



Rapport technique de l'étude 2011 sur LES NIVEAUX de SENSIBILITE au CUIVRE de la BACTERIOSE du NOYER (*Xanthomonas arboricola pv juglandis*)

Résumé

La bactériose du noyer (*Xanthomonas arboricola pv juglandis*) est une maladie grave qui sévit dans la noyeraie française et dont la lutte est réalisée grâce à des applications à base de cuivre, seule substance autorisée pour cet usage. Or depuis quelques années, ces traitements paraissent ne pas avoir une aussi bonne efficacité.

Une étude a été menée sur un essai mis en place par la SENURA avec, pour objectif, de comparer l'impact de traitements cupriques (pleine dose et dose réduite) sur le taux de contamination des bourgeons par la bactérie et le niveau de sensibilité au cuivre des bactéries isolées. En parallèle, plusieurs vergers de la zone de production de la Noix de Grenoble et un verger de la Noix du Périgord ont été suivis sur ces deux mêmes critères (taux de contamination des bourgeons et sensibilité au cuivre des bactéries isolées).

Le probable manque de puissance de l'essai n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives ni entre les taux de contamination des bourgeons, ni dans les profils de sensibilité de la bactérie, quelle que soit la dose appliquée. Quant aux données obtenues sur les vergers, elles montrent qu'en septembre, les taux de contamination des bourgeons peuvent atteindre des valeurs élevées dans les vergers de la zone de la noix de Grenoble, notamment dans les vergers traités. Dans ces derniers, la proportion de colonies *X. arboricola pv juglandis* résistantes au cuivre est significativement plus élevée que dans le verger non traité de la même zone ou dans le verger peu traité de la zone Noix du Périgord.

En 2012, l'étude est poursuivie sur l'essai mis en place par la SENURA, avec un protocole adapté pour tenter d'améliorer la puissance de l'essai.

Mots-clés : Bactériose du noyer, *Xanthomonas arboricola pv juglandis*, cuivre, résistance



I. PRÉSENTATION – CONTEXTE

La bactériose du noyer (*Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*) est une maladie grave qui sévit dans la noyeraie française. La lutte contre ce pathogène est réalisée uniquement grâce à l'utilisation de traitements à base de cuivre, seule substance autorisée sur cet usage.

Depuis quelques années, l'efficacité de ces traitements semble moins bonne dans certaines parcelles, ce qui a conduit les professionnels à s'interroger sur une éventuelle évolution de la prévalence de la résistance au cuivre chez cette bactérie (GARDAN *et al.*, 1993). Cette éventualité pose d'autant plus problème que l'usage du cuivre étant en cours de révision dans le cadre de la réglementation européenne, il pourrait n'être autorisé, dans l'avenir, qu'à des doses beaucoup plus faibles que celles actuellement homologuées.

Aussi, en 2009, une étude préliminaire a été engagée par l'unité RPP de l'Anses-Lyon, à la demande de la Station d'Expérimentation Nucicole Rhône-Alpes (SENuRA), pour caractériser les souches de cette bactérie dans le verger de la zone de culture de la Noix de Grenoble et rechercher leur niveau de sensibilité/résistance au cuivre. Pour mettre en place ces analyses, l'INRA d'Angers a été sollicitée afin de réaliser les déterminations des colonies bactériennes isolées et s'assurer que les tests de sensibilité étaient bien effectués sur *X. a. pv juglandis*.

Cette étude s'est prolongée en 2010 avant de prendre sa véritable dimension en 2011. Les différentes structures participantes (SENuRA/Ctifl, INRA, Anses), rejointes par la Station Expérimentale de Creysse (zone de culture de la Noix du Périgord) et le Ctifl ont élaboré un protocole de suivi structuré, en se basant sur les résultats des études préliminaires des deux années précédentes.

II. MATERIEL ET METHODE

Echantillonnage

Les prélèvements (effectués par les stations régionales de la SENURA et de Creysse) sont constitués de bourgeons prélevés soit en mars-avril (bourgeons dormants) avant le début des applications de cuivre, soit entre juillet et septembre (bourgeons néoformés). Vingt cinq à 125 bourgeons ont ainsi été échantillonnés par verger sur une seule ou plusieurs dates de prélèvement.

Isolement et détermination de X. a. pv juglandis (réalisés par l'INRA d'Angers)

Chaque bourgeon prélevé est conditionné individuellement et l'isolement des bactéries présentes est effectué bourgeon par bourgeon. Cinq colonies par bourgeon sont ensuite prélevées et leur détermination est effectuée par PCR. La technique de PCR permet de distinguer les bactéries recherchées (*X. a. pv juglandis*) des autres bactéries du type *X. arboricola*.

Pour chaque bourgeon dans lequel *X. a. pv juglandis* a pu être déterminée, une colonie est sélectionnée et repiquée sur milieu LPGA pour la réalisation du test de sensibilité au cuivre.

Test de sensibilité au cuivre (réalisé par l'unité RPP de l'Anses-Lyon)

A la réception des cultures de *X. a. pv juglandis*, la sensibilité est évaluée par la méthode d'inoculation sur boîte de Petri avec différentes concentrations de sulfate de cuivre. La gamme de doses utilisée pour ces tests est la suivante :

0 – 8 – 16 – 32 – 64 et 128 mg Cu⁺⁺/L de milieu.

La lecture consiste à noter l'existence (ou non) d'un développement de la bactérie testée, aux différentes doses. Cette lecture permet de définir, pour chaque colonie bactérienne, la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI), qui correspond à la dose pour laquelle il n'y a plus de croissance bactérienne sur le milieu gélosé (absence de colonie).

Ce critère permet de discriminer les souches sensibles des souches résistantes grâce au seuil défini comme suit (M. MENARD, non daté) :

Souches sensibles : CMI ≤ 16 mg/L Cu⁺⁺ (croissance à 8 mg/L au maximum)

Souches résistantes : CMI ≥ 32 mg/L Cu⁺⁺ (croissance à 16 mg/L au minimum).



Analyses statistiques

Des analyses statistiques sont réalisées pour déterminer les facteurs influençant d'une part, le taux de contamination des bourgeons prélevés (taux défini comme le nombre de bourgeons présentant au moins une colonie de *X. a. pv juglandis* sur le nombre de bourgeons prélevés) et, d'autre part, le taux de colonies *X. a. pv juglandis* analysées comme résistantes au cuivre.

III. VERGERS ETUDIÉS

Verger non traité

En 2011, un seul verger non traité au cuivre a été suivi : il s'agit de la parcelle BB.09S (St Hilaire du Rosier - 38), déjà analysée en 2009 et 2010. Situé dans la zone de culture de la Noix de Grenoble, ce verger a été considéré comme un verger de référence sensible, du fait des résultats obtenus antérieurement.

Vergers traités

Cinq vergers, habituellement soumis à des traitements cuivre, ont été étudiés en 2011, dont 4 situés dans la zone de culture de la Noix de Grenoble :

PG.11 à St Romans (38) ; RB.11 à St Hilaire du Rosier (38)
TL.11 à St Romans (38) ; GC.11 à St Romans (38)

et un dans la zone de la Noix du Périgord :

SCr.11 à Creysse (46) - cette parcelle a été considérée comme traitée bien que les arbres sur lesquels les prélèvements de bourgeons ont été effectués pour cette étude, n'aient pas été soumis directement à des pulvérisations de cuivre en 2011. Cependant, ils ont subi, entre 2008 et 2010, des applications de cuivre à raison de 5 applications à des doses variables de cuivre (parcelle d'essai). De plus, situés à proximité d'arbres traités en 2011, ils ont pu recevoir des embruns lors des applications sur les arbres proches (4 traitements Cuivre entre le 13/04 et le 11/05 à des doses variables (2,5 kg à 0,975 kg Cu métal)).

Essai SENURA 2011 (St Romans)

Des prélèvements ont été réalisés sur l'essai mis en place par la Station de la SENURA. Cet essai comportait les trois modalités de traitement suivantes :

- Modalité M1 : témoin non traité (TNT)
- Modalité M2 : traitement cuivre à la dose de 12,5 kg/ha
- Modalité M3 : traitement cuivre à la dose de 3,75 kg/ha

Les traitements cuivre sont intervenus entre mi-avril et mi-juin 2011 (aux dates suivantes : 14/04 ; 20/04 ; 27/04 ; 5/05 ; 11/05). Les prélèvements ont été effectués à différentes périodes au cours de l'année 2011, avant et après ces traitements.

IV. INTERPRETATION

➤ **Taux de contamination des bourgeons par la bactérie** (Tableaux I et III)

L'ensemble des données obtenues au cours de l'année 2011 apporte un éclairage sur certains paramètres que les études préliminaires de 2009 et 2010 avaient laissé entrevoir, notamment en ce qui concerne le taux de bourgeons contaminés par *X. a. pv juglandis*, en fonction de la période de prélèvement.

L'étude 2011 confirme que la bactérie est bien plus présente, dès juillet, dans les bourgeons néoformés qu'en avril dans les bourgeons dormants (données en cohérence avec celles obtenues par l'IRTA sur le cycle et la dynamique de population de la bactérie).

Quant aux prélèvements de septembre, selon que l'on considère l'essai ou les deux vergers commerciaux non (ou peu) traités, les taux de contamination de l'automne sont, respectivement, soit significativement plus bas que ceux de mi-juillet, soit équivalents.

Ces différentes constatations amènent à se poser deux questions :

- quels sont les facteurs qui sont susceptibles de faire progresser rapidement les populations bactériennes au cours du printemps pour arriver aux taux de bourgeons néoformés



contaminés de juillet (avec, ensuite, une persistance plus ou moins soutenue, selon les vergers, jusqu'en septembre) ?

- *quid* de la survie hivernale de *X. a. pv juglandis* puisque, très présente dans les bourgeons néoformés en été et automne, la bactérie est détectée, dans ces mêmes bourgeons, à des taux bien inférieurs au printemps suivant ?

Par ailleurs, la comparaison des taux de contamination, en septembre, entre vergers traités de la zone de la Noix de Grenoble et vergers non (ou peu) traités de l'une ou l'autre des deux zones de production, montre une différence significative du taux de contamination entre ces deux types de vergers, les taux de contamination significativement les plus élevés étant observés dans les vergers les plus traités. Ce constat peut s'expliquer, en partie, par une plus forte pression de la maladie dans la zone de la Noix de Grenoble. En effet, les vergers les plus traités appartiennent à cette zone; néanmoins, l'un des vergers non traité (et moins contaminé), appartient aussi à cette même zone. Le facteur "pression de la maladie" ne peut donc pas être le seul élément explicatif.

➤ **Tests de sensibilité**

Verger non traité (BB.09S) (Tableau II)

La population de *X. a. pv juglandis* isolée dans les prélèvements 2011 de ce verger s'avère en partie résistante (taux moyen de *X. a. pv juglandis* résistantes : de l'ordre de 23%, sans différence significative entre les taux relevés sur les prélèvements de juillet et ceux de septembre).

Or, dans les études préliminaires de 2009 et 2010, ce verger BB.09S avait été considéré comme un verger de référence en raison de la détection (en 2009 uniquement et sur bourgeons dormants) de plusieurs colonies *X. a. pv juglandis* mais sans qu'aucune de ces colonies ne montre une quelconque dérive de sensibilité (CMI toujours inférieure à 16 mg/L).

Une hypothèse peut être avancée pour expliquer ce constat : les prélèvements de 2009 et 2010 ayant été réalisés sur bourgeons dormants, ils n'ont pas permis de caractériser réellement la population de *X. a. pv juglandis* en présence et auraient donné une image tronquée, du fait du peu de colonies *X. a. pv juglandis* isolées et testées.

Vergers traités (Tableau II)

Bien que le nombre de colonies *X. a. pv juglandis* soumises au test s'avère assez différent selon les vergers, les données obtenues montrent que :

- dans les deux vergers traités de la zone Noix de Grenoble (PG.11 et RB.11), les taux de *X. a. pv juglandis* résistantes au cuivre sont très élevés (supérieurs à 60%), sur des prélèvements effectués début septembre,
- dans le verger de la zone Noix du Périgord (Scr.11), un petit nombre de *X. a. pv juglandis* résistantes est relevé, et seulement sur les prélèvements de septembre. Ce verger, considéré comme peu traité, présente en septembre (comme la parcelle BB.09S non traitée) des taux de colonies résistantes significativement inférieurs par comparaison avec les deux parcelles traitées de la zone de la Noix de Grenoble (PG.11 et RB.11). Ce constat est probablement à relier à la pression de sélection exercée sur les vergers traités.

Essai SENURA 2011 (Tableau IV)

Il est extrêmement difficile d'essayer de conclure sur l'effet de la pression de sélection des traitements cuivre (à dose normale et à dose réduite) sur la sensibilité de la population de *X. a. pv juglandis* de cet essai. En effet, les résultats de l'analyse statistique réalisée sur les taux de résistance enregistrés entre les trois modalités ne présentent aucune différence significative (mais peut-être en raison du manque de puissance de l'essai).



V. CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Au travers des résultats 2011, il apparaît que les taux de contamination des bourgeons par la bactérie *X. a. pv juglandis* peuvent, selon la période de l'année, atteindre des taux importants, notamment dans les vergers recevant régulièrement des traitements cuivre, dans la zone de production de la Noix de Grenoble. Les taux de contamination des bourgeons dans ces vergers sont significativement plus élevés, en septembre, que ceux des vergers peu ou pas traités.

En parallèle, les tests de sensibilité des *X. a. pv juglandis* ont permis de montrer l'existence de colonies résistantes au cuivre dans tous les vergers analysés (y compris le verger non traité considéré jusqu'alors comme le verger de référence sensible). Pour ce critère, une différence significative a pu être mise en évidence entre vergers traités et vergers peu ou non traités.

Par contre, sur l'essai SENURA, le probable manque de puissance de l'essai n'a pas permis de mettre en évidence (dans des conditions homogènes de population bactérienne, au départ de végétation) de telles différences significatives entre modalités traitées et témoin en fin de saison (septembre).

Il serait intéressant de rapprocher ces résultats de notations de terrain sur l'importance des dégâts observés. Ce lien pourra être fait sur l'essai de la SENURA, mais probablement pas sur les autres vergers étudiés. La notation des dégâts permettrait en effet d'affiner l'interprétation des données obtenues au laboratoire et, notamment en zone à forte pression de la maladie comme la zone de la Noix de Grenoble, de comparer l'efficacité des traitements cuivre avec les taux de bactéries résistantes observées.

Pour la reconduction ultérieure de cette étude sur l'essai SENURA (ainsi que sur un ou deux vergers commerciaux), il s'avère indispensable d'envisager une modification du protocole afin de pouvoir obtenir des données mieux interprétables. Il s'agira de maximiser le nombre de colonies soumises au test de sensibilité, et donc, d'augmenter le nombre de bourgeons prélevés pour isolement (et détermination) des dites colonies.

Mais, l'accroissement du nombre de bourgeons prélevés par modalité ne peut être considérable compte tenu de l'importance des analyses nécessaire à cette étude. Il est néanmoins possible d'envisager d'augmenter le nombre de bourgeons prélevés par parcelle (ce nombre pourrait, par exemple, être de l'ordre de 125 bourgeons) de façon à apporter une petite amélioration à la puissance statistique de ce protocole, tout en prenant en compte les capacités des deux laboratoires concernés par le déroulement des analyses ainsi que les moyens qui pourront être mis en œuvre au terrain pour la réalisation des prélèvements.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Ménard M. (document non daté) : La bactériose du noyer et la sensibilité au cuivre de *Xanthomonas arboricola pv. juglandis*. Note INRA.

Gardan L., Brault T., Germain E., 1993. Copper resistance of *Xanthomonas arboricola pv.juglandis* in French Walnut orchards and its association conjugative plasmids. Acta Horticulturae 311.

VII. PARTENARIAT

Cette étude a été réalisée grâce au partenariat étroit établi entre les différentes structures participantes :

- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Centre d'Angers-Nantes – UMR 1345
- Station Expérimentale Nucicole Rhône-Alpes (SENURA)
- Station Expérimentale de Creysse
- Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Ctifl)
- Anses-Lyon – unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP)

et à la contribution financière de :

- Association d'Organisation de Producteurs Nationale Dynamic Noix (AOPN Dynamic Noix)
- France Agri Mer (FAM) pour les suivis des essais de terrain (SENURA)



SYNTHESE RESULTATS VERGERS DE PRODUCTION 2011

Tableau I : TAUX DE CONTAMINATION DES BOURGEONS - VERGERS

N° vergers 2011	date prélèvement	Nb bourgeons prélevés / (nb arbres)	Nb bourgeons ayant, au moins, 1 colonie <i>X. a. pv juglandis</i> isolée	Taux de bourgeons contaminés
-----------------	------------------	-------------------------------------	--	------------------------------

Vergers non traité cuivre

BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	07/04/11	50 / (10)	1	2%
	15-22/07/11	50 / (≈ 8)	21	42%
	27/09/11	25 / (≈ 8)	14	56%

Vergers traités cuivre

PG.11 St Romans (38)	09/09/11	50 / (10)	34	68%
RB.11 St Hilaire du R. (38)	09/09/11	50 / (10)	31	62%
TL.11 St Romans (38)	07/04/11	50 / (10)	1	2%
GC.11 St Romans (38)	07/04/11	50 / (10)	3	6%
SCr.11 Station de Creysse (46)	07/04/11	50 / (10)	1	2%
	15/07/11	25 / (10)	6	24%
	27/09/11	25 / (5)	7	28%

Tableau II : Résultats des TESTS DE SENSIBILITE PAR VERGER

N° vergers 2011	Date prélèvement	Nb bourgeons ayant, au moins, 1 colonie <i>X. a. pv juglandis</i>	Nb colonies <i>X. a. pv juglandis</i> testées / sensibilité Cu	Nb colonies à CMI ≤ 16 mg/L	Nb colonies à CMI = 32 mg/L	Nb colonies à CMI = 64 mg/L	% colonies <i>X. a. pv juglandis</i> R au cuivre
-----------------	------------------	---	--	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	--

Vergers non traité cuivre

BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	07/04/11	1	0	-	-	-	-
	15-22/07/11	21	17	12	5	0	29%
	27/09/11	14	9	8	1	0	11%

Vergers traités cuivre

PG.11 St Romans (38)	09/09/11	34	33	13	17	3	61%
RB.11 St Hilaire du R.	09/09/11	31	31	12	19	0	61%
TL.11 St Romans (38)	07/04/11	1	0	-	-	0	-
GC.11 St Romans (38)	07/04/11	3	2	1	1	0	(50%)
SCr.11 Station de Creysse (46)	07/04/11	1	1	1	0	0	0%
	15/07/11	6	5	5	0	0	0%
	27/09/11	7	7	4	3	0	43%



SYNTHESE RESULTATS ESSAI SENURA 2011

Tableau III : TAUX DE CONTAMINATION DES BOURGEONS - ESSAI SENURA

Modalités de l'essai	date prélèvement	Nb bourgeons prélevés / (nb arbres)	Nb bourgeons ayant, au moins, 1 colonie <i>X. a. pv juglandis</i> isolée	Taux de bourgeons contaminés
M1 TNT	07/04/11	50/(5)	1	2%
	15-22/07/11	49/(5)	26	53%
	22/09/11	25/(5)	4	16%
M2 Cu 12,5 kg/ha	07/04/11	50/(5)	3	6%
	15-22/07/11	50/(5)	26	52%
	22/09/11	25/(5)	10	40%
M3 Cu 3,75 kg/ha	07/04/11	50/(5)	1	2%
	15/07/11	50/(5)	24	48%
	22/09/11	25/(5)	2	8%

Tableau IV : Résultats des TESTS DE SENSIBILITE - ESSAI SENURA

Modalités de l'essai	date prélèvement	Nb bourgeons ayant, au moins, 1 colonie <i>X. a. pv juglandis</i>	Nb colonies <i>X. a. pv juglandis</i> testées / sensibilité Cu	Nb colonies à CMI ≤ 16 mg/L	Nb colonies à CMI = 32 mg/L	Nb colonies à CMI = 64 mg/L	% colonies <i>X. a. pv juglandis</i> R au cuivre
M1 TNT	07/04/11	1	1	1	0	0	(0%)
	15-22/07/11	26	17	9	8	0	47%
	22/09/11	4	4	1	3	0	75%
M2 Cu 12,5 kg/ha	07/04/11	3	3	2	1	0	(33%)
	15-22/07/11	26	15	3	12	0	80%
	22/09/11	10	10	7	3	0	30%
M3 Cu 3,75 kg/ha	07/04/11	1	0	-	-	-	(0%)
	15-22/07/11	24	15	9	6	0	40%
	22/09/11	2	2	1	1	0	50%