

# NIVEAUX de SENSIBILITE au CUIVRE de la BACTERIOSE du NOYER (Xanthomonas arboricola pv juglandis)

# **ETUDE 2013**

#### 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 des 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, un verger jamais traité au cuivre, pris comme référence dans la même région de la Noix de Grenoble, a été suivi selon ces deux mêmes critères (taux de contamination des bourgeons et sensibilité au cuivre des bactéries isolées).

Les résultats de l'étude 2013 montrent de **forts taux de contamination des bourgeons par la bactérie**, aussi bien sur le verger de référence non traité que sur les parcelles traitées de l'essai (environ un bourgeon sur deux contaminé) ; seule la modalité non traitée de l'essai a un taux de contamination significativement plus faible.

Concernant les **fréquences de colonies résistantes**, seule la population du verger de référence ne présente qu'un taux restreint de bactéries résistantes. Dans l'essai, ces taux sont particulièrement élevés, quelle que soit la modalité concernée. Cependant, c'est dans la modalité M3 (3,75 kg/ha) que l'on trouve le moins de colonies Très Résistantes (CMI = 128 mg/L), alors que ces dernières composent la majorité des populations observées dans les deux autres modalités, y compris dans le Témoin non traité.

Quant aux notations faites directement sur l'essai par la station de la SENuRA (pourcentages de noix bactériosées et rendements), elles tendraient à montrer, pour ces deux paramètres, un meilleur comportement de la modalité Témoin non traité ; cependant l'analyse statistique n'a pas permis de mettre en évidence une réelle différence significative.

Il n'en reste pas moins que l'ensemble des données (issues du laboratoire et du terrain) pose la question de l'intérêt de l'utilisation du cuivre dans la lutte contre la bactériose du noyer ; le maintien de cet essai "long terme" pendant au moins une année supplémentaire permettrait d'asseoir ces résultats.

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.

Les études menées en 2011 et 2012, à la fois sur des vergers commerciaux et sur un essai de comparaison de doses mis en place par la Station d'Expérimentation Nucicole Rhône-Alpes (SENuRA), a permis de montrer que certains vergers régulièrement traités au cuivre présentaient, en fin de saison, des taux importants de contamination des bourgeons avec une fréquence de bactéries résistantes significativement plus élevée que celle des vergers non traités.

Par contre, sur l'essai 2012, il s'est avéré difficile d'interpréter les données obtenues, le taux d'infection plus élevé des bourgeons dans les parcelles traitées étant en lien avec des proportions de bactéries résistantes identiques au Témoin dans la parcelle à 12,5 kg/ha et significativement plus élevées dans la parcelle à 3,75 kg/ha.

En 2013, les différentes parties prenantes (SENuRA/Ctifl, INRA, Anses) ont donc décidé de poursuivre cette étude.

En parallèle, des analyses ont également été effectuées dans le verger non traité au cuivre (et considéré comme sensible) qui sert de référence depuis la première année de mise en place de cette étude (verger <u>BB.09S</u>).

# II. MATERIEL ET METHODE

#### Dispositif expérimental

Une parcelle producteur est traitée selon différentes modalités de dose de Cuivre et est suivie tout au long de la saison pour les chutes de noix.

Par ailleurs, la parcelle BB.09S, non traitée depuis longtemps, sert de référence (Témoin exclu).

#### Echantillonnage des bourgeons

Les prélèvements, effectués par la station régionale de la SENuRA, sont constitués de bourgeons prélevés les 24 septembre et 1<sup>er</sup> octobre 2013 (bourgeons néoformés). Pour chaque modalité, 130 bourgeons ont été échantillonnés, à raison de 26 bourgeons x 5 arbres par modalité. Pour la parcelle <u>BB.09S</u>, il s'agit de 130 bourgeons prélevés sur 10 arbres. Chaque bourgeon a été placé en sachet individuel.

# 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.

Après broyage de chaque bourgeon dans de l'eau stérile, un étalement est réalisé sur milieu sélectif (LPGA + cycloheximide + cephalexine) permettant de sélectionner majoritairement les souches bactériennes du genre *Xanthomonas* (colonies à aspect jaune).

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. Si cette analyse ne permet pas de déterminer au moins une



colonie de *X. a.* pv *juglandis*, 5 nouvelles colonies sont reprises de l'isolement initial (issu du bourgeon) et soumises à leur tour à détermination.

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

# <u>Test de sensibilité au cuivre (réalisé par l'unité RPP de l'Anses-Lyon)</u>

A la réception des cultures de X. a. pv juglandis, un repiquage sur milieu LPGA est effectué pour régénérer la culture.

La sensibilité est évaluée par la méthode d'inoculation sur boîte de Petri (milieu CYE : Casitone - Extrait de levure – Glycerol – Agar) 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<sup>++</sup>/L de milieu.

Chaque colonie à tester est mise en suspension dans 1 mL d'eau stérile et déposée dans les boîtes de test à raison de 50  $\mu$ L de suspension bactérienne. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 jours.

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<sup>++</sup> (croissance à 8 mg/L au maximum)

Souches résistantes : CMI  $\geq$  32 mg/L Cu<sup>++</sup> (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 (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.

Une régression logistique est réalisée pour étudier les facteurs associés à la contamination des bourgeons. La variable réponse est le statut (contaminé/non contaminé) du bourgeon et le facteur étudié est le traitement (non traité, 12.5 kg/ha de Cu et 3.75 kg/ha de Cu). Un intercept aléatoire est introduit dans le modèle pour prendre en compte les corrélations entre les bourgeons d'un même arbre. Une autre régression logistique avec les mêmes variables est mise en œuvre à partir des bourgeons pour lesquels un isolement de X. a. pv juglandis a été réalisé afin d'étudier les facteurs associés à la résistance des bactéries.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <a href="http://www.R-project.org/">http://www.R-project.org/</a>).

# III. DESCRIPTION DES VERGERS ETUDIES

#### Verger non traité

Il s'agit de la parcelle <u>BB.09S</u> (St Hilaire du Rosier – 38), déjà analysée en 2009, 2010, 2011 et 2012. Situé dans la zone de culture de la Noix de Grenoble, ce verger est considéré comme un verger non traité de référence.

# Essai Doses de cuivre S.E.Nu.R.A. 2013 (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 depuis 2011),



- Modalité M2 : traitement cuivre (Bouillie Bordelaise RSR, base 1000 L/ha) à la dose de 12,5 kg/ha (dose homologuée : 1,25 kg/hL)), soit 2,5 kg de cuivre métal par traitement,
- *Modalité M3*: traitement cuivre (Bouillie Bordelaise RSR, base 1000 L/ha) à la dose de 3,75 kg/ha, soit 0, 75 kg de cuivre métal par traitement.

Les traitements cuivre sont intervenus entre début-mai (7/05) et début-juin 2013 (6/06), aux dates suivantes : 7/05, 14/05, 22/05, 28/05 et 6/06.

Les prélèvements ont été effectués à la fin septembre-début octobre, donc après les traitements.

L'essai a été suivi, sur le terrain, durant toute la saison jusqu'à la récolte par un comptage des fruits chutés.

# IV. RESULTATS

En premier lieu, il est important de noter que, tous les prélèvements ont été effectués environ 4 mois après le dernier traitement cuivre réalisés sur l'essai. Tous les résultats décrits ci-dessous ont donc été obtenus à partir de populations de bactéries ayant subi une pression de sélection et non à partir de l'inoculum de printemps. Par ailleurs, le nombre d'arbres échantillonnés a été deux fois plus important dans le verger non traité cuivre (10 arbres) que dans chaque modalité de l'essai (5 arbres). Cependant, le nombre de bourgeons prélevés a été identique sur toutes les parcelles prélevées (130), en conformité avec les conclusions de l'étude 2011.

#### 1 - TAUX DE CONTAMINATION DES BOURGEONS PAR LA BACTERIE

La synthèse des résultats d'isolements (effectués bourgeon par bourgeon) montre que le nombre de colonies de *X. a.* pv *juglandis* isolées, et donc, le taux de bourgeons contaminés par au moins une colonie, se sont révélés fort différents selon la parcelle considérée (Tableau I).

- ➤ Pour le verger non traité de référence BB.09S, ce taux est beaucoup plus élevé que celui relevé en 2012 (environ 45% en 2013 vs 5% en 2012).
- Sur l'essai, le Témoin non traité présente un taux nettement plus bas que ceux des modalités traitées, les taux de contamination de ces dernières s'avérant environ 2 fois supérieurs au taux du Témoin.

L'analyse statistique portant sur ces données montre :

- un taux de contamination significativement supérieur dans le verger non traité de référence (BB.09S) par rapport au Témoin non traité de l'essai (p = 0,022),
- dans l'essai, <u>par rapport au Témoin non traité</u>, des taux de contamination significativement plus élevés dans les modalités traitées (différences significatives pour la modalité M2 traitée à 12,5 kg/ha (p = 0,008) comme pour la modalité M3 traitée à 3,75 kg/ha (p = 0,016)),
- par contre, <u>entre les deux modalités traitées</u>, il n'apparaît aucune différence significative (p = 0,75).



**Tableau I:** TAUX DE CONTAMINATION DES BOURGEONS

Référence des vergers ou modalités	Date prélèvement	Nb total bourgeons prélevés / (nb arbres)	Nb bourgeons ayant, au moins, 1 colonie X. a. pv juglandis isolée	Taux de bourgeons contaminés par au moins une colonie X. a. pv juglandis					
Verger non traité cuivre de Référence									
<b>BB.09S</b> St Hilaire du Rosier (38)	SeptOct. 2013	130 / (10)	59	45,4%					
ESSAI									
<b>M1</b> TNT	SeptOct. 2013	130/(5)	36	28%					
<b>M2</b> Cu 12,5 kg/ha	SeptOct. 2013	130/(5)	64	49%					
<b>M3</b> Cu 3,75 kg/ha	SeptOct. 2013	130/(5)	61	47%					

# 2 - RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE

Les résultats des tests de sensibilité au cuivre réalisés sur les colonies isolées dans chaque parcelle sont synthétisés dans le tableau II, ci-dessous.

Tableau II: Résultats des TESTS DE SENSIBILITE

Référence des vergers ou modalités	Date prélèvement	Nb colonies X. a. pv juglandis testées / sensibilité Cu	Nb colonies à CMI ≤ 16 mg/L	Nb colonies à CMI = 32 mg/L	Nb colonies à CMI = 64 mg/L	Nb colonies à CMI = 128 mg/L	% colonies X. a. pv juglandis R au cuivre			
Verger non traité cuivre de Référence										
BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	SeptOct. 2013	59	46	4	9	0	22%			
ESSAI										
M1 TNT	SeptOct. 2013	36	7	4	9	16	80,5%			
<b>M2</b> Cu 12,5 kg/ha	SeptOct. 2013	64	7	1	26	30	89%			
<b>M3</b> Cu 3,75 kg/ha	SeptOct. 2013	57	4	17	32	4	93%			

➤ Pour le verger non traité de référence BB.09S, il apparaît que 22% des colonies de X. a. pv juglandis se sont avérées résistantes au cuivre (sur 59 colonies isolées et testées), contrairement aux données obtenues en 2012 dans ce même verger (0% sur 7 colonies isolées et testées).



# > Sur l'essai, les tests de résistance ont donné les résultats suivants :

- sur les 36 colonies de X. a. pv juglandis issues du Témoin non traité et soumises au test, environ 80% se sont avérées résistantes (dont plus d'une sur deux avec une CMI très élevée, égale à 128 mg/L),
- sur les 64 colonies de *X. a.* pv *juglandis* issues de la **modalité M2** (traitement 12,5 kg/ha), le pourcentage de colonies résistantes semble supérieur à celui du Témoin non traité (89%), avec, là encore, plus d'une colonie sur deux ayant une CMI très élevée, égale à 128 mg/L,
- sur les 57 colonies de *X. a. pv juglandis* issues de la **modalité M3** (traitement 3,75 kg/ha), le pourcentage de colonies résistantes est particulièrement élevé (93%). Mais, dans cette modalité M3, la grande majorité des bactéries résistantes ont une CMI égale à 64 mg/L et seulement 4 colonies montrent une CMI égale à 128 mg/L.

# L'analyse statistique portant sur ces données montre que :

- le verger de référence (BB.09S) possède un taux de colonies résistantes significativement inférieur (p = 0,025) à celui de la parcelle Témoin de l'essai. De plus, dans le verger de référence, aucune des colonies résistantes ne présente une CMI égale à 128 mg/L, ce qui n'est pas le cas de la parcelle Témoin M1. Entre ces deux parcelles, l'analyse statistique met en évidence une différence significative (p = 0,0055) dans la distribution des colonies entre les trois classes de CMI (32, 64 et 128 mg/L),
- sur l'essai, il n'existe aucune différence significative entre le Témoin non traité et la modalité M2 pour le pourcentage global de colonies résistantes (p = 0,83). Quant à la distribution des colonies entre les trois classes de CMI, bien que le nombre de colonies avec une CMI à 128 mg/L paraisse plus élevé dans la modalité M2, il n'est pas possible d'affirmer, dans les conditions de l'essai, qu'il existe une différence significative (p = 0,058),
- pour la modalité M3, il n'est pas non plus possible, dans les conditions de l'essai, de mettre en évidence une différence significative sur le taux global de colonies résistantes (p = 0,055) par rapport à la modalité Témoin non traité (M1). Par contre, une différence hautement significative apparait dans la distribution des colonies entre les trois classes de CMI (p <0.0001), la modalité M3 présentant une distribution entre les trois classes de CMI moins inquiétante que dans le Témoin non traité.

# V. DISCUSSION

# 1 - VERGER NON TRAITE DE REFERENCE (BB.09S)

Ce verger, suivi depuis 2009 et choisi pour son historique avec absence de traitements contre *X. a.* pv *juglandis* a montré en 2013, contrairement à 2012, un taux non négligeable de contamination des bourgeons par la bactérie et la présence d'environ un quart de bactéries résistantes parmi celles analysées. En fait, bien que calculé sur un nombre de bourgeons équivalent à celui de 2012 (130 bourgeons), les taux de contamination et de résistance observés en 2013 s'avèrent être de l'ordre des taux enregistrés, dans ce même verger, en juillet 2011 (contamination de 42% des bourgeons et 29% de bactéries résistantes, à partir de 50 bourgeons et sur un nombre équivalent d'arbres).

# 2 - ESSAI DOSES DE CUIVRE (S.E.NU.R.A.)

➤ Concernant le taux de contamination, le plus faible taux se situe sur le Témoin non traité, et ce taux est même significativement inférieur à celui observé dans le verger de référence.



Toutefois, la comparaison du taux de contamination dans le Témoin M1 avec celui relevé dans la même parcelle en 2012 montre une contamination deux fois supérieure en 2013 (28% en 2013 versus 13% en 2012).

Quant aux deux modalités traitées, elles sont significativement plus contaminées que le Témoin. Par contre, pour ce critère, les deux modalités traitées M2 et M3 présentent un profil similaire avec environ 1 bourgeon sur 2 contaminé par la bactérie.

#### Quant aux tests de sensibilité, ils démontrent que :

- le Témoin non traité présente un taux de colonies résistantes significativement supérieur à celui du verger de référence,
- la modalité M2 traitée à 12,5 kg/ha, bien que plus contaminée, présente un pourcentage de colonies résistantes non différent de celui du Témoin,
- la modalité M3 traitée à 3,75 kg/ha montre un très fort pourcentage de colonies résistantes sans qu'il soit possible, dans les conditions de l'essai, de montrer une véritable différence significative par rapport au Témoin.

L'examen de la distribution des CMI des colonies résistantes montre, en particulier, un fort pourcentage de colonies très résistantes (CMI = 128 mg/L) dans le Témoin non traité (55% de l'ensemble des colonies résistantes) ainsi que dans la modalité M2 traitée à 12,5 kg/ha (53%), alors que la proportion de ces colonies très résistantes est beaucoup plus faible (7,5%) dans la modalité M3 traitée à 3,75 kg/ha et nulle dans le verger référence.

Ces données de laboratoire doivent également être analysées au regard des notations du terrain. Or, les notations faites directement sur l'essai par la station de la SENuRA (pourcentages de noix bactériosées et rendements) tendraient à montrer, pour ces deux paramètres, un meilleur comportement de la modalité Témoin non traité. Cependant, l'analyse statistique réalisée sur ces deux facteurs n'a pas permis de mettre en évidence une réelle différence significative.

# VI. CONCLUSIONS — PERSPECTIVES

Les résultats de l'essai 2013 confirment les résultats obtenus en 2012 au niveau des taux de contamination des bourgeons par la bactérie *X. a.* pv *juglandis*. En effet, ces taux de contamination sont, comme l'an dernier, beaucoup plus forts dans les parcelles traitées que dans le Témoin non traité. Mais, contrairement à 2012, le taux de contamination du verger de référence non traité est nettement supérieur à celui du Témoin non traité de l'essai ; il est, en fait, de l'ordre de celui des deux modalités traitées.

Par contre, si l'on considère les taux de colonies résistantes, recherchés quatre mois après les traitements, seul le verger de référence ne présente qu'un taux restreint de colonies résistantes. Dans l'essai, ces taux sont particulièrement élevés, quelle que soit la modalité concernée. Ils sont très supérieurs à 80% dans la modalité Témoin M1 et la modalité M2 (12,5 kg/ha) et supérieurs à 90% dans la modalité M3 (3,75 kg/L). Cependant un probable manque de puissance de l'essai n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre cette modalité M3 et la modalité Témoin.

La comparaison avec les chiffres obtenus en 2012 montre que les fréquences de colonies résistantes sont très supérieures en 2013 dans les modalités Témoin et M2 (environ 50% en 2012 *versus* > 80% en 2013) et de l'ordre de ceux de 2012 dans la modalité M3 (supérieures à 90%).

Il est néanmoins important de noter que c'est dans la modalité M3 que l'on trouve le moins de colonies très résistantes alors que ces dernières composent la majorité des populations observées dans les deux autres modalités.

L'ensemble de ces résultats 2013 (issus du laboratoire et du terrain) amène à poser la question de l'intérêt de l'utilisation du cuivre dans la lutte contre la bactériose du noyer. Le maintien de cet



essai "long terme", pendant au moins une année supplémentaire, permettrait d'asseoir ces résultats.

# VII. BIBLIOGRAPHIE

- <u>Ménard M.</u> (document non daté) : La bactériose du noyer et la sensibilité au cuivre *de Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis. Note INRA*.
- <u>Gardan L., Brault T., Germain E.,</u> 1993. Copper resistance of *Xanthomonas arboricola* pv.*juglandis* in French Walnut orchards and its association conjugative plasmids. Acta Horticulturae 311.

# VIII. 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)
- Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Ctifl)
- Anses-Lyon unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP)