



ASSOCIATION FRANÇAISE DE PROTECTION DES PLANTES

COMMISSION DES ESSAIS BIOLOGIQUES

RECOMMANDATIONS POUR UNE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX FONGICIDES EN VIGNE

*RECOMMENDATIONS FOR MONITORING RESISTANCE TO FUNGICIDES USED
ON GRAPEVINE*

DOCUMENT TECHNIQUE N° 23

1^{ère} édition : Avril 2015

Le document technique ci-après, a été établi par les membres de la Commission des Essais Biologiques de l'Association Française de Protection des Plantes.

Cette commission groupe des spécialistes :

- ayant pour tutelle le Ministère chargé de l'Agriculture : INRA, Service de la Protection des Végétaux, Anses ;
- des Organismes professionnels de l'agriculture ;
- de l'Industrie des produits phytopharmaceutiques

Ce document peut être révisé par la Commission, compte tenu de l'évolution des méthodes d'expérimentation et des techniques agricoles.

Animateur : **L. THIBAUT**

Rapporteur : **H. STEVA**

Texte élaboré en collaboration et avec le concours de : **A. COUSIN, E. GILBERT, O. GOEBEL, J. GROSMAN, A. HUFNAGL, H. MICHI, C. MONNIER, H. STEVA, L. THIBAUT.**

SOMMAIRE

PREAMBULE	1
1. OBJET DU DOCUMENT	1
2. DEFINITIONS	2
3. PHASES D'EVOLUTION D'UN PHENOMENE DE RESISTANCE	3
3.1. Les différentes phases	3
3.2. Phase 0 : Veille.....	4
3.2.1. Contexte	4
3.2.2. Modalités pratiques	4
3.3. Phase 1 : Emergence	5
3.3.1. Contexte	5
3.3.2. Modalités pratiques	5
3.4. Phase 2 : Progression	6
3.4.1. Contexte	6
3.4.2. Modalités pratiques	6
3.5. Phase 3 : Stabilisation	7
3.5.1 Contexte	7
3.5.2. Modalités pratiques	7
3.6. Phase 4 : Régression.....	8
3.6.1. Contexte	8
3.6.2. Modalités pratiques	8

PREAMBULE

« La résistance est l'ajustement, naturel et transmissible à la descendance, de la capacité de certains individus d'une population à survivre à un traitement phytosanitaire qui permettrait normalement un contrôle efficace. Même s'il est souvent possible de démontrer une résistance au laboratoire, cela ne veut pas nécessairement dire que le contrôle de l'organisme nuisible au champ sera réduit. 'Résistance pratique' est le terme utilisé pour la perte d'efficacité au champ due à une modification de la sensibilité. » (Source EPPO PP 1/213 (3)).

Le suivi - ou monitoring - de la sensibilité des populations naturelles des agents pathogènes aux molécules antifongiques est primordial afin d'évaluer le plus précisément possible le risque de sélection et/ou d'extension de résistances. L'objectif final est de définir les stratégies les plus adaptées de prévention ou de gestion des résistances, spécifiques à chaque mode d'action fongicide, se basant sur des informations pertinentes.

Chez les agents pathogènes de plantes, l'évolution de la sensibilité aux fongicides apparaît principalement reposer sur la modification du site d'action de ce fongicide. Le niveau de risque de sélection et/ou d'extension d'une résistance à un fongicide donné est donc dépendant de son mode d'action, des modes d'actions complémentaires disponibles pour l'usage considéré, de son utilisation, du type de résistance sélectionné et de l'évolution des populations de l'agent pathogène-cible ayant multiplié cette résistance.

Chez ces fongicides qui présentent des modes d'action spécifiques (unisites), visant une enzyme unique ou une voie biochimique particulière, d'autres mécanismes de résistance peuvent impliquer un efflux augmenté de substances actives via la surexpression de protéines de transport (mécanisme non spécifique d'une famille chimique et rencontré chez les souches de type MultiDrug-Resistants dites 'MDR'), des processus de détoxification, la surexpression de la protéine-cible ou encore l'activation de voies métaboliques alternatives.

Il existe également des fongicides ayant un mode d'action multisite qui, du fait de leur nature, ne sont pas ou rarement concernés par des phénomènes de résistance.

La vigne, culture pérenne, est régulièrement soumise à différentes attaques d'agents pathogènes et peut faire l'objet d'un nombre conséquent de traitements phytopharmaceutiques. La répétition pluriannuelle de traitements peut engendrer alors des résistances.

1. OBJET DU DOCUMENT

Ce document a pour objet de définir un certain nombre de règles et d'énoncer des recommandations pour la mise en place d'une surveillance de l'évolution de la sensibilité des principaux agents pathogènes de la vigne (plus particulièrement l'oidium, *Erysiphe necator* et le mildiou, *Plasmopara viticola*) à une substance active ou un groupe de substances actives de même mode d'action. Pour les autres maladies de la vigne, il est possible de s'inspirer de ce document technique avec des adaptations qu'il conviendra de préciser.

Cette surveillance concerne des substances actives à risque de résistance (molécules unisites ou de mode d'action inconnu), et permet de générer des données dans le cadre d'une recherche scientifique ou pour répondre à des besoins liés aux conditions de mise sur le marché de préparations contenant ces substances.

Ce document ne concerne pas l'établissement de la sensibilité de base requise pour une mise sur le marché et n'a pas, non plus, pour vocation de proposer et d'imposer des méthodologies

de tests en laboratoire ou de décrire la méthodologie de mise en place d'essais permettant de mesurer l'impact des souches résistantes sur la performance de la molécule.

D'autre part, la variabilité génétique au sein des populations d'agents pathogènes, les caractéristiques de la substance active étudiée et la/les méthodologie(s) de laboratoire utilisée(s) font qu'il est difficile d'établir un nombre strict d'échantillons nécessaires pour toutes les situations possibles. Cependant, les données de sensibilité doivent être suffisamment représentatives de cette variabilité et nécessitent, par conséquent, d'être obtenues à partir d'un nombre d'échantillons suffisant.

Ce document traite plus particulièrement de prélèvements à la parcelle qui semblent pour la plupart des agents pathogènes de la vigne être la méthodologie la mieux adaptée. Toutefois, il peut exister d'autres méthodes de collecte d'échantillons (ex : capture de spores par voie aérienne).

2. DEFINITIONS

Echantillon : ensemble d'individus extraits d'une population initiale de manière aléatoire de façon à ce qu'il soit représentatif de cette population.

Famille chimique : ensemble de molécules possédant un même groupe fonctionnel (= partie de molécule qui lui confère des propriétés spécifiques).

Fitness : capacité que possède une souche d'un agent pathogène à se développer, se reproduire et survivre dans des conditions données. Dans la nature, en absence d'application, donc de pression de sélection d'un fongicide, les premières souches identifiées au laboratoire comme résistantes à ce fongicide sont le plus souvent moins bien adaptées à leur environnement que la population de souches initiales. On dit alors que leur fitness est faible ou que ces souches sont peu compétitives.

Génotype : ensemble des gènes portés par les chromosomes responsables de la détermination d'un caractère phénotypique. Ex : la mutation au niveau du gène codant la cible des QoI/strobilurines (mutation G143A) chez l'oïdium de la vigne (= génotype) est l'origine de la résistance (= phénotype). Dans ce cas très précis le lien entre le génotype et le phénotype est direct.

Individu : unité de base d'une population.

Isolat : individu ou ensemble d'individus extrait d'une population.

Mode d'action : mécanisme qui permet d'expliquer l'effet d'un produit phytopharmaceutique ou d'un produit biocide sur un agent pathogène en altérant de façon sélective une étape d'un mécanisme essentiel à sa survie. Ex : le mode d'action SDHI (= inhibiteurs de la succinate déshydrogénase) regroupe plusieurs molécules ayant le même site d'action, la succinate déshydrogénase, mais pouvant appartenir à des familles chimiques distinctes. A noter que plusieurs familles chimiques peuvent partager un même mode d'action.

Monitoring : plan de surveillance.

Phénotype : ensemble des caractéristiques d'un individu résultant de l'expression de ses gènes et de leurs interactions potentielles avec l'environnement. Ex : la résistance aux QoI/strobilurines (= phénotype) chez l'oïdium de la vigne est le résultat de la mutation sélectionnée au niveau du gène codant la cible (mutation G143A) chez cet agent pathogène (= génotype). Dans ce cas très précis le lien entre le phénotype et le génotype est direct.

Population : ensemble d'individus appartenant à une même espèce et occupant une même surface géographique définie.

Souche : descendant d'un individu caractérisé génotypiquement.

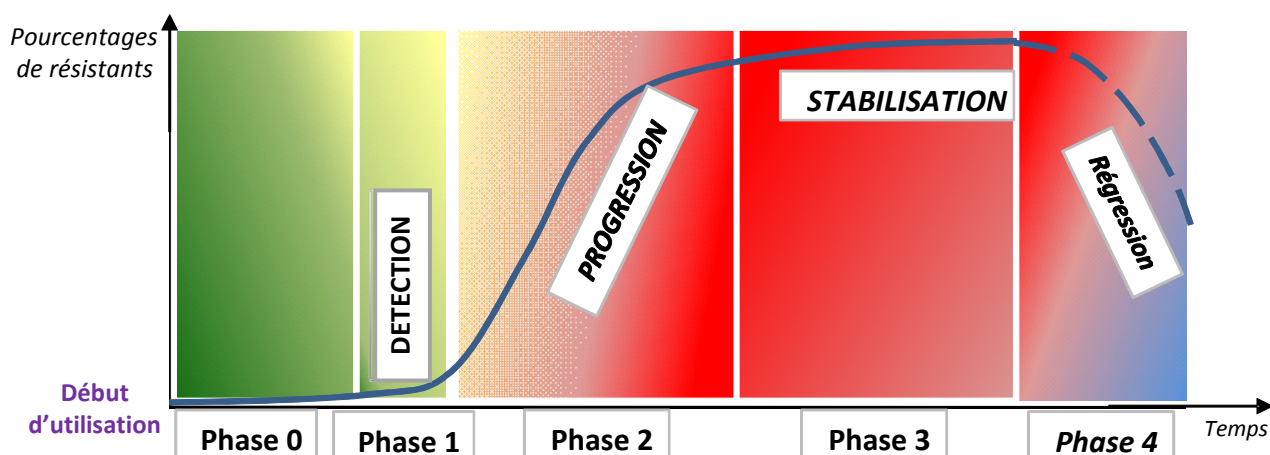
Substance active : molécule qui constitue le principe actif d'un produit phytopharmaceutique.
Unisite : adjectif qualifiant un mode d'action dont le site d'action chez l'agent pathogène est unique.

3. PHASES D'EVOLUTION D'UN PHENOMENE DE RESISTANCE

3.1. Les différentes phases

La surveillance de la sensibilité d'un agent pathogène à une substance active dépend d'une évaluation de risque ciblée sur les caractéristiques de cette substance, la biologie de cet agent et les conditions agronomiques de la culture. Une telle surveillance permet d'établir un état des lieux pour les substances à risque, même en absence de toute baisse d'efficacité constatée au vignoble.

Le processus d'évolution d'un phénomène de résistance à un fongicide (courbe en bleu) peut être schématisé comme représenté ci-dessous.



D'un point de vue théorique, 5 phases surviennent dans l'évolution des phénomènes de résistance :

- Phase 0 : Aucune détection
- Phase 1 : Détection
- Phase 2 : Progression
- Phase 3 : Stabilisation
- Phase 4 : Régression

La démarche expérimentale, le type de test, le nombre de prélèvements et les essais complémentaires doivent être adaptés à la problématique :

- Détecter des souches résistantes en début d'émergence (événements identifiés par des analyses de laboratoire à partir de prélèvements réalisés au vignoble) (**Phases 0 et 1**)
- Evaluer l'évolution (progression, stabilisation ou régression) des phénotypes résistants dans les populations (**Phases 2 à 4**);
- Déceler des manques d'efficacité au terrain (niveau de résistance potentielle en pratique) (**Phases 2 et 4**).

3.2. Phase 0 : Veille

3.2.1. Contexte

Cette phase correspond à la période pendant laquelle aucune population analysée en laboratoire ne s'avère être constituée par des souches présentant une moindre sensibilité par rapport à celle établie lors des études effectuées avant la mise sur le marché de la substance active concernée et définissant la sensibilité de base de l'agent pathogène.

Cette comparaison est effectuée au laboratoire, avec des méthodes d'analyses déterminées lors de l'évaluation de la sensibilité de base et adaptées au couple substance active / agent pathogène. Ceci sous-entend qu'ait été caractérisé pour définir la sensibilité de base un nombre représentatif de populations non soumises à une pression de sélection avec la molécule étudiée (ou d'autres molécules avec le même mode d'action). Ce nombre de populations sensibles étudiées devra être d'autant plus élevé que les données obtenues présentent une plus grande variabilité.

Ces tests en laboratoire permettent de vérifier que toutes les souches et phénotypes présents dans les populations ont une sensibilité identique à celle déterminée dans les travaux réalisés avant la mise sur le marché de la substance active.

3.2.2. Modalités pratiques

Périodicité : **annuelle**.

Objectif du monitoring : vérifier la sensibilité des phénotypes et l'absence de modification par rapport à la sensibilité de base.

- Choix des parcelles.
 - o Cibler au minimum 2 régions viticoles particulièrement concernées par la maladie et par la pression de sélection liée à l'emploi du mode d'action.
 - o Choisir de préférence des parcelles traitées avec la molécule.
- Nombre de prélèvements.
 - o 20 échantillons par région viticole (1 échantillon = 1 population).
 - o Total de 40 populations minimum / an.
- Calendriers de traitements des parcelles où sont réalisés les prélèvements : les programmes de traitements fongicides de l'année n (année de prélèvement) devront être communiqués, ainsi que si possible ceux des années n-1 et n-2.

3.3. Phase 1 : Emergence

3.3.1. Contexte

Cette phase correspond aux premières détections, dans des populations naturelles prélevées au vignoble, de souches présentant une moindre sensibilité par rapport aux caractéristiques des souches évaluées dans la sensibilité de base à la molécule.

Comme pour la phase précédente (Phase 0), cette comparaison est effectuée au laboratoire, avec la (ou les) méthode(s) d'analyse(s) déterminée(s) lors de l'évaluation de la sensibilité de base et adaptée(s) au couple substance active / agent pathogène.

A cette étape, les tests en laboratoire décèlent la présence de souches de sensibilité moindre.

Ces souches doivent être isolées pour déterminer leur niveau de résistance par rapport aux souches sensibles.

Des études complémentaires sont fortement recommandées pour vérifier la stabilité du caractère de résistance de ces souches à la molécule.

En complément et le plus rapidement possible, des essais d'efficacité en conditions contrôlées (*in-vivo* et *in-planta*) sont réalisés pour évaluer l'impact de ces souches sur la performance de la substance active.

Deux types d'essai sont recommandés :

- des essais d'efficacité de la molécule après infection avec la ou les souches moins sensibles utilisées pures pour vérifier la pertinence du test et le réel impact de ces nouveaux phénotypes sur la performance ;
- des essais d'efficacité de la molécule après infection avec des mélanges de souches sensibles et résistantes dans des proportions variables pour évaluer la relation entre présence des souches résistantes et efficacité de la molécule puis affiner la présentation des résultats des monitorings quantitatifs.

3.3.2. Modalités pratiques

Périodicité : **annuelle**.

Objectif du monitoring : détecter les premières souches résistantes.

- Choix des parcelles.
 - o Cibler au minimum 2 régions viticoles particulièrement concernées par la maladie et par la pression de sélection liée à l'emploi du mode d'action.
 - o Choisir de préférence des parcelles traitées avec la molécule.
- Nombre de prélèvements.
 - o 20 échantillons par région viticole (1 échantillon = 1 population).
 - o Total de 40 populations minimum / an.
- Calendriers de traitements des parcelles où sont réalisés les prélèvements : les programmes de traitements fongicides de l'année n (année de prélèvement) devront être communiqués, ainsi que si possible ceux des années n-1 et n-2.

Essais d'efficacité : mesurer l'impact des souches résistantes sur la performance de la molécule.

A réaliser en conditions semi-contrôlées (plants en serre et inoculations artificielles) pour confirmer la pertinence de la détection des souches moins sensibles.

3.4. Phase 2 : Progression

3.4.1. Contexte

Cette phase débute dès la confirmation du caractère de résistance des phénotypes nouveaux identifiés et de leur impact sur l'efficacité de la molécule.

C'est la phase d'observation de l'évolution des souches résistantes à deux niveaux :

- nombre de parcelles concernées par la présence de souches résistantes;
- fréquence de souche(s) résistante(s) dans chaque population.

Le premier point permet de suivre l'apparition puis la progression du phénomène de résistance dans un pays et son importance dans les différentes régions viticoles.

Le deuxième point s'attache à quantifier la présence des souches résistantes dans les populations, de répartir les populations dans différentes classes en fonction du pourcentage de souches résistantes et contrôler la progression des pourcentages moyens de souches résistantes dans un pays, une région ou une zone viticole déterminée.

Cette phase peut durer plusieurs années et sa durée dépend de nombreux facteurs (caractéristiques biologiques des souches résistantes, évolution des pratiques visant à limiter la pression de sélection,...).

Au cours de cette phase, il est possible de compléter les essais en conditions semi-contrôlées décrits en phase 1.

En présence d'une augmentation manifeste des fréquences de souches résistantes détectées au laboratoire, la mise en place d'essais « d'efficacité pratique » au champ s'avère judicieuse afin d'apprécier l'impact des souches résistantes sur la performance du mode d'action considéré.

3.4.2. Modalités pratiques

Périodicité : **annuelle**.

Objectif du monitoring: évaluation de la progression spatio-temporelle des souches résistantes.

- Choix des parcelles.
 - o Toutes les régions viticoles sont concernées au prorata des surfaces de chaque région, de la pression parasitaire et du nombre de traitements avec des substances ayant le même mode d'action.
 - o Un minimum de 10 populations est prélevé dans chaque région.
 - o Choisir les parcelles de manière aléatoire.
- Nombre de prélèvements.
 - o 100 échantillons recommandés (1 échantillon = 1 population).
- Calendriers de traitements des parcelles où sont réalisés les prélèvements : les programmes des traitements fongicides de l'année n (année de prélèvement) devront être communiqués et n-1 et n-2 éventuellement.
- Présentation des résultats : nombre de parcelles concernées par la présence de souches résistantes et fréquence de souches résistantes dans chaque population.

Essais d'efficacité : mesurer l'impact des souches résistantes sur la performance de la molécule.

- Conditions semi-contrôlées (serre) : relation entre pourcentages de souches résistantes dans les populations et efficacité de la molécule dans différents positionnements ;
- Au vignoble : efficacité pratique sur feuilles et grappes.

3.5. Phase 3 : Stabilisation

3.5.1 Contexte

Cette phase intervient lorsque les souches résistantes se généralisent à l'ensemble des populations.

Les stratégies anti-résistance n'ont pas permis de limiter la progression des pourcentages moyens de souches résistantes vers des niveaux très élevés. Dans ce cas, une grande majorité de populations renferme des pourcentages élevés de phénotypes résistants.

En parallèle, des cas de pertes partielles ou totales d'efficacité des traitements au vignoble ont été rapportés dans plusieurs situations.

L'objet principal de cette phase est de confirmer le maintien de l'état de résistance des populations ou de déceler un éventuel retour à une situation de plus grande sensibilité suite à la modification des pratiques (réduction ou arrêt des traitements avec la molécule).

Cette étape n'impose pas une réalisation d'un suivi annuel mais peut se concentrer sur l'étude d'un nombre minimum de 30 populations tous les deux ans.

3.5.2. Modalités pratiques

Périodicité : **bisannuelle**.

Objectif du monitoring : vérifier les fréquences moyennes de souches résistantes dans les populations.

- Choix des parcelles.
 - o Toutes les régions viticoles sont concernées au prorata des surfaces de chaque région, de la pression parasitaire et du nombre de traitements avec la molécule.
 - o Un minimum de 5 populations est prélevé dans chaque région.
 - o Choisir les parcelles de manière aléatoire.
- Nombre de prélèvements.
 - o 30 échantillons au minimum (1 échantillon = 1 population).
- Calendriers de traitements des parcelles où sont réalisés les prélèvements : les programmes de traitements fongicides de l'année n (année de prélèvement) devront être communiqués ainsi que n-1 et n-2 éventuellement.
- Présentation des résultats : nombre de parcelles concernées par la présence de souches résistantes et pourcentage de souches résistantes dans chaque population.

3.6. Phase 4 : Régression

3.6.1. Contexte

Dans certaines situations, les travaux de recherche réalisés dans la phase 3 montrent une diminution significative et constante des pourcentages de phénotypes résistants dans les populations naturelles de l'agent pathogène. Ce type d'évolution est schématisé par la courbe en pointillé sur la figure en page 3. Les stratégies de traitement adoptées (réduction ou arrêt d'utilisation du mode d'action) et les caractères des phénotypes résistants (altération de la fitness par exemple) conduisent à cette situation d'une régression de la présence des phénotypes résistants dans les populations.

Au cours de cette phase, il est pertinent de se donner les moyens d'évaluer dans quelles conditions les substances actives dont l'usage a été restreint pourraient être réintroduites si la résistance évaluée par ce monitoring tend à décroître. Du point de vue de la surveillance, un reclassement de la substance active en phase 2 d'évolution de la résistance, pourrait être alors envisagé.

3.6.2. Modalités pratiques

Périodicité : **annuelle**.

Objectif du monitoring : vérifier les fréquences moyennes de souches résistantes dans les populations.

- Choix des parcelles.
 - o Toutes les régions viticoles sont concernées au prorata des surfaces de chaque région, de la pression parasitaire et du nombre de traitement avec la molécule.
 - o Un minimum de 5 populations est prélevé dans chaque région.
 - o Choisir les parcelles de manière aléatoire.
- Nombre de prélèvements.
 - o 30 échantillons au minimum (1 échantillon = 1 population).
- Calendriers de traitements des parcelles où sont réalisés les prélèvements : les programmes de traitements fongicides de l'année n (année de prélèvement) devront être communiqués ainsi que n-1 et n-2 éventuellement.
- Présentation des résultats : nombre de parcelles concernées par la présence de souches résistantes et pourcentage de souches résistantes dans chaque population.