

Résistance du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) vis-à-vis des Qil et des CAA

PLAN DE SURVEILLANCE 2013

Résumé :

En 2013, le suivi de la résistance du mildiou de la vigne aux fongicides a été réalisé vis-à-vis des Qil (Quinone inside Inhibitors) au niveau national, ainsi que vis-à-vis des CAA (Carboxylic Acid Amides) sur essentiellement trois régions (Bourgogne, Champagne et Rhône-Alpes). Ce suivi est effectué grâce à la mise en place de tests biologiques. L'analyse met en évidence la présence plus ou moins importante de phénotypes résistants dans les populations étudiées.

- Pour les **CAA**, la résistance a été confirmée en 2013 dans les trois vignobles suivis avec une présence de 96% de populations considérées comme résistantes et 4% de populations en dérive de sensibilité. Dans ce contexte, une surveillance sera maintenue et développée dans les autres vignobles en 2014 afin de suivre l'évolution de cette résistance.
- Le suivi de la résistance aux **Qil** a été la priorité de cette année 2013, suite à la mise en évidence, entre 2010 et 2012, de 16 parcelles avec des populations présentant un pourcentage variable mais faible de souches considérées comme résistantes. L'objectif 2013 a donc été de poursuivre la surveillance de l'émergence de populations résistantes : 16 parcelles (dont une déjà ciblée en Bourgogne lors du suivi de 2010) contenant des souches non sensibles ont été mises en évidence au laboratoire sur 42 testées. La résistance semble être liée à un mécanisme de respiration alternative, dont l'incidence au terrain est à démontrer.

Mots clés : *Plasmopara viticola*, résistance, plan de surveillance, vigne

1- Présentation - contexte

Le plan national de surveillance des phénomènes de résistance, organisé annuellement par le Ministère en charge de l'Agriculture (Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux de la Direction Générale de l'Alimentation) a pour objet de recueillir des informations sur d'éventuelles dérives de sensibilité des champignons aux fongicides. L'analyse de ces données complétées par d'éventuelles investigations complémentaires sur les pertes d'efficacité au champ permet d'élaborer les recommandations dans la note technique commune "Maladies de la vigne" et apporte des éléments complémentaires dans le cadre de la post-autorisation des produits phytosanitaires.

Le programme et le protocole de prélèvement sont élaborés au niveau national en fonction des enjeux agronomiques. Les prélèvements sont réalisés sous coordination régionale dans le cadre du réseau de surveillance biologique du territoire.

Les tests de résistance ont été réalisés par l'unité Résistance aux produits phytosanitaires (RPP) du laboratoire de l'Anses-Lyon.

Le plan de surveillance ciblait deux familles spécifiques : les Carboxylic Acid Amides (CAA) et les Quinone inside Inhibitors (Qil).

Les CAA : le suivi a été réalisé sur 23 parcelles concentrées essentiellement sur les régions de Bourgogne, Champagne et Rhône-Alpes. Ce choix de suivre la résistance sur uniquement trois vignobles a été dicté par trois raisons principales : des résultats disponibles en nombre suffisant depuis 2005, une évolution de la résistance aux CAA similaire dans ces vignobles à celle observée au niveau national et une réduction marquée de l'emploi des fongicides à base de CAA depuis 2010.

Les Qil : dès la première année d'analyses en 2010, la présence de quelques souches résistantes a été détectée dans quelques populations, ce qui a justifié la poursuite de ce suivi les années suivantes. En 2013, 42 parcelles ont été analysées dans ce cadre.

2- Description brève de la méthode utilisée

Il s'agit d'une méthode d'analyse basée sur des tests biologiques.

Les tests biologiques ne sont jamais réalisés directement sur l'échantillon. Ils sont effectués après deux étapes :

- lavage des feuilles, découpe des taches, mise en chambre humide et nouvelle sporulation des taches sous 24 heures,
- repiquage de l'inoculum obtenu sur feuilles saines pour obtenir une nouvelle sporulation au bout de huit jours.

C'est sur cette nouvelle sporulation que sont réalisés les tests. Si la quantité de spores est insuffisante, un nouveau repiquage du champignon est réalisé sur feuilles saines.

Qil : test biologique sans Sham (inhibiteur de la respiration secondaire), sur disques foliaires - Méthode dite « volume à volume ».

Une gamme de six doses est testée afin de déceler au mieux les dérives de sensibilité.

Concentrations testées : **0 (témoin) – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 mg/L**

Les solutions fongicides sont appliquées sur les disques foliaires par dépôt de gouttes, en mélange volume à volume avec la suspension de spores : un volume de solution fongicide (à 0,02 – 0,2 – 2 – 20 et 200 mg/L) pour un volume de suspension de spores (à 250 000 spores/mL).

CAA (Iprovalicarbe) : test biologique sur disques foliaires - Méthode dite « volume à volume ».

Les données obtenues au cours des années précédentes sur cette substance active ayant permis de bien cerner les valeurs caractéristiques des souches sensibles, la gamme de doses a été réduite aux trois concentrations qui sont apparues les plus discriminantes.

Les doses utilisées en 2013 sont donc : **0 (témoin) – 3 – 10 et 100 mg/L**

Les solutions fongicides sont appliquées sur les disques foliaires par dépôt de gouttes, en mélange avec la suspension de spores à raison d'un volume de fongicide (à 6, 20 et 200 mg/L) pour un volume de suspension de spores (à 250 000 spores/mL)

Nombre de répétitions :

Pour chaque analyse et pour chaque dose, une boîte de Petri contient dix disques de feuilles saines de vigne, avec, pour chaque disque, un dépôt de trois gouttes de suspension de spores. Chacune de ces gouttes constitue une répétition, ce qui représente 30 répétitions par dose.

Notation :

Les boîtes inoculées sont placées en enceinte climatique à l'obscurité à 22°C pendant 48 à 72 heures. Les gouttes sont alors aspirées et les boîtes remises à l'étuve à 22°C avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit pendant 4 jours. Une notation visuelle, qualitative, de l'intensité de la sporulation, est faite 7 jours après l'inoculation. La notation est réalisée selon une échelle qui permet d'attribuer une note de 0 (sporulation nulle) à 4 (sporulation intense).

La moyenne des 30 notes est calculée et transformée en pourcentage d'intensité de sporulation par rapport au témoin. Le témoin doit avoir une note minimale de 2 pour valider le test.

A partir des courbes représentant le pourcentage d'intensité de sporulation par rapport au témoin, en fonction du logarithme ($\log_{10}$) des concentrations testées, la CI50 (Concentration Inhibitrice de 50% de la population) et la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice de 100% de la population) sont déterminées.

3- Prélèvements des échantillons

Les échantillons sont prélevés dans des sites sensibles au mildiou, pendant la phase épidémique de la maladie, au cours des mois de mai à septembre. Par parcelle, l'échantillon est constitué d'une trentaine de feuilles prélevées sur 30 ceps différents qui portent des taches de mildiou récentes. La répartition des échantillons prélevés et analysés est donnée dans le tableau 1, ci-dessous.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons prélevés et analysés par région en 2013

Régions	Echantillons demandés	Echantillons reçus	Echantillons exploitables et analysés	Type de tests réalisé
Aquitaine	5	6	5	5 QiI
Bourgogne	20	18 (9 parcelles)*	18	9 QiI + 9 CAA
Champagne	20	20 (10 parcelles)*	20	10 QiI + 10 CAA
Franche-Comté	5	6	5	5 QiI
Languedoc-Roussillon	0	2	2	2 QiI
Midi-Pyrénées	5	0	0	-
PACA	5	1	1	1 QiI
Pays de la Loire	5	1	1	1 QiI
Poitou-Charentes	5	5	4	4 QiI
Rhône-Alpes	10	10 (5 parcelles)*	9	5 QiI + 4 CAA
total	80	69	65	42 QoI + 23 CAA

* : 1 échantillon prélevé par type de test

4- Résultats

Parmi les 69 échantillons reçus des différentes régions concernées par ce plan de surveillance, 65 ont présenté une sporulation suffisante pour permettre la multiplication de l'inoculum et la réalisation des tests de résistance vis-à-vis des Qil et/ou des CAA.

4-1 Résultats CAA sur les prélèvements 2013

Trois types de populations de souches de mildiou sont identifiés (tableau 2) :

- les populations **sensibles** (S) : CI50 (de <0,3 à 3 mg/L) et CMI maximale de 10 mg/L,
- les populations avec une **dérive de sensibilité** (r) : CI50 de type sensible (de < 0,3 à 3 mg/L) et CMI élevée (>10 mg/L) : ces populations ont un comportement comparable aux populations sensibles mais des souches résistantes sont présentes au sein de la population,
- les populations **résistantes** (R) : CI50 (> 3 mg/L) et CMI élevées (> 10 mg/L).

Tableau 2 : Résultats de tests CAA par région - en nombre de parcelles présentant des populations résistantes (R), en dérive de sensibilité (r) et sensibles (S)

2013 (23 parcelles)	CAA - Nombre de parcelles avec :			total
	Populations résistantes	Populations présentant une dérive de sensibilité	Populations sensibles	
Région	R	r	S	
Bourgogne	8	1	0	9
Champagne-Ardenne	10	0	0	10
Rhône-Alpes	4	0	0	4
Total	22	1	0	23
Répartition en %	96%	4%	0%	

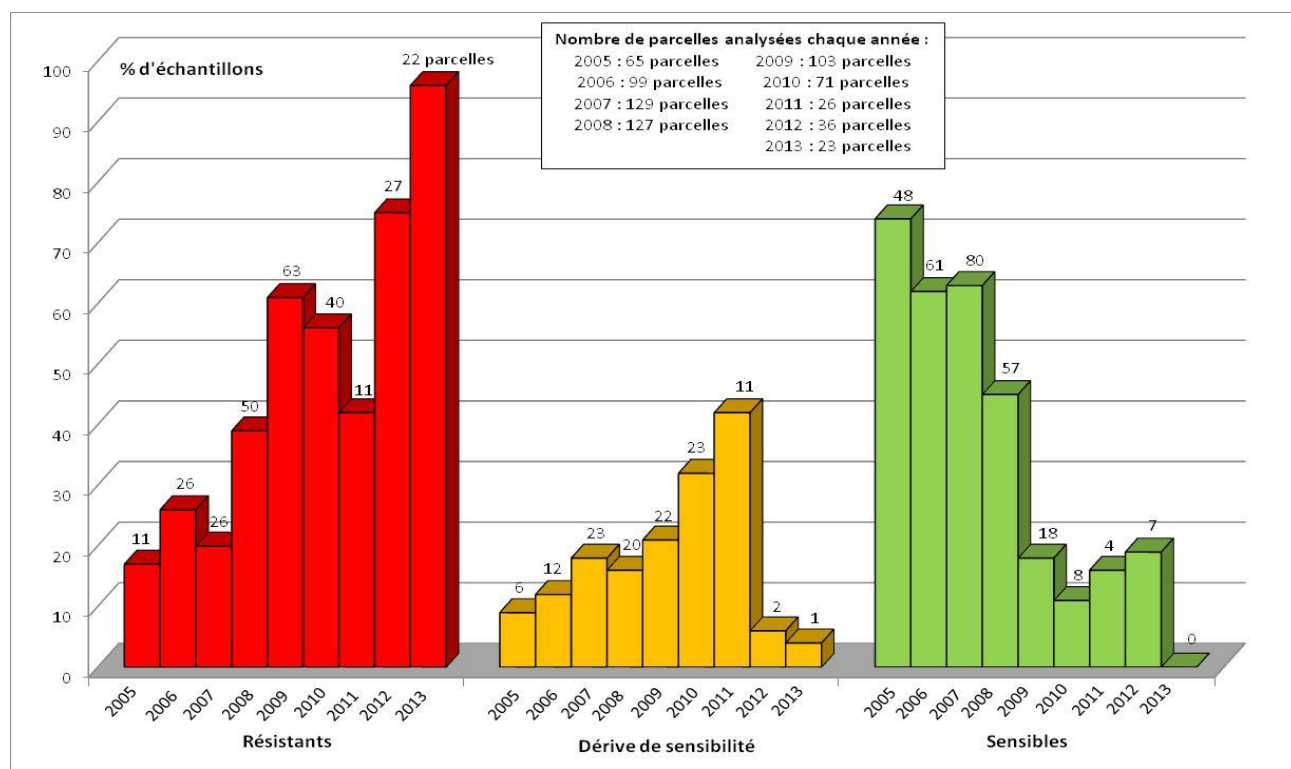
Durant la campagne 2013, la pression de la maladie a été un peu plus forte qu'au cours des trois années antérieures et la résistance s'avère fortement installée.

Ainsi sur les 23 parcelles analysées, 96% d'entre elles s'avèrent résistantes et 4% en dérive de sensibilité. Aucun des échantillons analysés n'apparaît comme indemne de souches résistantes.

4- 2 Evolution de la résistance aux CAA entre 2005 et 2013

Les plans de surveillance successifs réalisés depuis 2005 montrent (Figure 1) une progression de la fréquence des parcelles considérées comme résistantes, notamment depuis les années 2008-2009 avec, pour 2012 et 2013, des fréquences très élevées (respectivement 75% et 96%). En parallèle, le pourcentage de parcelles en "dérive de sensibilité" (détection de quelques souches résistantes) est particulièrement bas pour ces deux dernières années (respectivement 6% et 4%) tandis que, depuis 2008-2009, on assiste à une nette diminution de la proportion de sites sensibles pour parvenir, en 2013, à l'absence totale de tel site, parmi les parcelles échantillonnées.

Figure 1 : Evolution de la résistance aux CAA de 2005 à 2013 (% et nombre de parcelles)
Echantillonnage : France de 2005 à 2010 - Bourgogne + Champagne + Rhône-Alpes entre 2011 et 2013



4-3 Résultats Qil sur prélèvements 2013

Trois types de populations de souches de mildiou sont identifiés (tableau 3) :

- les populations **sensibles** : CI50 (< 0,1 mg/L) et CMI maximale de 1 mg/L,
- les populations présentant une CMI supérieure à 1 mg/L mais inférieure ou égale à 10 mg/L.
- les populations présentant une CMI supérieure à 10 mg/L et inférieure ou égale à 100 mg/L

Tableau 3 : Résultats des tests de résistance aux Qil en 2013 - classes de CMI

Régions	Nbre Populations avec CMI [10 - 100] mg/L (%) : sporulation à 10 mg/L	Nbre Populations avec CMI [1 – 10] mg/L (%) : sporulation à 1 mg/L	Nbre Populations avec CMI ≤1 mg/L	Total parcelles
Aquitaine	1 (11%)	0	4	5
Bourgogne	7 (2, 3, 20, 21, 23, 29, 55%)	0	2	9
Champagne	1 (100%)	0	9	10
Franche-Comté	3 (1, 21, 32%)	0	2	5
Languedoc-Roussillon	0	0	2	2
PACA	0	0	1	1
Pays de la Loire	1 (10%)	0	0	1
Poitou-Charentes	1 (2%)	1 (3%)	2	4
Rhône-Alpes	1 (3%)	0	4	5
Total	15 (36%)	1 (2%)	26 (62%)	42

En 2013, 42 populations (parcelles) ont été soumises aux tests de résistance vis-à-vis des Qil. La majorité des populations analysées (26 soit 62%) présente un profil de sensibilité de type Sensible ($CI_{50} < 0,1$ et $CMI \leq 1$ mg/L). Par contre, 16 populations (soit 38%) ont révélé la présence de souches non contrôlées :

- une population en Poitou-Charentes avec quelques souches non maîtrisées à 1 mg/L (CMI comprise entre 1 et 10 mg/L),
- 15 populations non maîtrisées à 10 mg/L (CMI comprises entre 10 et 100 mg/L) en Aquitaine, Bourgogne, Champagne, Franche-Comté, Pays de la Loire, Poitou-Charentes et Rhône-Alpes. Leur pourcentage de sporulation à 10 mg/L se situe en dessous de 10% dans 5 cas (de 1 à 3 %), de 10% à 29% pour 8 autres et, enfin, de 55% et 100% pour 2 populations situées respectivement en Bourgogne et en Franche-Comté.

4- 4 Evolution des données Qil, entre 2010 et 2013

La surveillance de la **résistance aux Qil** a été engagée en 2010 et réalisée chaque année jusqu'en 2013. Au cours de ces quatre années, la très grande majorité (88 %) de tous les échantillons analysés (nombre total : 266) a présenté des CMI inférieures (voire très inférieures) à 1 mg/L (Figure 2). Quelques populations ont néanmoins fait exception.

Ainsi, en 2010, à l'issue de la première année de suivi, il a été identifié dans 10 des 63 populations analysées, la présence de quelques souches résistantes caractérisées par des CMI supérieures à 1mg/L (dont 4 supérieures à 100 mg/L, avec en parallèle, pour deux d'entre elles, des CI_{50} de 5,5 et >100 mg/L – Figure 3). Ces 10 cas ont été mis en évidence dans six régions différentes.

En 2011, dans trois populations sur 65 analysées, la présence de souches non contrôlées à 1 mg/L a été décelée, ces populations étant issues de deux régions (deux en Franche-Comté et une en Champagne-Ardenne.)

En 2012, 94 populations ont été soumises aux tests de résistance vis-à-vis des Qil. Quatre cas de populations avec présence de souches non contrôlées ont été détectés dans quatre régions (Bourgogne, Champagne-Ardenne, Poitou-Charentes et Rhône-Alpes). La très grande majorité des populations analysées (90) présentait une CMI inférieure ou égale à 1 mg/L.

En ce qui concerne 2013, sur 44 échantillons analysés, 26 populations se sont avérées sensibles tandis que 16 d'entre elles présentaient des souches non contrôlées soit à 1 mg/L (pour une seule population en Poitou-Charentes), soit à 10 mg/L (pour 15 populations issues de 7 régions différentes). Pour ce qui concerne ces dernières, une majorité d'entre elles se situent en Bourgogne (avec 7 échantillons sur 9 analysés) et en Franche-Comté (avec 3 populations sur 5 analysées). Les 5 autres régions (Aquitaine, Champagne, Pays de Loire, Poitou-Charentes et Rhône-Alpes) ne sont concernées par cette situation que pour une seule population sur un total de 25 échantillons analysés. Dans la majorité des cas, les CI_{50} de ces 15 populations sont comparables à celle des populations sensibles, à l'exception de quatre d'entre elles dont les CI_{50} sont supérieures à 0,1 mg/L (Figure 3). Elles concernent trois régions : la Bourgogne (deux parcelles), la Champagne (une parcelle) et la Franche-Comté (une parcelle). Un tel résultat laisse supposer que, dans ces quatre populations, la fréquence des souches non contrôlées (dans les conditions du laboratoire) n'est pas négligeable (tout au moins pour les populations de Bourgogne et de Champagne-Ardenne qui ont des $CI_{50} > 10$ mg/L).

Figure 2 : Répartition (en %) des populations analysées vis-à-vis des Qil, entre 2010 et 2013, en fonction des CMI (exprimées en classes)

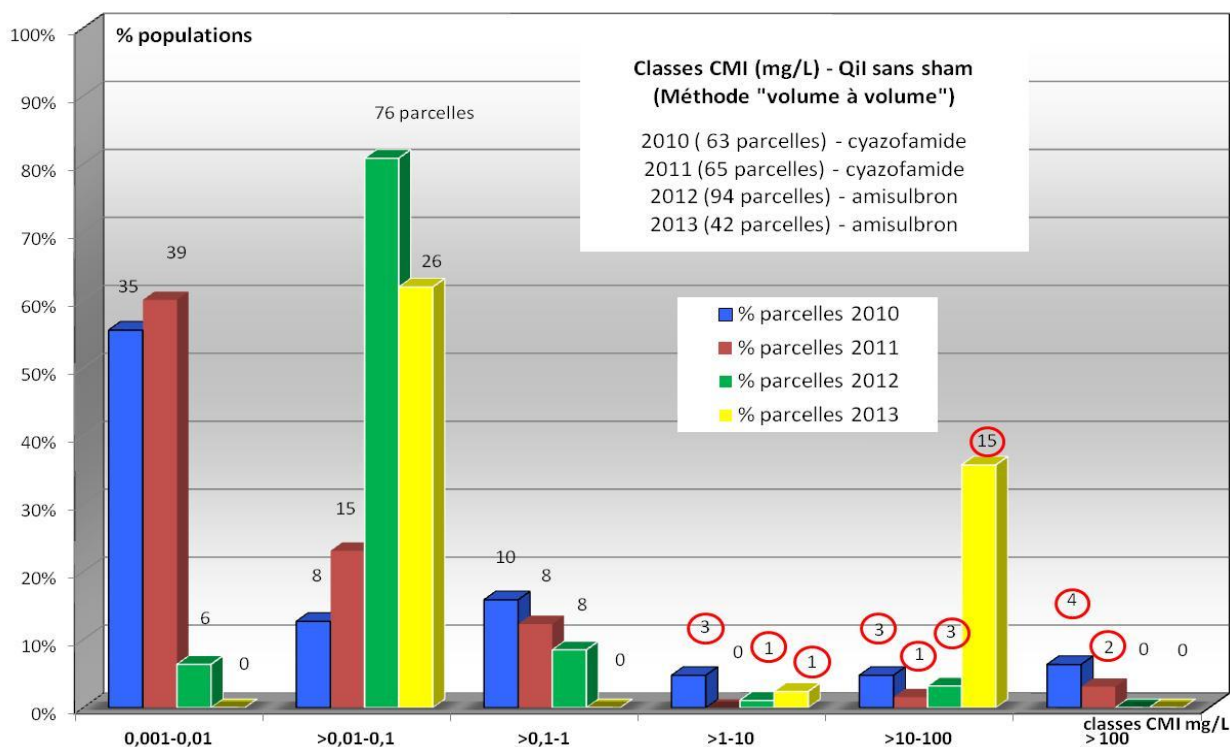
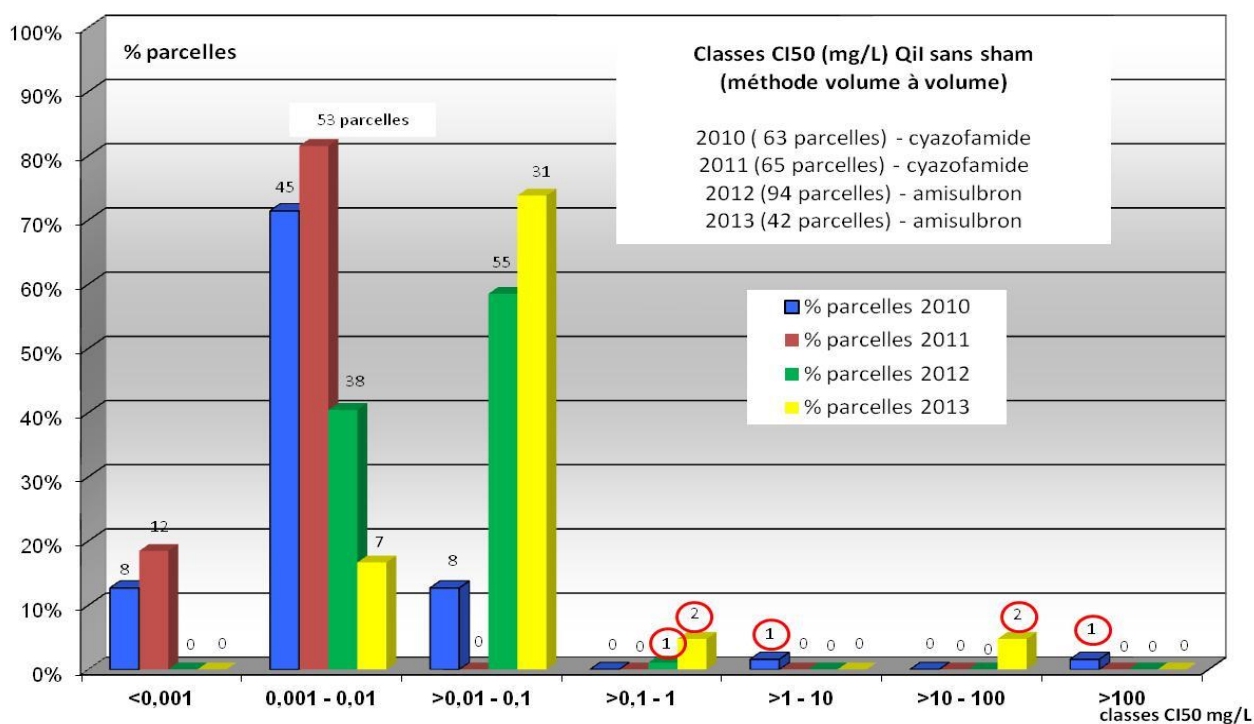


Figure 3 : Répartition (en %) des populations analysées vis-à-vis des Qil, entre 2010 et 2013, en fonction des CI50 (exprimées en classes)



Enfin, il est important de noter que, concernant ces tests de résistance aux Qil, trois parcelles ont été suivies sur plusieurs années : deux en Bourgogne (chaque année de 2010 à 2013) et une en Franche-Comté de 2010 à 2012.

En ce qui concerne l'une des parcelles de Bourgogne, la présence de souches résistantes aux Qil a été mise en évidence en 2010 et en 2012 mais de telles souches résistantes n'ont pas été retrouvées au cours des années 2011 et 2013. Pour l'autre parcelle de Bourgogne, des souches résistantes ont été détectées en 2010, puis en 2013.

Quant à la parcelle de Franche-Comté, les deux analyses de 2010 et 2011 ont révélé la présence de souches résistantes mais de telles souches résistantes n'ont pas été retrouvées en 2012. Cette parcelle n'a pas fait l'objet de prélèvement en 2013.

5- Discussion

La surveillance de la résistance du mildiou aux fongicides est réalisée depuis 2005 pour la famille des CAA et depuis 2010 pour celle des Qil.

Ces résultats d'analyses (réalisées sur plusieurs années) permettent d'avoir une image dynamique de l'évolution des résistances du mildiou aux deux familles de fongicides étudiées.

La famille des CAA : malgré les recommandations à la baisse des fongicides de cette famille, la résistance n'a cessé de progresser. En 2013, la quasi-totalité des parcelles analysées dans les vignobles du Nord-Est (Champagne, Bourgogne et Beaujolais) présentent des souches résistantes. Cette situation est probablement celle de l'ensemble des vignobles français (comme démontré au cours des années antérieures). Ces éléments suggèrent que la résistance du mildiou aux CAA pourrait se maintenir à un niveau élevé dans les années à venir. C'est pourquoi en 2014, la surveillance sera étendue à l'ensemble des vignobles pour dresser une situation nationale, par vignoble.

La surveillance de la **résistance aux Qil** a été engagée en 2010 et s'est poursuivie jusqu'en 2013. Dès la première année de suivi, il a été identifié plusieurs populations avec présence de souches résistantes, caractérisées par des CMI supérieures à celles observées dans la très grande majorité des populations analysées. Ces populations ont été découvertes dans plusieurs vignobles différents.

Au cours de ces quatre années d'analyse, la proportion de populations présentant des souches résistantes était faible jusqu'en 2012 (12% en 2010, 5% en 2011 et 3% en 2012). En 2013, elle progresse et atteint la valeur de 36%.

En 2012 et 2013, des tests de résistance avec la cyazofamid associée à de l'acide salicylhydroxamic (Sham) ont aussi été réalisés en parallèle des tests classiques. Aucune population avec des souches résistantes n'a été décelée sur cette modalité, l'hypothèse d'une résistance par la mise en place d'un mécanisme de respiration secondaire peut donc être posée.

L'incidence au terrain de la présence de ces souches résistantes reste pour l'instant à démontrer. Aucun cas de résistance en pratique n'a été constaté entre 2010 et 2013 (Note technique nationale 2014). Mais du fait de la progression des populations avec présence d'individus résistants détectés au laboratoire et de la progression de l'utilisation de cette famille de fongicides, la surveillance sera maintenue en 2014.

6- Conclusion – perspectives

La résistance aux CAA a été suivie sur trois régions viticoles (Bourgogne, Champagne et Rhône-Alpes), considérées comme représentatives de l'évolution de la résistance au niveau national. Cette résistance aux CAA a progressé de façon régulière au cours des années et les analyses 2013 montrent que la fréquence des populations possédant des souches résistantes est élevée dans les trois vignobles ciblés. La surveillance de la résistance aux CAA sera poursuivie en 2014 sur tout le vignoble afin de mieux évaluer le niveau de résistance sur l'ensemble du vignoble français.

La résistance aux Qil est surveillée pour la 4^{ème} année. Depuis 2010 (date de la première utilisation de cette famille au vignoble), on constate la présence de quelques souches résistantes détectées dans plusieurs populations de différents vignobles. Cette situation semble évoluer en 2013 avec un nombre de parcelles concernées plus important. L'utilisation non négligeable de ce type de fongicides incite à une surveillance étroite de la sensibilité du mildiou aux Qil. En parallèle, des essais devraient être mis en place pour appréhender l'impact de ce phénomène sur l'efficacité au champ des substances actives appartenant à cette famille.

7- Partenaires scientifiques et techniques

- Anne-Sophie Walker - INRA Grignon - Unité Bioger-CPP – avenue Lucien Brétignières – Thiverval-Grignon.

- Expert référent Résistances de la DGAL

M. Jacques Grosman – DRAAF-SRAL Rhône Alpes – 165 rue Garibaldi – BP 3202 – 69401 Lyon cedex 03 – France.

- Réseau des DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles de la Surveillance Biologique du Territoire pour la réalisation des prélèvements.

8- Bibliographie

- Groupe national résistance aux fongicides de la vigne (DGAI-SDQPV, INRA, IFV, APCA, CIVC), 2012 – Note nationale gestion de la résistance maladies de la vigne. Disponible sur les sites internet des DRAAF et des Chambres d'Agriculture