

Master 2 Génétique et Développement des Plantes  
Université Bordeaux 1 / Université Bordeaux 2  
Année 2006–2007

**Rapport de stage de Master 2**

# **Adaptation du Mildiou de la Vigne à la Pression Fongicide : Étude du Fitness**

Étudiant : Pierre ABADIE

Laboratoire d'accueil : INRA Bordeaux-Aquitaine, UMR Santé Végétale

Encadrant : Marie-France CORIO-COSTET (DR)

Durée : Janvier 2007 – Juin 2007

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>4</b>
1.1	Mesures des paramètres de fitness . . . . .	4
1.2	Test de compétitivité . . . . .	4
1.2.1	Protocole général de repiquage du mildiou . . . . .	4
1.2.2	Protocole du test de compétitivité . . . . .	5
1.3	Crible fongicide . . . . .	5
1.4	PCR Quantitative . . . . .	6
1.4.1	Extraction d'ADN . . . . .	6
1.4.2	Amplification et quantification de l'ADN . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Résultats Obtenus</b>	<b>8</b>
2.1	Fitness des souches étudiées . . . . .	8
2.2	Test de compétitivité : mesures biologiques . . . . .	9
2.2.1	Standardisation des mesures . . . . .	9
2.2.2	Résultats expérimentaux . . . . .	10
2.2.3	Analyse statistique . . . . .	11
2.3	Test de compétitivité : mesures moléculaires . . . . .	14
2.3.1	Standardisation des mesures . . . . .	14
2.3.2	Résultats . . . . .	14
2.4	Modèle d'évolution . . . . .	16
<b>3</b>	<b>Discussion</b>	<b>16</b>
3.1	Rappel des objectifs de l'étude . . . . .	16
3.2	Analyse des résultats du test biologique de compétitivité . . . . .	16
3.3	Analyse des résultats de PCR quantitative . . . . .	17
3.4	Existe-t-il un coût de la résistance chez le mildiou de la vigne? . . . . .	17
3.5	Conclusions et Perspectives . . . . .	18

---

## Introduction

Le mildiou (de l'anglais *mildew*) est le nom générique d'une série de maladies cryptogamiques des plantes, telles que le mildiou de la Pomme de Terre, des cucurbitacées ou de la vigne. Les symptômes classiques du mildiou de la vigne sont la présence de "taches d'huile" sur les feuilles, de lésions brunes sur les feuilles et les tiges, ou encore le pourrissement des baies. L'agent responsable de cette maladie est *Plasmopara viticola*, un microorganisme appartenant à la famille des Oomycètes, anciennement affilié aux champignons et aujourd'hui rattaché aux algues brunes.

Il s'agit d'un parasite biotrophe spécifique à la vigne, et ne pouvant pas survivre sans son hôte. Son cycle biologique est assez simple : un cycle sexué durant la mauvaise saison, avec la formation d'"oeufs d'hiver" de résistance, et des cycles asexués au cours du printemps et de l'été qui sont responsables de la maladie. Le mycélium asexué libère des sporanges par voie aérienne. L'humidité atmosphérique entraîne la libération de spores par les sporanges, qui germent sur la plante et pénètrent au niveau des stomates pour infecter les tissus.

Les premières descriptions en France de cette maladie provenant des États-Unis datent de 1878, et aujourd'hui le mildiou de la vigne est toujours la cause de graves dégâts dans les vignobles. La lutte chimique est le moyen le plus efficace de combattre ce parasite qui mobilise 78% de l'application de fongicides dans les vignobles français. Même si des molécules efficaces ont été développées, des populations résistantes de ce pathogène apparaissent rapidement et régulièrement.

Depuis 1996, la famoxadone a été massivement utilisée dans la lutte contre *Plasmopara viticola*. Cette molécule appartient à la famille des fongicides QoI<sup>1</sup> qui inhibent la respiration mitochondriale en bloquant la chaîne de transport d'électrons au niveau de la membrane interne des mitochondries. Des études préliminaires ont montré que la résistance de *Plasmopara viticola* à la famoxadone est généralement causée par la mutation ponctuelle G143A (substitution d'une base guanine en adénine en position 143) dans la séquence du gène mitochondrial du cytochrome *b*.

Un défi actuel majeur dans la compréhension des processus de résistance aux fongicides ou aux molécules toxiques en général est la mesure du *fitness* des pathogènes, c'est-à-dire de la valeur sélective des parasites étudiés. Il est intéressant, aussi bien du point de vue scientifique que du point de vue appliqué, de comprendre et de mesurer l'adaptation de ces organismes à leur milieu et l'évolution de cette adaptation, responsable de l'émergence et de la propagation des gènes de résistance aux xénobiotiques. L'objectif général de cette étude est l'acquisition de données sur la propagation et le maintien des populations de *Plasmopara viticola* résistantes aux fongicides, dans l'optique d'une gestion plus raisonnée de l'application des xénobiotiques au vignoble. L'objectif plus spécifique de mon stage est l'étude du *fitness* et de la compétitivité de souches sensibles et résistantes à la famoxadone, afin de répondre à la question suivante :

Existe-t-il un *coût de la résistance* chez *Plasmopara viticola*, c'est-à-dire est-ce que les souches ayant acquis la résistance à la famoxadone sont moins compétitives que les souches

---

<sup>1</sup>Quinone outside Inhibitors

---

sensibles en absence de fongicide ?

La détection d'un coût de la résistance pourrait entraîner d'intéressantes répercussions sur les modes d'applications des fongicides au vignoble, puisque l'absence de traitement permettrait la disparition des populations résistantes.

Des données préliminaires sur le fitness des souches sensibles et résistantes ont été collectées avant mon arrivée au laboratoire, en mesurant plusieurs paramètres (taux de croissance, taux de sporulation, taille des sporanges), et n'ont pas permis de conclure en l'existence ou non d'un coût de la résistance chez *Plasmopara viticola*.

Les objectifs de mon stage sont chronologiquement les suivants :

1. Compléter les mesures précédentes sur des souches sensibles et résistantes afin d'obtenir des données sur le fitness.
2. Réaliser un test biologique de compétitivité entre des souches sensibles et résistantes : l'évolution des proportions de mélanges de souches sera suivie pendant 8 cycles asexués, afin de confirmer ou pas les données de fitness obtenues.
3. Utiliser les outils moléculaires pour préciser les résultats du test biologique : la mutation G143A sera utilisée comme marqueur par PCR quantitative.
4. Réaliser un modèle informatique de l'évolution de populations sensibles et résistantes, en fonction des données de fitness obtenues.

# 1 Matériel et Méthodes

Globalement, ça sera ce que j'ai mis dans mon rapport en anglais, en plus détaillé. Les 2 premières sousparties sont ajoutées.

## 1.1 Mesures des paramètres de fitness

Depuis l'année 2006, 37 souches de *Plasmopara viticola* ont été isolées à partir de différents vignobles français afin de mener cette étude globale sur l'adaptabilité et le fitness du mildiou de la vigne. Les premières manipulations de ce stage ont consisté à terminer la mesure de paramètres de fitness pour ces souches, afin de calculer un *indice global de fitness*, ou FIC (Fitness Index Complex). Les paramètres étudiés ont été les suivants :

- capacité de sporulation = nombre de sporanges produits à partir d'une goutte d'inoculum de 15  $\mu\text{L}$  à 4000 sporanges/mL après 7 jours de croissance.
- fréquence d'infection = proportion de zones infectées sur 45 zones inoculées après 7 jours de croissance.
- temps de latence = temps nécessaire pour obtenir 50% de la sporulation maximale.
- taille des sporanges.
- efficacité d'infection = taux de zoospores germant dans un stomate par rapport aux zoospores ne germant pas ou germant en dehors d'un stomate.
- fitness de Malthus  $M$  = croissance de la population =  $\frac{\ln(\frac{N_t}{N_0})}{t}$  où  $N$  est le nombre de sporanges et  $t$  est le temps.

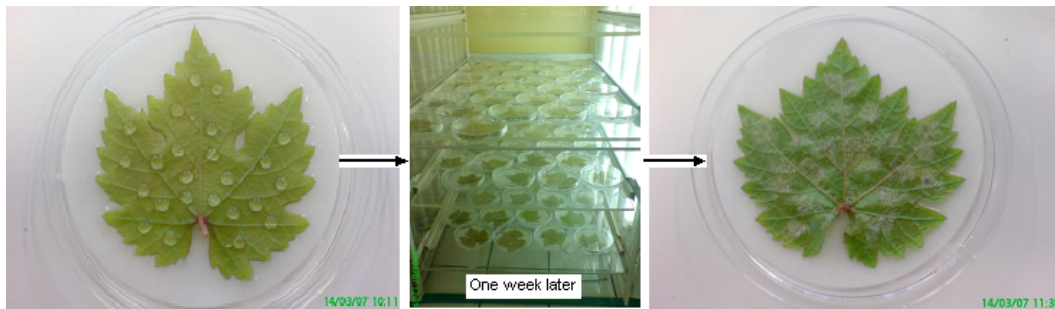
Le FIC est alors égal au produit de tous ces paramètres. Il est sans unité, et est relatif entre les souches.

## 1.2 Test de compétitivité

### 1.2.1 Protocole général de repiquage du mildiou

Les isolats de *Plasmopara viticola* sont cultivés sur des feuilles détachées, lavées à l'eau permutée stérile, séchées entre deux épaisseurs de sopalin et placées sur des papiers filtres saturés en eau, dans des boîtes de Pétri, à 22°C. L'ensemble des expériences est réalisé avec des feuilles de vignes de cépage Cabernet-Sauvignon cultivées en serre depuis 4 semaines.

Afin de repiquer le mildiou, les sporanges sont prélevés d'une feuille contaminée à l'aide d'un pinceau stérile pour réaliser une suspension dans de l'eau permutée stérile. La concentration de cette suspension est ajustée selon les expériences, à l'aide d'une cellule de Malassez (généralement à 40000 sporanges/mL). Puis, 24 gouttes de 15  $\mu\text{L}$  de cet inoculum sont déposées sur une nouvelle feuille. Une nuit d'attente à 22°C est nécessaire pour permettre l'ouverture et l'infection des stomates de la feuille par les spores fraîchement libérées des sporanges. Enfin, les gouttes sont séchées avec une pompe à vide, et les boîtes sont scellées pour maintenir une humidité constante. Après une semaine à 22°C, la sporulation du mildiou peut être observée (figure 1).

FIG. 1 – Repiquage *in vitro* du mildiou de la vigne.

### 1.2.2 Protocole du test de compétitivité

L'objectif du test de compétitivité est de suivre l'évolution des proportions de mélanges de souches sensibles et résistantes au cours de plusieurs cycles asexués.

Pour chaque couple de souches sensible/résistante, 3 suspensions de sporanges initiales à 40000 sporanges/mL sont préparées, à 20% de résistant, 50% de résistant, et 80% de résistant. Chaque suspension est inoculée sur 4 feuilles indépendantes. Après une semaine de croissance, les sporanges obtenus à partir des 4 feuilles sont réinoculés sur 4 nouvelles feuilles. Ces repiquages sont répétés durant 8 cycles asexués, soit 8 semaines d'expérience.

À chaque cycle, des échantillons des mélanges de sporanges sont prélevés pour réaliser un crible fongicide et une mesure par PCR quantitative (voir par la suite) afin d'estimer les nouvelles proportions de souches résistantes et sensibles au cours des cycles reproductifs. La figure 2 illustre le schéma général du test de compétitivité mis en place.

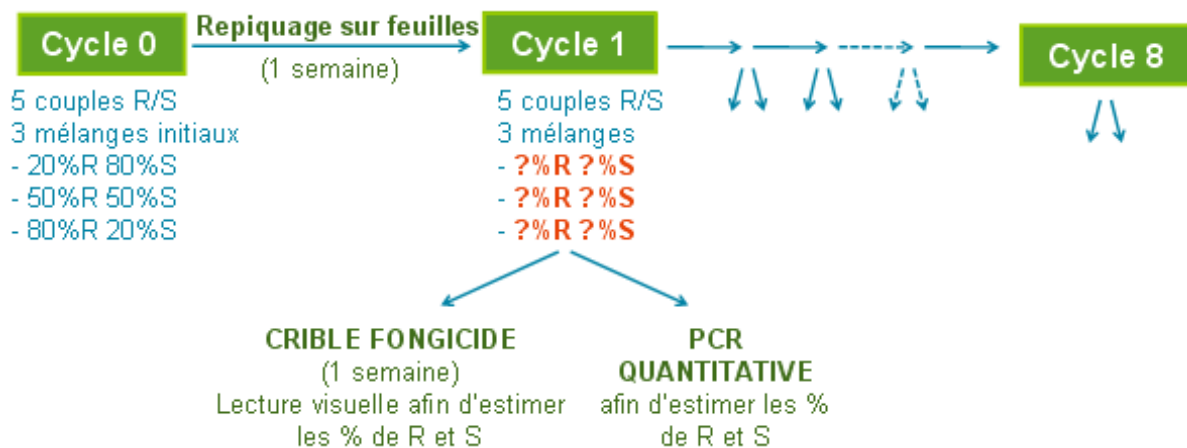


FIG. 2 – Schéma global du test de compétitivité réalisé dans cette étude.

L'ensemble du test de compétitivité est répété indépendamment deux fois par semaine.

### 1.3 Crible fongicide

L'objectif du crible fongicide est d'estimer le pourcentage de résistant d'une suspension de sporanges, en faisant pousser le champignon en présence de fongicide.

En même temps que les feuilles sont inoculées avec les suspensions de résistant/sensible pour le test de compétitivité, une partie de cette suspension est utilisée pour inoculer des disques de feuilles traitées au fongicide : pour chaque proportion initiale de chaque couple, deux boîtes de Pétri contenant 8 disques de feuilles sont préparées. Les disques sont sprayés avec de la famoxadone à 100mg/mL, et sont séchés sous un ventilateur après une nuit de pénétration du fongicide. 3 gouttes de 15 $\mu$ L d'inoculum sont déposées sur chaque disque, conservées à l'obscurité à 22°C pendant la nuit, puis séchées à la pompe à vide.

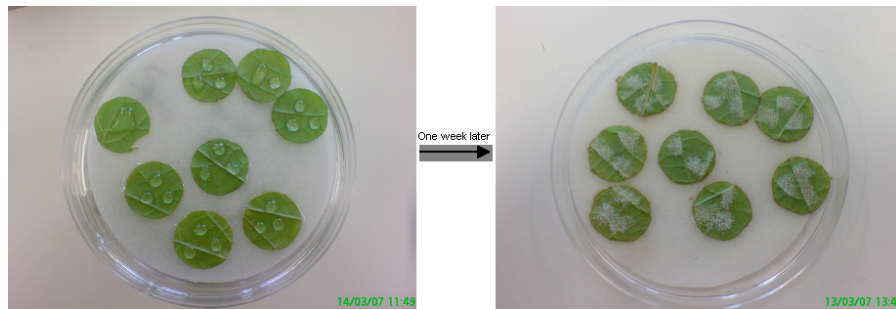


FIG. 3 – Croissance des taches sporulantes de mildiou sur disques de feuilles traités à la famoxadone.

Après une semaine de croissance à 22°C, les taches de sporulation correspondant à la croissance de la souche résistante sont observées (figure 3). À l'aide d'une échelle visuelle (figure 4), on attribue une note à chaque tache, ce qui permet d'estimer la proportion de la souche résistante dans le mélange inoculé initialement.

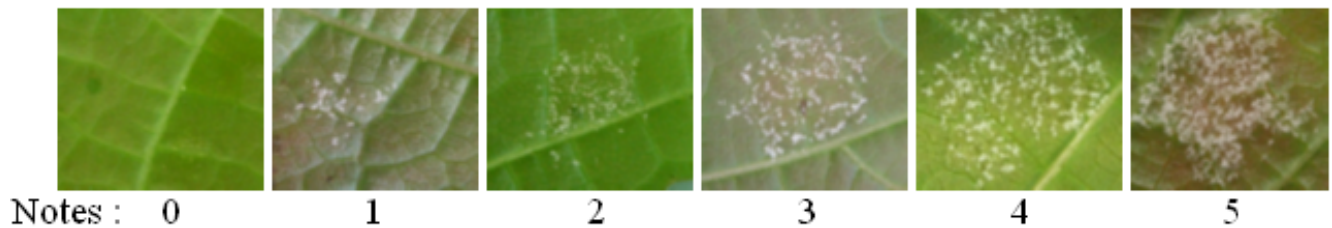


FIG. 4 – Échelle de notation visuelle.

## 1.4 PCR Quantitative

Parallèlement au crible fongicide, une méthode de quantification de la proportion de souches résistante/sensible basée sur la détection de la mutation G143A dans le gène mitochondrial codant pour la protéine du cytochrome *b* est mise en place.

### 1.4.1 Extraction d'ADN

Une partie des suspensions de sporanges utilisées pour les repiquages du test de compétitivité et pour le crible fongicide est prélevée pour la PCR quantitative. Pour chaque proportion de chaque couple de souches, 2 tubes de 0,5mL de suspension de sporanges et 4 disques de

feuilles contenant chacun 3 taches sporulantes sont préparés à chaque cycle, et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour en extraire l'ADN total, selon le protocole suivant :

- Les échantillons sont centrifugés 10min 1300rpm, le culot est refroidi à  $-80^{\circ}\text{C}$  et lyophilisé sous vide à  $-55^{\circ}\text{C}$  durant une nuit.
- Le culot ainsi déshydraté est broyé à l'aide d'un pilon, puis  $600\mu\text{L}$  de solution de CTAB<sup>2</sup> (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide) à  $65^{\circ}\text{C}$  sont ajoutés.
- Après 1h d'incubation,  $400\mu\text{L}$  de chloroforme-isoamylalcool sont ajoutés, et les tubes sont agités lentement pendant 10min. Puis, les tubes sont centrifugés 10min à 13000rpm, et on conserve la phase aqueuse.
- 2/3 de volume d'isopropanol froid ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) sont ajoutés, le mélange est secoué doucement pendant 10min, et l'ADN est laissé à précipiter pendant au moins 2h à  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Les tubes sont centrifugés 10min à  $4^{\circ}\text{C}$  et 13000rpm, le culot est rincé avec  $800\mu\text{L}$  d'éthanol à  $-20^{\circ}\text{C}$ , et centrifugé de nouveau 10min à 13000rpm.
- Enfin, le culot est séché 15 minutes au speed-vac, resuspendu dans  $50\mu\text{L}$  d'eau milliQ stérile et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.4.2 Amplification et quantification de l'ADN

Dans le but de mesurer les proportions de résistant/sensible dans les mélanges, une stratégie basée sur la détection de la mutation G143A (qui confère la résistance à la famoxadone) a été mise en place, basée sur l'utilisation de 2 couples d'amorces en PCR quantitative :

- Un premier couple spécifique à *Plasmopara viticola*, ne discriminant pas l'allèle résistant ou sensible, qui conduit à l'amplification du gène d'une portion du gène du cytochrome *b*.
- Un deuxième couple conduisant aussi à l'amplification du gène du cytochrome *b*, mais pour lequel une des deux amorces s'hybride directement avec la mutation G143A, et qui est donc par conséquent spécifique à l'allèle résistant.

La figure 5 illustre la façon dont s'hybrident les deux couples d'amorces.

Ainsi, en réalisant une PCR quantitative avec les deux couples d'amorces pour chaque échantillon, il est possible d'effectuer le rapport entre l'ADN amplifié par le couple d'amorce spécifique et celui amplifié par le couple non spécifique au résistant, ce qui nous permet d'obtenir la proportion de résistant dans le mélange considéré.

Le protocole suivant est utilisé pour l'amplification :  $5\mu\text{L}$  de Master Mix SybrGreen<sup>3</sup>,  $0,1\mu\text{L}$  de chaque amorce à  $X\mu\text{M}/\mu\text{L}$ , et  $2,5\mu\text{L}$  d'ADN extrait précédemment complétés à  $10\mu\text{L}$  avec de l'eau milliQ sont soumis à 30 cycles de PCR.

<sup>2</sup>25mL de Tris 2M pH<sub>8</sub>, 20mL d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) 0,5M pH<sub>8</sub>, 41g de NaCl solide, 10g de CTAB et 5g de PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone 40) ajusté à 1L avec de l'eau milliQ

<sup>3</sup>Le SybrGreen est un fluorophore qui se émet à Xnm lorsque il s'hybride à de l'ADN double brin, il est utilisé pour quantifier l'ADN amplifié durant les cycles de PCR



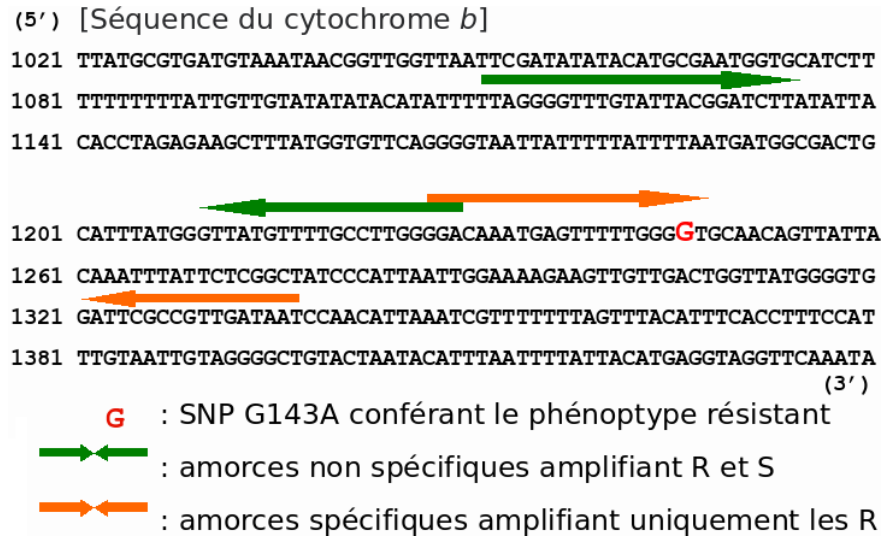


FIG. 5 – Hybridation des deux couples d'amorces utilisées en PCR quantitative

## 2 Résultats Obtenus

### 2.1 Fitness des souches étudiées

La majorité des résultats de fitness suivants ont été obtenus au cours de l'année dernière, et le début de mon stage a consisté à terminer ces mesures, qui sont la base de la suite des expériences. Je ne détaillerai donc pas l'ensemble des résultats obtenus, mais simplement la synthèse de toutes les expérimentations. Le diagramme de la figure 6 montre l'indice de fitness obtenu pour l'ensemble des souches étudiées.

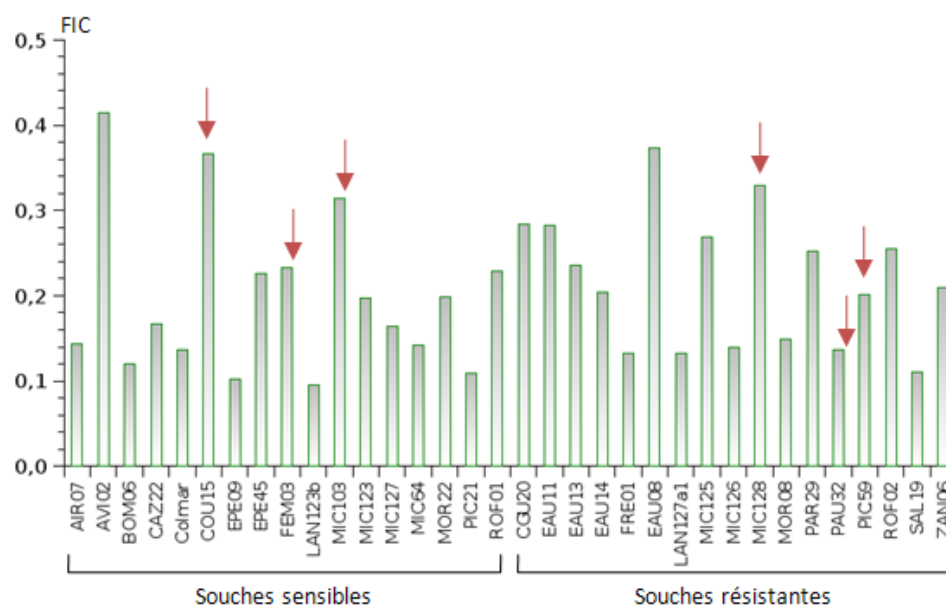


FIG. 6 – FIC (fitness index complex) obtenu pour les 34 souches étudiées (flèches rouges : souches sélectionnées pour le test de compétitivité).

Ces résultats montrent qu'il existe une variabilité au niveau du fitness de ces souches prove-

nant de divers vignobles français. Toutefois, la valeur moyenne de FIC est de  $0,22 \pm 0,09$  pour les souches sensibles à la famoxadone, et  $0,27 \pm 0,09$  pour les souches résistantes. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,17$ ). Ainsi même si pour certains paramètres étudiés, comme l'indice de Malthus, il existait des différences entre les souches sensibles et résistantes, il semble donc que l'on ne puisse pas détecter de coût de la résistance chez *Plasmopara viticola*.

Toutefois, ces données servent de base à la mise en place du test de compétitivité, qui vise à confirmer ou infirmer les données de fitness. Pour cela, des couples de souches résistante et sensible sont formés : Les souches utilisées sont indiquées par une flèche rouge sur la figure 6, et les couples du test de compétitivité sont détaillés dans le tableau 1.

Souche	Origine	Année	FIC	Phénotype
COU15	Petit Couhins (33)	2003	0,366	S
MIC128	Castillon (32)	2005	0,329	R
PIC59	Couhins (33)	2003	0,201	R
FEM03	Puligny-Montrachet (21)	2003	0,233	S
PAU32	Pauillac (33)	2003	0,137	R
COU15	Petit Couhins (33)	2003	0,366	S
PAU32	Pauillac (33)	2003	0,137	R
MIC103	Fleurie (69)	2004	0,315	S

TAB. 1 – Caractéristiques des couples de souches utilisées lors du test de compétitivité (S=sensible à la famoxadone, R=résistante).

Ces couples ont été choisis en fonction de leur FIC et de la disponibilité en matériel biologique. Pour les couples COU15/MIC128 et PIC59/FEM03, les FIC des deux souches sont équivalents. Pour les couples PAU32/COU15 et PAU32/MIC103, la souche résistante a un mauvais fitness par rapport à la sensible, on s'attend donc à ce qu'elle soit moins compétitive.

## 2.2 Test de compétitivité : mesures biologiques

### 2.2.1 Standardisation des mesures

Dans le but de déterminer l'évolution des proportions des souches sensibles et résistantes au cours du temps, il faut tout d'abord s'assurer de l'exactitude de la méthode de notation visuelle utilisée dans le crible fongicide.

Pour cela, une gamme étalon est réalisée en inoculant des proportions connues de souches résistantes (0 à 100%) dans les conditions du crible fongicide (3 gouttes par disque traité à la famoxadone). Après une semaine de culture, les taches sporulantes sont notées de 0 à 5 en utilisant l'échelle de notation visuelle (figure 4). Les résultats des inoculations à 40000 sporanges/mL sont présentés figure 7.

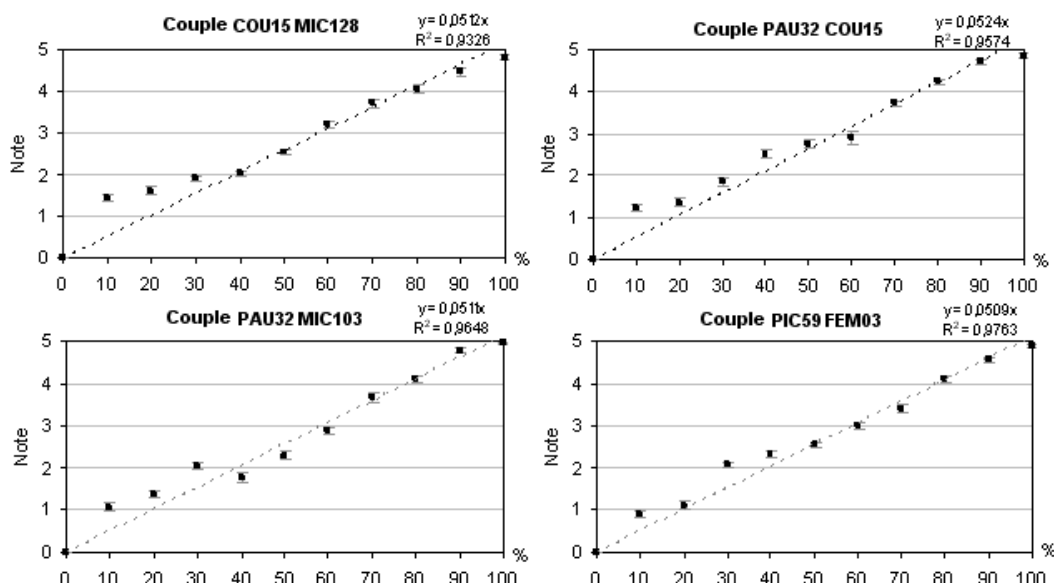


FIG. 7 – Gammes étalon de la notation visuelle du crible fongicide pour les quatre couples étudiés. Abscisse : pourcentage de souche résistante (connu) ; Ordonnée : note visuelle ; Erreur : SEM = standart error mean ; Pointillés : régression linéaire et coordonnées correspondantes.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 7, il existe une bonne corrélation entre le pourcentage de souche résistante et la note visuelle correspondante après une semaine de croissance sur fongicide. De plus, un inoculum de concentration égale à 40000 sporanges/mL étend la notation visuelle de 0 à 5 de façon linéaire. Cette concentration nous permet donc d’avoir une bonne précision de notation, et sera utilisée pour la suite de l’étude.

### 2.2.2 Résultats expérimentaux

La figure 8 présente les résultats obtenus lors des 2 tests biologiques de compétitivités qui ont été réalisés.

Le premier point que l’on peut remarquer sur ces courbes est la faible taille des barres d’erreur pour chaque point : au cours des 2 tests de 8 semaines (8 cycles), les souches ont poussé de façon homogène entre les différentes boîtes, ce qui est un élément positif dans la réalisation délicate de ces tests biologiques qui sont très dépendants des conditions environnementales. Cependant, on constate qu’il existe des différences d’évolution entre le test 1 et le test 2, qui ont été réalisés indépendamment dans le temps.

Pour le couple COU15/MIC128, il est difficile de dégager une tendance vers l’augmentation ou la diminution des proportions de la souche résistante au cours du temps. Pour les couples PAU32/COU15 et PIC59/FEM03, on assiste à une diminution de la souche résistante dans le test 2, qui n’est apparemment pas observée dans le test 1. Enfin pour le couple PAU32/MIC103, la souche résistante semble augmenter dans le test 1, et chuter dans le test 2.

Cependant, ces données brutes ne doivent et ne peuvent pas être analysées telles quelles : un travail statistique est nécessaire afin de déterminer avec certitude et précision les tendances

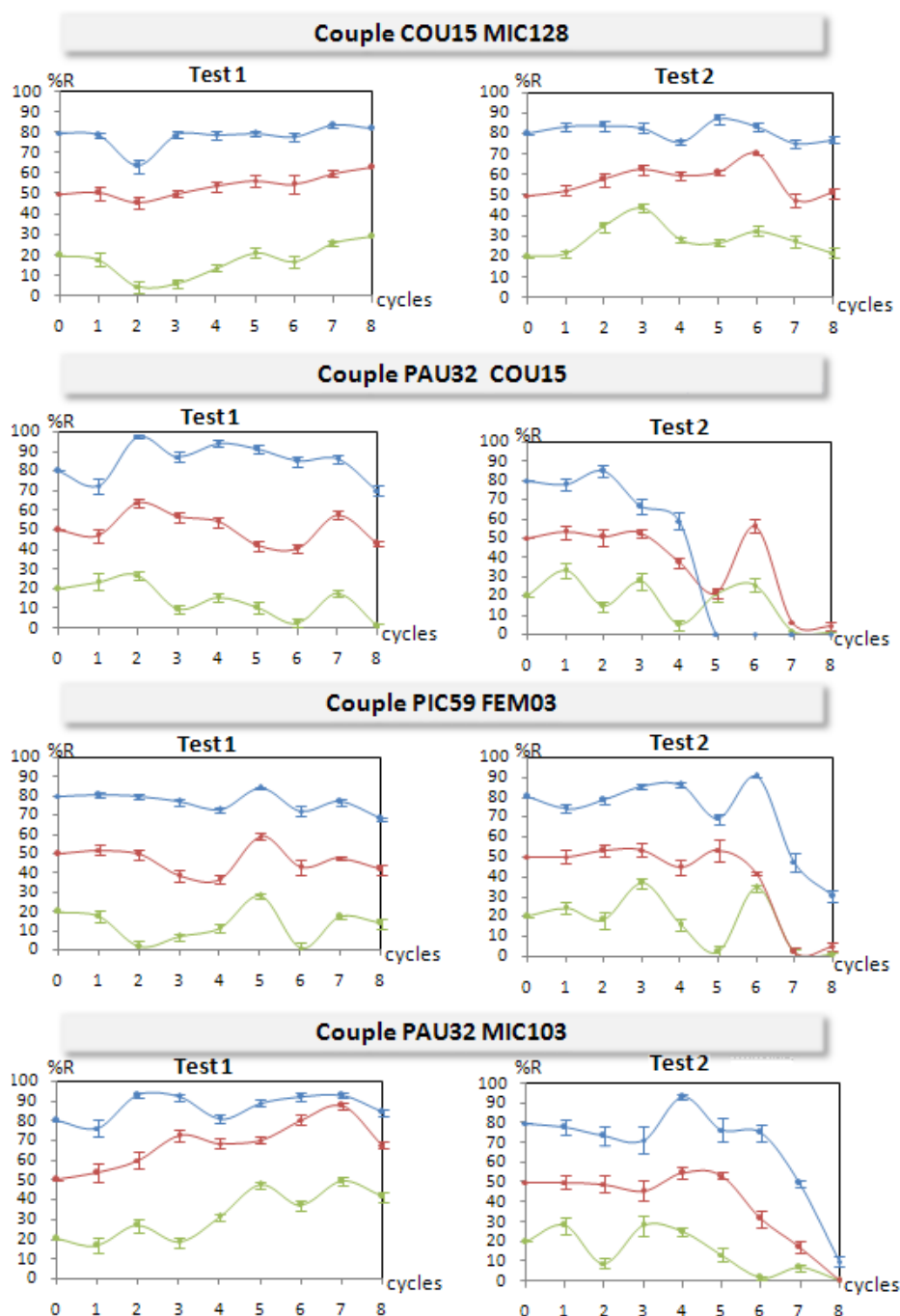


FIG. 8 – Test biologique de compétitivité : évolution du pourcentage de souche résistante dans les mélanges pour chaque couple au cours des deux répétitions (à gauche : 1<sup>er</sup> test ; à droite : 2<sup>ème</sup> test ; en bleu : mélange initial 20% de résistant ; en rouge : 50% ; en vert : 80% ; barres d'erreur : SEM = standart error mean ; nombre de mesures par point : 42)

d'évolution de l'ensemble de ces résultats.

### 2.2.3 Analyse statistique

Leonard a proposé en 1959 une méthode mathématique de représentation et d'analyse de l'évolution de proportions de souches de *Puccinia graminis* en mélange. Elle est basée sur la

réflexion suivante :

Si on considère un mélange de 2 souches de fitness différent,  $s$  étant le rapport entre ces 2 fitness ( $s = cst$ ), et  $x_n, y_n$  le nombre d'individus de chaque souche à la génération  $n$ , on peut écrire que  $\frac{x_1}{x_0} = s \cdot \frac{y_1}{y_0}$ . Soient  $p_n$  et  $q_n$  les proportions de chaque souche ( $p = 1 - q$ ), on peut en déduire par un rapide calcul que  $\frac{p_1}{p_0} = s \cdot \frac{q_1}{q_0}$ , puis que  $\frac{p_n}{p_0} = s^n \cdot \frac{q_n}{q_0}$ . En remplaçant dans cette équation  $p$  par  $1 - q$  et après quelques manipulations, on aboutit alors à l'équation suivante,

$$\log\left(\frac{q_n}{1 - q_n}\right) = n \times \log\left(\frac{1}{s}\right) - \log\left(\frac{q_0}{1 - q_0}\right)$$

qui est de la forme  $y = ax + b$ .

Ainsi, en représentant sur un diagramme  $\log\left(\frac{\%R}{1 - \%R}\right)$  en fonction du nombre de cycles, le résultat théorique est une droite de pente égale à  $\log\left(\frac{1}{s}\right)$ . Si cette pente est positive, cela veut donc dire que  $s$  est inférieur à 1, et donc que la souche résistante a un meilleur fitness que la souche sensible.

La figure 9 rassemble les diagrammes de  $\log\left(\frac{\%R}{1 - \%R}\right)$  en fonction du temps pour chaque couple. Sur chaque diagramme, est représentée la régression linéaire des points obtenus pour les 3 mélanges initiaux et les 2 tests indépendants. Le code de couleur est expliqué dans la légende.

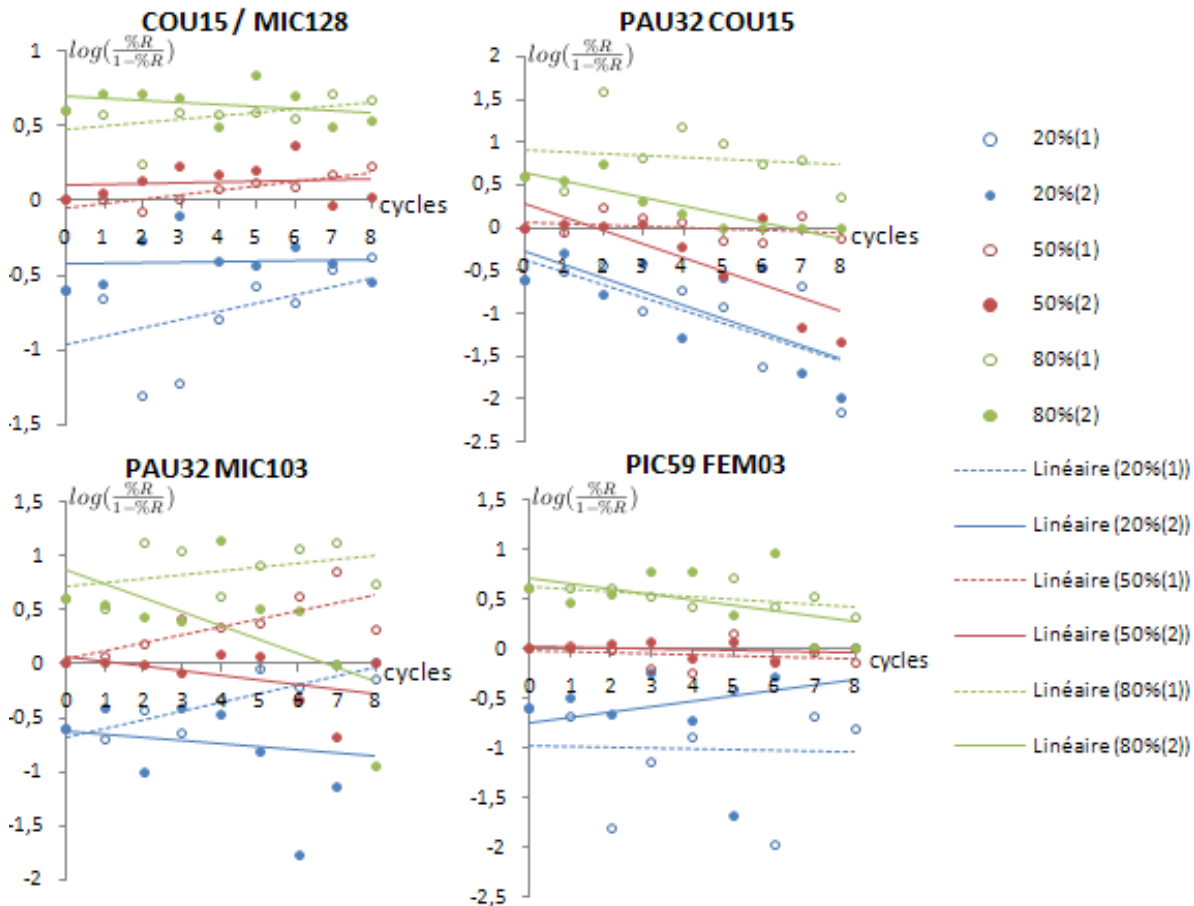


FIG. 9 – Représentation de  $\log\left(\frac{\%R}{1 - \%R}\right)$  en fonction du nombre de cycle pour chaque couple et chaque test (une régression linéaire est effectuée pour chaque série de données).

L'observation des résultats de la figure 9 nous permet d'affirmer pour chaque test s'il y a une augmentation ou une diminution de la proportion de souche résistante, en fonction de la pente de la droite de régression. De plus, un test  $t$  de Student unilatéral est réalisé à partir des deux valeurs de pente pour chaque couple et chaque mélange, afin d'affirmer ou de rejeter l'hypothèse selon laquelle la proportion augmente ou diminue.

Par la suite, la moyenne des résultats des tests 1 et 2 (figure 8) est réalisée, et accompagnée des résultats des calculs de significativité d'évolution des proportions. L'ensemble de ces résultats est synthétisé en figure 10.

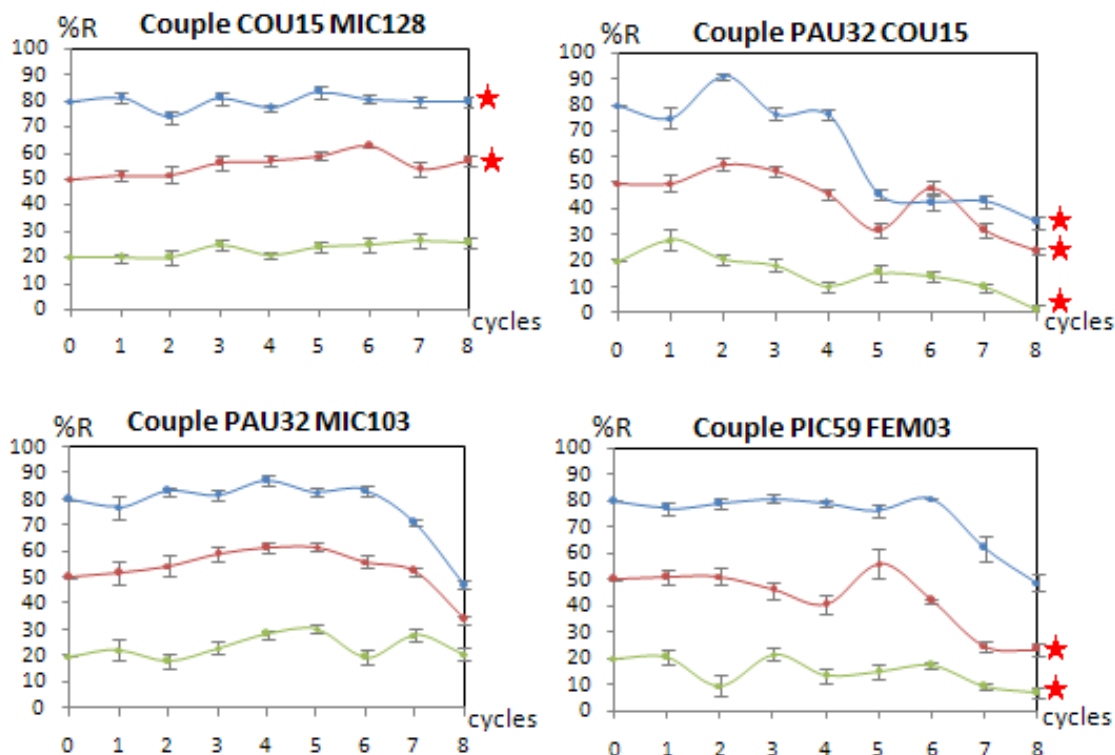


FIG. 10 – Évolution moyenne des proportions de souches résistantes sur l'ensemble des deux tests (erreur : SEM = standard error mean; étoile rouge : test  $t$  de Student significatif avec  $\alpha = 0,05\%$ ).

Les évolutions de proportions visibles sur les courbes de la figure 10 sont significatives (test  $t$  de Student avec risque  $\alpha$  de 0,05%, étoiles rouges sur les graphiques) pour tous les couples sauf PAU32/MIC103.

- Couple COU15/MIC128 : ces deux souches ont un FIC équivalent (COU15 : 0,366; MIC128 : 0,329). On constate que leurs proportions ne varient pas au cours des 8 cycles, ce qui est cohérent avec les données de fitness.
- Couple PAU32/COU15 : la souche résistante PAU32 a un FIC plus faible que COU15 (0,137 contre 0,366). La proportion de PAU32 diminue au cours des 8 cycles, il semble donc que le fitness et la compétitivité soient liés, ce qui est cohérent.
- Couple PIC59/FEM03 : ces deux souches ont un FIC équivalent (0,201 et 0,233). Même si on observe un chute de la souche résistante en fin d'expérience, les proportions ne varient

quasiment pas avant 6 cycles.

- Couple PAU32/COU15 : la souche résistante PAU32 a un FIC plus faible que MIC103 (0,137 contre 0,315). Il s'agit du seul couple pour lequel les évolutions obtenues ne sont pas statistiquement significatives. Ceci s'explique par le fait que la proportion de souche résistante PAU32 tend à augmenter dans le test 1, et à diminuer dans le test 2 (voir figure 8).

Afin de pouvoir réellement conclure sur les évolutions de toutes ces souches, il est nécessaire d'analyser les résultats des mesures de PCR quantitatives. En effet, ces mesures sont basées sur les mêmes tests biologiques de compétitivité, mais utilisent des outils moléculaires pour quantifier les proportions de souches.

## 2.3 Test de compétitivité : mesures moléculaires

### 2.3.1 Standardisation des mesures

De la même façon que pour les mesures biologiques (voir partie 2.2.1), des gammes de concentrations de sporanges sont réalisées pour tous les couples. L'ADN est extrait à partir de ces solutions d'inoculum, et la PCRQ est réalisée à partir de ces échantillons (voir partie 1.4.2). Les résultats, non montrés ici, montrent une relation linéaire entre la proportion de souche résistante dans le mélange à analyser, et la proportion d'ADN de la souche résistante obtenue avec la PCR. Ainsi, un rapide calcul nous permet pour chaque couple de déterminer la proportion de souche résistante dans le mélange à analyser, à partir des résultats de PCRQ.

### 2.3.2 Résultats

Les courbes présentées par la suite sont les moyennes de 4 mesures indépendantes par PCRQ. L'évolution de  $\log\left(\frac{\%R}{1-\%R}\right)$  est aussi présentée, pour permettre de voir clairement si les proportions augmentent ou diminuent au cours du temps.

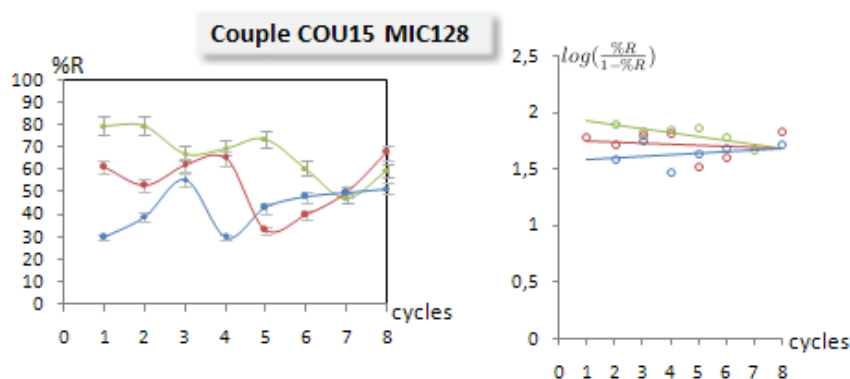


FIG. 11 – Mesure par PCR quantitative de l'évolution de la proportion de la souches résistante MIC128, à partir des trois mélanges initiaux (20%, 50%, 80%) (courbe de gauche : évolution de %R ; courbe de droite : évolution de  $\log\left(\frac{\%R}{1-\%R}\right)$  ; barres d'erreur : SEM = standart error mean)

Pour le couple COU15/MIC128 (figure 11), il est difficile de dégager une évolution à partir des résultats bruts. En revanche, l'observation de l'évolution de  $\log(\frac{\%R}{1-\%R})$  montre qu'on n'a pas de réelle augmentation ou diminution de la proportion de souche résistante. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus par les mesures biologiques (figure 10).

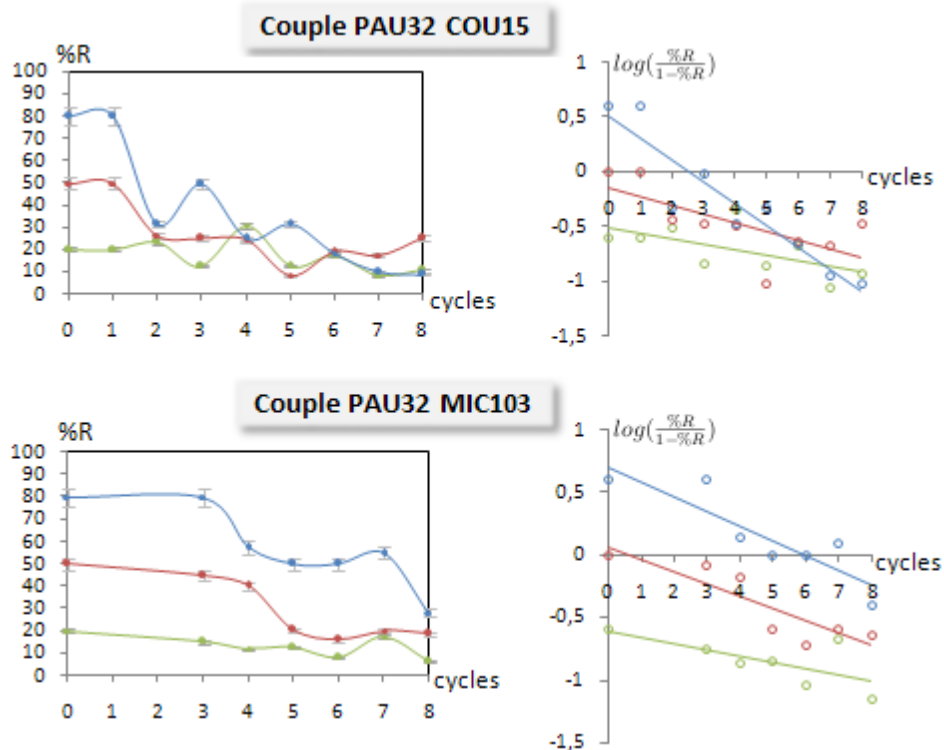


FIG. 12 – Mesure par PCR quantitative de l'évolution des proportions de la souche résistante pour les deux couples PAU32/COU15 et PAU32/MIC103, à partir des trois mélanges initiaux (20%, 50%, 80%) (courbe de gauche : évolution de %R ; courbe de droite : évolution de  $\log(\frac{\%R}{1-\%R})$  ; barres d'erreur : SEM = standard error mean)

Pour le couple PAU32/COU15 (figure 12), on obtient des résultats équivalents aux résultats des mesures biologiques de la figure 10, avec la diminution de la souche PAU32. Pour le couple PAU32/MIC103, on observe aussi la diminution de la souche PAU32, qui n'était pas significativement observable lors des mesures biologiques.

Pour le couple PIC59/FEM03 (figure 13), on constate cette fois une augmentation marquée de la souche résistante PIC59, alors que les mesures biologiques (figure 10) ne montraient pas d'augmentation, et présentaient même une diminution à partir du cycle 6.



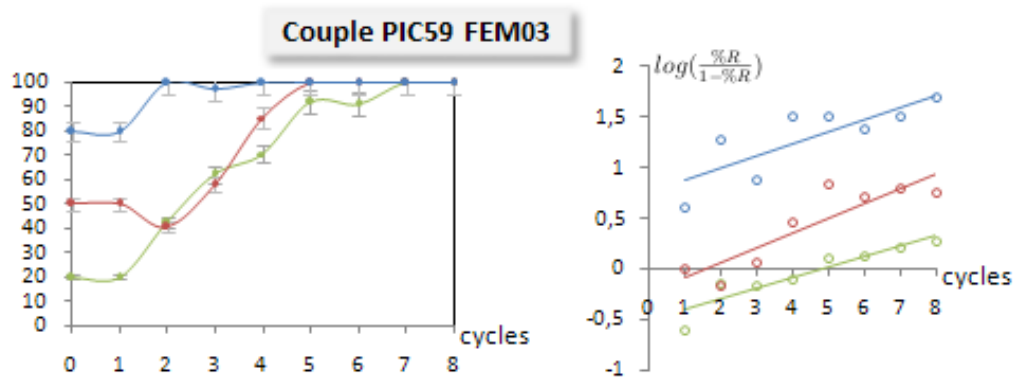


FIG. 13 – Mesure par PCR quantitative de l'évolution de la proportion de la souche résistante PIC59, à partir des trois mélanges initiaux (20%, 50%, 80%) (courbe de gauche : évolution de %R; courbe de droite : évolution de  $\log(\frac{\%R}{1-\%R})$ ; barres d'erreur : SEM = standard error mean)

## 2.4 Modèle d'évolution

# 3 Discussion

## 3.1 Rappel des objectifs de l'étude

Cette étude s'insère dans un projet visant à acquérir des données sur l'apparition, le maintien et la dispersion de la résistance à des fongicides chez *Plasmopara viticola*. Les objectifs étaient dans un premier temps, de déterminer un indicateur du fitness, appelé FIC, d'un grand nombre de souches françaises, afin de voir si l'acquisition de la résistance à un fongicide s'accompagne d'un handicap évolutif, d'un coût de la résistance, ce qui permettrait la mise en place de nouvelles stratégies de lutte contre ce parasite. Après avoir mesuré ces valeurs de FIC, il était nécessaire dans un deuxième temps de valider ces résultats en mettant en place un test de compétitivité, dont les résultats confirmeraient ou au contraire rejetteraient cette méthode de mesure du fitness chez un champignon.

## 3.2 Analyse des résultats du test biologique de compétitivité

Cette expérience se base sur un protocole délicat, en raison des nombreux paramètres difficiles à contrôler au cours de ce test biologique. En effet, la mise en interaction de deux êtres vivants (ici le mildiou et la vigne) pour la réalisation d'une expérience peut s'avérer hasardeuse en raison des réactions possibles, indétectables, ou inconnues qui peuvent avoir lieu. Des variations mêmes minimales de l'environnement (température, luminosité, humidité) peuvent aussi entraîner des biais dans les observations. De plus, l'étalement du test sur 8 semaines nécessite une grande vigilance vis-à-vis des contaminations possibles par des hyperparasites, ou du maintien en vie des souches étudiées.

Toutefois, les résultats du test s'avèrent concluants : les souches ont été conservées sans contamination, et les observations mesurées ne présentent pas d'aberrations. La réalisation

d'un grand nombre de répétitions et de contrôles permet d'obtenir des données statistiquement solides. En effet, chaque point représenté sur la figure 10 est le résultat de 88 mesures, et est associé à un faible écart-type.

Si on regarde les résultats pour chaque couple (figure 10), l'évolution des proportions des souches résistantes est en accord avec les données de fitness (tableau 1) pour les couples COU15/MIC128 et PAU32/COU15. Les résultats du couple PAU32/MIC103 ne sont pas exploitables en raison de l'évolution différente observée entre le test 1 et le test 2 (figures 8 et 9). Le couple PIC59/FEM03 présente une très légère diminution, concordante avec les données de fitness. Ces données biologiques doivent être complétées par les mesures moléculaires.

### 3.3 Analyse des résultats de PCR quantitative

Dans cette étude, 2 méthodes différentes sont utilisées pour mesurer la proportion de souche résistante et sensible, à partir des mêmes échantillons issus des tests biologiques. La première méthode consiste à cribler le mélange en le cultivant en présence de fongicide pendant une semaine, et à attribuer une note visuelle à la sporulation observée pour déduire la proportion initiale. La seconde se base sur la mutation G143A conférant la résistance au fongicide, et quantifie la proportion de cet allèle par rapport à l'ADN total extrait à partir du mélange initial.

Les avantages de la méthode moléculaire sont multiples : elle est beaucoup plus rapide, plus précise et en théorie plus reproductible, mais coûte plus cher. Si on compare les résultats obtenus via cette méthode (figures 11, 12 et 13), on constate qu'ils sont similaires et confirment les résultats du crible fongicide pour les couples COU15/MIC128 et PAU32/COU15. Pour le couple PAU32/MIC103, la diminution de PAU32 est ici confirmée, alors qu'elle n'était pas significative avec la mesure biologique seule. En revanche, les résultats sont plus problématique pour le couple PIC59/FEM03 : ce couple présente une diminution de PIC59 faible mais significative en mesure biologique (figure 10), et présente une augmentation très nette et rapide de PIC59 en mesure moléculaire (figure 13). Bien que l'on s'attende à une diminution de PIC59 si on regarde les valeurs de FIC correspondantes, l'augmentation détectée par PCR quantitative ne peut être ignorée, sachant que la diminution observée en mesure biologique est très faible. Nous avons donc ici un exemple où la souche présentant le plus mauvais fitness semble la plus compétitive.

### 3.4 Existe-t-il un coût de la résistance chez le mildiou de la vigne ?

En dehors des résultats du couple PIC59/FEM03, les résultats du test de compétitivité confirment les données de fitness obtenues précédemment (tableau 1). Il est donc possible d'analyser les données de la figure 6 pour conclure à l'existence ou non d'un coût de la résistance chez *Plasmopara viticola*.

Comme nous l'avons vu, les valeurs moyennes de FIC entre les souches sensibles et résistantes ne sont pas statistiquement différentes, excepté pour la mesure de l'indice de Malthus (données non présentées). Or, certains auteurs (pringle...) considèrent que les phases asexuées

des champignons sont comparables au type de reproduction bactérien, et la mesure de l'indice de Malthus serait donc le meilleur moyen de déterminer le fitness des champignons. Toutefois, les résultats du test de compétitivité qui sont concordants avec les valeurs de FIC tendent à montrer que la prise en compte des multiples paramètres (infectiosité, taille des sporanges, taux de sporulation, fréquence d'infection, ...) permet d'appréhender de manière plus précise la compétitivité, donc le fitness des champignons. Au vu des résultats disponibles, nous ne pouvons donc pas conclure à l'existence d'un coût de la résistance.

Si quelques études ont pu démontrer *in vitro* l'existence de coûts de la résistance chez les champignons en utilisant des mutants artificiels et des lignées isogéniques, l'étude de souches prélevées *in natura* se révèle beaucoup plus complexe, en raison du nombre et de la diversité des forces évolutives qui s'exercent au vignoble.

Comment peut-on expliquer la non-détection du coût ? L'hypothèse la plus simple est que le coût de la résistance n'existe pas. En effet, une étude a montré que la mutation G143A dans le gène du cytochrome *b* ne semblait pas avoir de conséquence sur l'efficacité de la respiration mitochondriale, le fitness des souches résistantes ne serait alors pas modifié. L'autre hypothèse est que le coût existe, bien qu'il ne soit pas détecté : les seules souches résistantes sélectionnées au vignoble seraient des souches possédant initialement un très bon fitness, et l'apparition d'un coût de la résistance ne conduirait donc pas à leur élimination. Une deuxième explication est possible : une étude d'évolution *in vitro* a pu montrer qu'un coût apparaissait en même temps que la résistance, mais que de nouvelles mutations pouvaient rapidement apparaître et rétablissaient la valeur du fitness des souches résistantes au niveau des souches sensibles. La sélection naturelle pourrait donc rapidement faire disparaître un coût de la résistance grâce à de nouvelles mutations.

### 3.5 Conclusions et Perspectives

conclure en un petit paragraphe