles"). Les 4 autres parcelles de ce groupe (I b) ont des FR nettement plus faibles (de 33 à 10) et, pour 3 d'entre elles, ont encore des spores qui germent à 0,3 mg/L. Quant aux 11 parcelles du groupe II, elles présentent des FR inférieurs à 10 et, compte tenu des limites du test biologique, il n'est pas aisé de statuer sur leur niveau de sensibilité. Parmi ces 11 parcelles, 3 (groupe II a) présentent un taux de germination, dans les témoins, élevé pour la tavelure et des FR tous compris entre 5 et 10. Par ailleurs, dans ce groupe II a, 2 parcelles sur 3 ont encore des spores qui germent à 0,3 mg/L avec, en corollaire, des CMI fortes (voire très fortes), ce qui laisse suspecter un début de dérive dans leurs populations de spores. Dans le groupe II b, par contre, les taux de germination dans les témoins sont, en général, plus bas et les FR inférieurs à 5. A priori, ces parcelles peuvent être considérées comme sensibles, mais 3 d'entre elles semblent néanmoins posséder quelques spores

capables de germer à 0,3 mg/L, voire au delà compte tenu des CMI de l'ordre de 30 ou de 100. Aussi, ces parcelles doivent faire l'objet d'un suivi spécifique dans les années ultérieures afin de préciser leur statut vis à vis de la résistance aux strobilurines.

#### Résultats des analyses PCR-RFLP

En 2004 et 2005, ce sont respectivement 47 et 121 parcelles qui ont été analysées par PCR-RFLP. La mutation G143A est clairement présente dans 16 parcelles en 2004 et 43 en 2005. Pour les échantillons de 2004, la résistance est détectée dans 3 régions : Midi Pyrénées (9 parcelles sur 11 analysées), Provence Alpes Côte d'Azur (1 sur 2) et Rhône Alpes (6 sur 9). Pour les analyses de 2005, cinq régions sont concernées par cette résistance, dont 3 nouvelles régions : l'Alsace (1 parcelle sur 9 analysées), l'Aquitaine (1 sur 8) et la Lorraine (4 sur 10). Cette résistance s'est confirmée dans les régions Midi Pyrénées (25 sur 35) et en Rhône Alpes (12 sur 21). Contrairement à 2004, aucun cas de résistance n'a été détecté par PCR - RFLP en Provence Alpes Côte d'Azur sur les 3 parcelles analysées.

#### COMPARAISON DES TESTS MOLECULAIRES ET DES TESTS BIOLOGIQUES

La comparaison des résultats obtenus en test biologique et par PCR-RFLP, permet d'une part, de lier le phénotype observé au génotype et, d'autre part, de valider la méthode PCR sur un large échantillonnage. Au total, en 2004 et 2005, 45 vergers commerciaux et 5 vergers de référence sensibles ont été analysés par PCR-RFLP et par test biologique.

Parmi les 18 échantillons considérés comme sensibles à l'issue du test biologique (soit 13 issus de vergers commerciaux présentant un  $FR < 10$  et 5 issus des vergers références sensibles), 15 échantillons sont également estimés comme sensibles par PCR (tableau IV). Ainsi, il existe une concordance assez bonne mais non totale (83 %) entre les résultats "sensibles" obtenus par test biologique et par test moléculaire (à noter que tous les échantillons issus des vergers références sensibles montrent des résultats identiques avec les 2 méthodes).

Tableau IV : Parcelles sensibles en test biologique ( $FR < 10$ ) sans mutation G143A détectée  
Table IV : Sensitive orchards through biological test ( $FR < 10$ ) without G143A mutation

Référence des échantillons		Régions	% G. témoin	Krésoxim-méthyl			Trifloxystrobine		
				FR	% G.0,3 mg/L	CMI	FR	% G.0,3 mg/L	CMI
Vergers Références Sensibles en test biologique	FR B	Rhône- Alpes	10	1	0	0,03	2	0	0,01
	FR M		12	0,5	0	0,01	0,8	0	0,01
	FR V		9	0,3	0	0,01	1	0	0,01
	VB		28	0,5	0	0,03	1	0	0,01
	CB		20	0,9	0	0,01	Pas d'analyse		
164	Lorraine	38	3	0	0,3	<0,4	0	0,1	
168		18	2	39	>300	4	0	0,3	
331	PACA	23	1	0	0,3	3	0	0,003	
217	Rhône Alpes	28	2	14	100	3	11	10	
129		18	2	0	3	5	22	1	
205		20	4	0	0,1	Pas d'analyse			
659	Bourgogne	16	4	0	0,3	Pas d'analyse			
640	Centre	25	4	0	0,3	Pas d'analyse			
415		10	2	0	0,03	Pas d'analyse			
417		18	1	0	0,1	Pas d'analyse			

Légende - % G. témoin : % de germination de l'échantillon sur milieu eau-agar  
- % G. à 0,3 mg/L : % de germination à la dose 0,3 mg/L de substance active

Legend - % G. témoin : % of sample germination on a water-agar artificial medium  
- % G. à 0,3 mg/L : % of germination at the dose of 0,3 mg/L of active ingredient

Par contre, pour 3 parcelles (Tableau V), la mutation G143A est détectée par PCR. L'une d'entre elles (n°182) présente des FR faibles et des CMI très élevées pour les 2 substances actives. La détection de la mutation G143A peut s'expliquer par une faible proportion de

souches résistantes dans le verger étudié. Les CMI très élevées semblent conforter cette hypothèse. Les 2 autres parcelles (n° 221 et 289) présentent quant à elles des FR entre 6 et 8 pour le krésoxim-méthyl avec une CMI de 1 (parcelle 221) et de 0,3 (parcelle 289). Les résultats obtenus en test biologique sont très dépendants de la capacité des spores à germer. Or pour ces trois parcelles, les taux de germination sont tous inférieurs à 20 %. Ces différences pourraient donc s'expliquer par le fait que la PCR aurait détectée la mutation sur du matériel non viable.

Tableau V : Parcelles sensibles en test biologique (**FR<10**) avec mutation G143A détectée  
Table V : Sensitive orchards through biological test (**FR<10**) with G143A mutation

Régions	N° éch.	% de G. témoin	Krésoxim-méthyl			Trifloxystrobine		
			FR	% G. 0,3 mg/L	CMI	FR	% G. 0,3 mg/L	CMI
Rhône Alpes	221	18	8	7	1	Pas d'analyse		
Midi Pyrénées	182	12	1	8	100	1	8	100
	313	12	7	0	0,3	Pas d'analyse		

Légende - % G. témoin : % de germination de l'échantillon sur milieu eau agar

- % G. à 0,3 mg/L : % de germination à la dose 0,3 mg/L de substance active

Legend - % G. témoin : % of sample germination on a water-agar artificial medium

- % G. à 0,3 mg/L : % of germination at the dose of 0,3 mg/L of active ingredient

Concernant les parcelles évaluées comme résistantes en test biologique, la comparaison des résultats obtenus met en évidence que la majorité des cas de résistance *in vitro* a pour origine la mutation de cible G143A (18 parcelles sur 32 résistantes (FR≥10) en test biologique). La majeure partie de ces échantillons provient de vergers situés en Midi-Pyrénées (12 sur 18). Ces parcelles présentent généralement des FR et des CMI très élevés pour les 2 substances actives (tableau VI).

Tableau VI : Parcelles résistantes en test biologique (**FR≥10**) avec mutation G143A  
Table VI : Resistant orchards through the biological test (**FR≥10**) with G143A mutation

Légende - % G. témoin : % de germination de l'échantillon sur milieu eau-agar

Legend - % G. témoin : % of sample germination on a water-agar artificial medium

Régions	N° éch.	% de G. témoin	FR Krésoxim-méthyl	FR Trifloxystrobine
Lorraine	167	13%	89	30
	165	14%	356	238
Midi Pyrénées	111	12%	5556	810
	112	16%	>66000	>66000
	118	18%	2000	24762
	121	16%	6667	286
	123	12%	51	26
	153	15%	122	238
	200	20%	>66000	>66000
	321	25%	26667	1524
	175	13%	2000	Pas d'analyse
	218	31%	67	
	291	20%	1556	
293	20%	222		
Rhône Alpes	192	20%	>66000	>143000
	254	34%	>66000	>143000
	319	19%	>66000	100000
	142	19%	>66000	>66000

Enfin, pour 14 échantillons, dont les FR sont supérieurs ou égaux à 10 en test *in vitro* pour au moins l'une des 2 substances actives, la mutation G143A n'est pas détectée (tableau VII).

Ces différences pourraient s'expliquer par des biais liés aux techniques d'analyses ou par l'existence de mécanismes de résistance autres que la mutation G143A.

Il est possible que les divergences constatées soient dues à un manque de sensibilité de la technique PCR-RFLP. En effet, les résultats de sensibilité obtenus avec cette technique montrent qu'en dessous de 17% d'ADN de souches résistantes dans l'extrait analysé, la détection de la mutation G143A devient aléatoire. Ainsi, dans certains vergers, où les souches résistantes sont peu représentées, on peut supposer que les résultats en tests *in vitro* pourraient avoir mis en évidence des souches résistantes sans pour autant que la PCR-RFLP ait détectée de mutation G143A au sein de la population. Cette supposition reste une simple hypothèse, la PCR permettant de détecter la mutation même sur du matériel non viable, contrairement au test biologique.

Concernant les mécanismes de résistance autres que la mutation G143A, qui expliqueraient les divergences observées entre test *in vitro* et test PCR-RFLP, la mutation F129L est connue pour induire un niveau de résistance moyen avec des FR modérés, souvent < 50 (tableau VII, groupe B). Cette mutation n'a jamais été détectée chez *V. inaequalis* mais elle a été mise en évidence chez *Plasmopara viticola* (Heaney *et al.*, 2000) et *Pyricularia grisea* (Kim *et al.*, 2003). Pour un échantillon caractéristique de ce groupe (n°304), le séquençage partiel du gène codant pour le cytochrome b n'a cependant pas mis en évidence de mutations au niveau du codon 129. Même s'il ne peut être exclu que cette situation soit trouvée pour certains échantillons incriminés non analysés, il paraît peu probable que les différences observées entre les génotypes et les phénotypes soient imputables à cette mutation.

La mise en place d'une respiration secondaire pourrait aussi expliquer, en partie, les résultats divergents obtenus entre les 2 types de tests. En effet, les analyses en germination de spores sont réalisées sur des milieux amendés en fongicides sans inhibiteurs de la respiration secondaire de type SHAM (salicylhydroxamic acid). Or, chez *V. inaequalis*, une respiration secondaire via l'alternative oxydase a été mise en évidence au cours de la germination des spores (Olaya *et al.*, 1998). Cette résistance de laboratoire pourrait exister au champ (Färber *et al.*, 2002).

La perte de sensibilité des strobilurines pourrait également s'expliquer par un mécanisme de détoxification vis à vis des 2 substances actives. Ce type de résistance a été observé chez des isolats collectés en Allemagne dans des vergers où une perte de sensibilité a été constatée vis à vis du krésoxim-méthyl et d'autres strobilurines. Pour ces isolats, il a été observé, au cours de la germination des spores et de la croissance mycélienne, une hydrolyse du krésoxim-méthyl en un métabolite inactif (Jabs *et al.* 2001).

A noter que pour une parcelle (n°110, tableau VII, groupe A), les tests en germination de spores mettent en évidence une résistance très forte pour les 2 substances actives, alors que la mutation G143A n'est pas détectée malgré 2 analyses PCR sur des échantillons différents provenant de cette parcelle. D'autres cas de résistance très forte ( $FR_{tri+SHAM} > 1250$  en germination de spores (Steinfeld *et al.*, 2001)) en absence de mutation G143A ont déjà été observés sur des isolats collectés en Suisse. L'origine de cette résistance reste inconnue. Elle pourrait provenir d'un mécanisme en amont de la NADH déshydrogénase dans la chaîne respiratoire (Steinfeld *et al.*, 2002). Cette parcelle doit faire l'objet, dans l'avenir, d'un suivi spécifique afin de confirmer ou non les résultats obtenus.

Enfin, une partie des parcelles testées avec des résultats divergents en PCR et test biologique présente des FR moyens pour une seule des substances actives (tableau VII, groupe C). Ces différences dans les FR obtenus avec les 2 strobilurines peuvent éventuellement être dues au fait que les tests *in vitro* sont réalisés sur des populations de spores avec des taux de germination assez faibles. Concernant ce groupe, on distingue deux sous groupes, un dont les échantillons possèdent des CMI fortes pour les 2 substances actives, pouvant s'expliquer par une faible fréquence des résistants, et un second avec des CMI assez faibles ( $\leq 1$ ) pouvant éventuellement être associé à un mécanisme de détoxification.

Tableau VII : Parcelles résistantes en test biologique (**FR $\geq$ 10**) sans détection de la G143A  
 Table VII : Resistant orchards through the biological test (**FR $\geq$ 10**) without G143A mutation

Groupe	Régions	N° éch.	% G. témoin	Krésoxim-méthyl			Trifloxystrobine		
				FR	CMI	% G. 0,3 mg/L	FR	CMI	% G. 0,3 mg/L
<b>A</b>	Midi Pyrénées	110	31%	13778	>300	84	27619	>300	74
<b>B 1</b>	Limousin	304	16%	33	100	35	40	10	30
	Lorraine	166	14%	133	100	71	43	30	29
	Pays de Loire	100	13%	49	>300	23	20	0,3	0
<b>B 2</b>	Poitou Charentes	145	18%	19	1	11	233	1	83
	Pays de Loire	212	15%	12	3	20	17	1	13
	Alsace	310	25%	33	1	32	19	1	28
<b>C 1</b>	Midi Pyrénées	122	28%	5	100	7	10	3	14
		151	14%	3	100	21	238	>300	71
	Pays de Loire	97	20%	29	30	25	2	>300	10
<b>C 2</b>	Aquitaine	273	10%	0,9	1	20	21	1	20
	Limousin	155	35%	5	1	6	11	1	6
<b>D</b>	Centre	641	15%	12	1	13	Pas d'analyse		
		416	12%	13	0,1	0	Pas d'analyse		

Légende -% G. témoin : % de germination de l'échantillon sur milieu eau-agar  
 - % G. à **0,3 mg/L** : % de germination à la dose 0,3 mg/L de substance active  
 Legend - % G. *témoin* : % of sample germination on a water-agar artificial medium  
 - % G. à **0,3 mg/L** : % of germination at the dose of 0,3 mg/L of active ingredient

Ainsi, les divergences enregistrées entre les 2 méthodes pourraient s'expliquer, en partie, par les sensibilités insuffisantes des deux techniques. Néanmoins, l'hypothèse de la présence de mécanismes de résistance autres que la mutation G143A ne peut pas être écartée pour les parcelles résistantes en test biologique et sans détection de la mutation G143A. Par ailleurs, il est à noter que, pour leur grande majorité, ces parcelles sont situées dans l'Ouest de la France (Pays de Loire, Centre, Poitou-Charentes, Aquitaine, Limousin, Midi-Pyrénées) alors que deux d'entre elles proviennent du Nord-Est (Alsace et Lorraine).

## CONCLUSION

La recherche de la mutation G143A chez *V. inaequalis* par PCR-RFLP est une technique intéressante pour détecter la résistance aux strobilurines induite par ce mécanisme. En effet, cette technique rapide est réalisable avec de faibles quantités de matériel, même non viable. De plus, elle présente peu d'échec et permet de s'affranchir du pouvoir germinatif aléatoire des échantillons à analyser.

L'analyse comparative des résultats obtenus chez *V. inaequalis*, en 2004 et 2005, par test de germination de spores et par PCR-RFLP, a permis de montrer qu'une majorité des cas de résistance a pour origine la mutation G143A et que ce mécanisme de résistance est très présent dans la région Midi-Pyrénées ainsi que dans une moindre mesure, en Rhône-Alpes. Les divergences observées entre les résultats en test biologique et en PCR nécessitent de plus amples investigations afin, dans un premier temps, de s'assurer que ces différences ne sont pas dues à des problèmes de technique d'analyse. Ainsi, les prochains plans de surveillance seront réalisés sur des milieux amendés en fongicide et avec SHAM afin de vérifier si ces divergences ne sont pas dues à la mise en place d'une respiration secondaire. La sensibilité des tests moléculaires devra être optimisée, voire modifiée en mettant au point un test de détection par PCR allèle spécifique.

Néanmoins, dans la mesure où les résultats divergents apparaissent principalement situés dans les régions du grand Ouest et que la littérature fait déjà référence à des cas de résistance non imputables à la mutation G143A, il apparaît nécessaire et intéressant, pour les prochaines campagnes, de continuer un suivi de ces parcelles à la fois par test biologique et par test moléculaire, afin de mieux connaître les mécanismes de résistance en présence et ainsi de mieux maîtriser leur évolution.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout particulièrement M. P. Leroux et Mme A. S. Walker (INRA Versailles) pour leur soutien scientifique ainsi que pour les conseils qu'ils nous ont prodigués au cours de cette étude.

## BIBLIOGRAPHIE

- Färber Küng R. B., Min Chin K. M., Leidbitter N., 2002 - Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Management Science*, 58, 261-267.
- Heaney S. P., Hall A. A., Davis S. A. and Olaya G., 2000 - Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross resistance group : current perspectives. In Proceedings Brighton Crop Protection Conference - *Pests and Diseases*, 2, 755-762.
- Jabs T., Cronshaw K., Freund A., 2001 - New strobilurin resistance mechanism in apple scab (*Venturia inaequalis*) and its distribution in Europe. *13<sup>th</sup> International Reinhardtsbrunn Symposium on fungicides*, Freidrichroda, Germany, Abs.
- Kim Y.S., Dixon P., Vincelli P. and Farman M.L., 2003 - Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopatholog*, 93, 891-900
- Leroux P. et Delorme R., 1997 - La respiration cellulaire, une cible toujours d'actualité pour divers groupes de produits phytosanitaires. *Phytoma*, 494, 17-23.
- Olaya G., Zheng D. and Köller W., 1998 - Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pesticide Science*, 54, 230-236.
- Sierotzki H, Wullschleger J. and Gisi U., 2000 - Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis f. sp. tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 107-112.
- Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S. and Gisi U., 2000 - Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1complex of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 56, 833-841.
- Steinfeld U., Sierotzki H., Parisi S., Poirey S., Gisi U., 2001 - Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science*, 57, 787-796.
- Steinfeld U., Sierotzki H., Parisi S., Poirey S., Gisi U., 2002 - Comparaison of resistance mechanism to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. *Modern Fungicides and Antifungal Compound III*. Edition H.W. Dehne, U. Gisi et al. Verlag Th. Mann GmbH&Co.KG, Gelsenkirchen.