

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

ETUDE 2014-2015

Résumé

La bactériose du noyer (causée par la bactérie *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 semblent perdre leur 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).

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

I. PRÉSENTATION – CONTEXTE

La bactériose du noyer (causée par la bactérie *Xanthomonas arboricola pv juglandis* ou *Xaj*) 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 est en cours de révision dans le cadre de la réglementation européenne. A l'avenir, il pourrait n'être autorisé qu'à des doses beaucoup plus faibles que celles actuellement homologuées.

Les études menées depuis plusieurs années, 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. Une fréquence significativement plus élevée de bactéries résistantes que celle des vergers non traités y a également été observée.

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 BB.09S).

Cette quatrième et dernière année d'analyse devrait permettre d'apporter des précisions sur le niveau de sensibilité au cuivre de la bactériose du noyer.

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, qui n'a jamais été traitée, sert de référence (Témoin exclu).

Echantillonnage des bourgeons

Les prélèvements de bourgeons, effectués par la station régionale de la SENURA, ont été réalisés une première fois en début novembre 2014, puis début mars 2015 (bourgeons néoformés). Ce second prélèvement a été décidé suite à un échec de conservation des bactéries isolées sur le premier échantillonnage.

Pour chaque modalité, 130 bourgeons ont été échantillonnés, à raison de 26 bourgeons x 5 arbres par modalité. Pour la parcelle BB.09S, 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'ANSES de Lyon pour les prélèvements 2015)

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 + cephalaxine) 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 à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire (Gironde et al, 2009). Cette technique permet de distinguer les bactéries recherchées (*X. a. pv juglandis*) des autres bactéries du type *X. arboricola* par amplification spécifique d'un fragment d'ADN. Si cette analyse ne permet pas de déterminer au moins une colonie de *Xaj*, 5 nouvelles colonies sont reprises de l'isolement initial (issu du bourgeon) et soumises à leur tour à détermination.

Pour chaque bourgeon dans lequel une souche de *Xaj* a pu être déterminée, une des colonies identifiées comme *Xaj* 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)

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⁺⁺/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 µL 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⁺⁺ (croissance à 8 mg/L au maximum)

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

Remarque :

- Sur l'échantillonnage de mars 2015, suite à un problème de conservation des isoléments de *Xaj* obtenus, de nouveaux isoléments ont été réalisés à partir des broyats congelés à -20°C des bougeons individualisés.

Analyses statistiques

- *Données d'infection et de résistance dans les vergers*

Les données ont été analysées en utilisant deux types de modèles linéaires généralisés. Le premier est un modèle simple prenant comme effet fixe « traitement », le second est un modèle mixte qui prend en plus de l'effet fixe « traitement », un effet aléatoire « arbre », ce qui permet de prendre en compte les corrélations entre arbres au sein des traitements. Le traitement de référence utilisé dans ces analyses est la modalité M1 « Témoin non traité ». Il est également important de noter qu'une analyse préliminaire a montré une variation importante de taux d'infection entre arbres du bloc 5. Les bourgeons du bloc 5 ayant été traités au laboratoire de façon décalée dans le temps, il a été décidé d'exclure ce bloc des analyses finales. La proportion de souche *Xaj* identifiées et la proportion de souches *Xaj* résistantes ont été utilisées comme variables de réponse dans ces modèles.

- *Données de variations inter-annuelles des fréquences de résistances dans le verger traité vis-à-vis d'un verger de référence.*

Les niveaux de résistance des différents traitements pour chaque année ont été comparés aux niveaux observés durant l'année 2011, année prise comme année de référence, en utilisant le cadre d'un modèle linéaire généralisé.

III. DESCRIPTION DES VERGERS ETUDIÉS

Verger non traité

Il s'agit de la parcelle BB.09S (St Hilaire du Rosier – 38), déjà analysée en 2009 et 2010, puis intégrée, lors la mise en place de l'essai, comme Témoin exclu, de 2011 à 2014. 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. 2014 (St Romans)

Des prélèvements ont été réalisés sur l'essai mis en place par la Station de la SENURA de 2011 à 2014. 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 le 17/04/2014 et le 07/05/2014 (4 traitements)

Les résultats présentés dans ce bilan concernent les prélèvements effectués en mars 2015, soit environ 10 mois après la réalisation des derniers traitements Cuivre sur l'essai. L'essai a été suivi, sur le terrain, durant toute la saison jusqu'à la récolte par un comptage des fruits chutés (du 27/05 au 02/10/2014).

IV. RESULTATS

REMARQUE préliminaire concernant les différentes analyses sur les deux prélèvements

Seuls les échantillons du prélèvement du printemps 2015 ont pu être soumis à la succession de toutes les analyses (détermination de l'espèce, taux de contamination ainsi que tests de sensibilité). Seules les données issues de ce second prélèvement permettent donc une interprétation complète sur l'ensemble des parcelles. Les résultats présentés ci-dessous concernent ces données de printemps 2015 et ont donc été obtenus à partir de populations de bactéries ayant subi une pression de sélection au printemps 2014 et constituant l'inoculum du

printemps 2015. Dans la suite de ce document, ces données seront considérées comme correspondant à l'année 2014.

N.B. : 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, avec 1046 tests PCR réalisés) montre que le nombre de colonies de *Xaj* isolées, et donc, le taux de bourgeons contaminés par au moins une colonie, se sont révélés fort différents selon la parcelle considérée (Tableau I).

- **Sur l'essai**, le Témoin non traité présente un taux significativement plus élevé que ceux des modalités traitées, les taux de contamination de ces dernières (environ 27%) s'avérant environ 2 fois inférieurs au taux du Témoin non traité (45% de bourgeons contaminés *Xaj*).
- **Pour le verger non traité de référence BB.09S**, ce taux n'est pas significativement différent de ceux observés dans les 2 parcelles traitées de l'essai. Ce verger, bien que non traité, présente donc un taux d'infection significativement inférieur au Témoin non-traité.

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 <i>Xaj</i> isolée	Taux de bourgeons contaminés par au moins une colonie <i>Xaj</i>
Verger non traité cuivre de Référence				
BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	Mars 2015	130 / (10)	41	31,5%
ESSAI				
M1 TNT	Mars 2015	130/(5)	59	45%
M2 Cu 12,5 kg/ha	Mars 2015	130/(5)	34	26%
M3 Cu 3,75 kg/ha	Mars 2015	130/(5)	36	28%

2 - RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE AU CUIVRE

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

- **Pour le verger non traité de référence BB.09S**, il apparaît qu'environ 59% des colonies *Xaj* se sont avérées résistantes au cuivre (sur 41 colonies isolées et testées). Ce taux n'était que de 22% en 2013 dans ce même verger (sur 59 colonies isolées et testées), mais la période de prélèvement des bourgeons était différente (automne 2013 vs printemps 2015).

Tableau II : Résultats des TESTS DE SENSIBILITE

Référence des vergers ou modalités	Date prélèvement	Nb colonies <i>Xaj</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	Nb colonies à CMI = 128 mg/L	% colonies <i>Xaj</i> R au cuivre
Vergers non traité cuivre de Référence							
BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	Mars 2015	41	16	20	4	0	58,5%
ESSAI							
M1 TNT	Mars 2015	59	7	34	15	3	88%
M2 Cu 12,5 kg/ha	Mars 2015	32	2	14	11	5	94%
M3 Cu 3,75 kg/ha	Mars 2015	36	4	16	13	3	89%

➤ **Sur l'essai**, les tests de résistance ont donné les résultats suivants :

- sur les 59 colonies de *Xaj* issues du **Témoin non traité** et soumises au test, environ 88% se sont avérées résistantes, dont 3 (soit 5% des colonies testées) avec une CMI très élevée, égale à 128 mg/L,
- sur les 32 colonies de *Xaj* issues de la **modalité M2** (traitement 12,5 kg/ha), le pourcentage de colonies résistantes est supérieur à celui du Témoin non traité et particulièrement élevé (94%), avec 5 colonies (soit 15% des colonies testées) ayant une CMI égale à 128 mg/L,
- sur les 36 colonies de *Xaj* issues de la **modalité M3** (traitement 3,75 kg/ha), le pourcentage de colonies résistantes est de l'ordre de celui du Témoin (89%), avec 3 colonies (8% des colonies testées) montrant une CMI égale à 128 mg/L.

L'analyse statistique montre que toutes les modalités de l'essai présentent des taux de souches résistantes au cuivre significativement plus élevés que le taux observé dans la parcelle de référence. Les taux de résistance ne diffèrent pas significativement entre les différentes modalités.

3 - RESULTATS DES TESTS DE VARIATIONS INTER-ANNUELLES DE SENSIBILITE AU CUIVRE

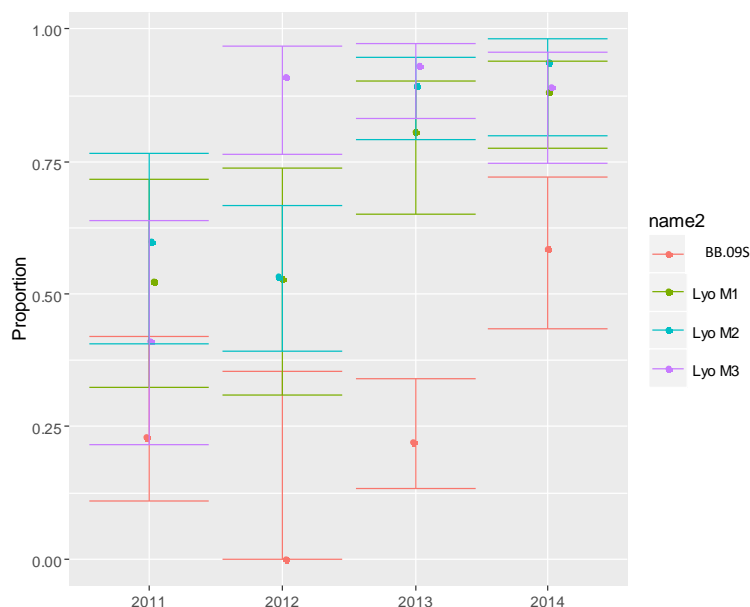


Figure I : Evolution du taux de souches de *Xaj* résistantes dans les différentes modalités et dans les deux vergers.

Depuis 2011, on observe dans l'essai une augmentation drastique de la proportion de souches résistantes dans les différentes modalités. Cette proportion augmente significativement entre 2011 et 2012 pour la modalité M3, puis reste stable à environ 90 %. Pour les modalités M1 et M2, cette augmentation drastique est observée l'année suivante entre 2012 et 2013. Il est intéressant de voir qu'au sein de l'essai, les souches résistantes ont augmenté très rapidement en fréquence avant de se stabiliser autour de 90 % et ce, quelle que soit la modalité. Le fait que la fréquence des souches résistantes n'augmente plus en 2014 est probablement dû au simple fait que presque 100 % des souches sont alors résistantes. Il est également intéressant de voir qu'en l'espace de 2 ans, les arbres traités ou non traités présentent les mêmes taux de souches résistantes.

L'évolution du taux de résistance dans le verger de référence est bien moins importante même si elle est significative entre 2013 et 2014. Dans ce verger, le taux de souches résistantes ne concerne pas encore l'ensemble de la population de bactéries.

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 *Xaj* a montré, sur les prélèvements du printemps 2015, **un taux élevé de contamination des bourgeons** par la bactérie (environ 32%); mais qui semble rester inférieur à celui du Témoin non traité de l'essai (tout en étant équivalent à celui des deux modalités traitées). Ce plus faible taux de contamination du verger de référence (non traité, comme le Témoin de l'essai) peut éventuellement s'expliquer par des différences pédoclimatiques entre les deux vergers.

Par contre, en ce qui concerne **le taux de résistance des colonies *Xaj* isolées** (environ 59%), son taux est significativement inférieur à celui de toutes les modalités de l'essai, y compris celui du Témoin non traité. Toutefois ce taux est en augmentation significative depuis ces deux dernières années. Cette apparition de souches résistantes dans une parcelle non traitée pourrait s'expliquer par des migrations de souches entre vergers (par anémochorie ou zoochorie).

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

➤ **Concernant le taux de contamination**, les plus faibles taux (environ 27%) sont observés sur les deux modalités traitées et ils sont très nettement inférieurs à celui du Témoin non traité (45%). Ceci montre que le traitement au cuivre a toujours un impact sur les niveaux d'infection des arbres traités.

➤ **Quant aux tests de sensibilité**, ils démontrent que :

- le Témoin non traité présente un taux de colonies résistantes supérieur à celui du verger de référence,
- les 3 modalités (Témoin, modalité M2 traitée à 12,5 kg/ha et modalité M3 traitée à 3,75 kg/ha) présentent un fort pourcentage de colonies résistantes. Ce taux semble supérieur pour la modalité 12,5 kg/ha mais l'analyse statistique ne montre pas de différences significatives entre les 3 modalités.

L'examen de la distribution des CMI des colonies résistantes montre un pourcentage de colonies très résistantes (CMI = 128 mg/L) à peu près équivalent dans les modalités Témoin non traité et M3 traitée 3,75 kg/ha (respectivement 5 et 8%), alors que celui de la modalité M2 traitée 12,5 kg/ha est plus élevé (15%).

Il faut noter que ce pourcentage de colonies très résistantes est nul pour le verger de référence non traité.

3 - TESTS DE VARIATIONS INTER-ANNUELLES DE SENSIBILITE AU CUIVRE

Globalement, l'évolution de la résistance au cuivre a été très rapide durant les années de suivi du dispositif d'essai. Cette évolution peut s'expliquer par le fait que les souches résistantes se diffusent au sein d'un verger, y compris sur des arbres non traités au cuivre. Dans la même période, dans le verger de référence non traité, le taux de souches résistantes est resté faible et assez stable, excepté la dernière année où ce taux a fortement évolué sans atteindre toutefois ceux observés sur l'essai. Cette augmentation pourrait être la conséquence de la migration de souches résistantes provenant d'autres vergers. Il se peut aussi que la différence de période de prélèvement pour la dernière année ait affecté la proportion de souches résistantes identifiées.

L'autre constat qui peut être fait est le suivant : au cours de ce suivi, le niveau de résistance des colonies étudiées a progressivement augmenté sur les trois modalités de l'essai (en 2011, toutes les souches résistantes observées montraient une CMI à 32 mg/L ; en 2012, une certaine proportion des colonies résistantes présentaient une CMI à 64 mg/L, notamment sur les 2 modalités traitées ; en 2013 et 2014, une partie des colonies résistantes avaient une CMI à 128 mg/L). Dans le même laps de temps, le verger de référence non traité présentait seulement une très faible proportion de colonies résistantes avec une CMI à 64mg/L au cours de l'année 2013, sans progression en 2014.

VI. CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

Concernant les résultats obtenus sur l'essai en 2014, les résultats exposés dans ce bilan montrent que le taux de contamination des bourgeons par au moins une colonie de la bactérie *Xaj*, apparaît plus faible dans les modalités traitées que dans le Témoin non traité, tout en étant équivalent à celui du verger de référence non traité.

Par contre, si l'on considère les taux de colonies résistantes, seul le verger de référence ne présente qu'un taux moyen de colonies résistantes. Dans l'essai, ces taux sont particulièrement élevés, sans différence significative entre les trois modalités.

La comparaison inter-annuelle des taux de résistance observés au cours des 4 années de suivi montre une évolution rapide de ce taux de résistance sur les trois modalités de l'essai : les souches résistantes représentent la quasi-totalité de la population de *Xaj* à la fin de l'essai. A cela s'ajoute une augmentation continue des niveaux de résistance des colonies étudiées.

VII. 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.
- Gironde S., Guillaumes J., Manceau C., 2009. Specific detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* pathogen on walnut. EPPO Conference on Diagnostics and Associated workshops, York, UK. http://www.cost873.ch/_uploads/_files/Gironde_York2009.pdf

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)