

# « FLAVESCENCE DOREE : COMPORTEMENT DE LA VIGNE, PROTECTION DURABLE ET METHODES DE LUTTE EN AGRICULTURE BIOLOGIQUE »

## SYNTHESE FINALE

Action de recherche 2002/2003 financée par l'Enveloppe Recherche de l'ACTA

N° du projet : 02/20AB – ICTA Pilote : ITAB

Titre abrégé : Flavescence dorée, vigne et cicadelle vectrice en agrobiologie.

ICTA associé : ITV

Partenaires : INRA de Dijon

## I - OBJECTIFS

Ce programme se divise en trois volets :

- I - Etude du comportement variétal de la vigne vis à vis de la maladie, amélioration des connaissances sur le phytoplasme et des relations hôte / pathogène, (INRA Dijon)
- II - Enquête sur la situation et l'évolution dans les vignobles en agrobiologie, (ITAB)
- III - Lutte contre la cicadelle de la flavescence dorée
  - Optimisation de l'efficacité de la Roténone (Roténobiol), seul insecticide homologué et autorisé pour lutter contre le vecteur *Scaphoideus titanus*, en lutte biologique (ITV, GRAB/ITAB<sup>1</sup>),
  - Intérêt éventuel d'autres insecticides, admis en agriculture biologique, mais non homologués contre ce ravageur (ITV et GRAB/ITAB).
  - Conditions pratiques de l'application pour une efficacité optimale, (ITV et GRAB/ITAB)
  - Roténone et résidus, (ITV)
  - Roténone et acarocénose (ITV).

## II - MOTIVATIONS

La flavescence dorée (FD) est une maladie en extension continue depuis le début des années 80, où elle s'est manifestée en France pour la deuxième fois. Maladie à conséquences économiques graves ou irréversibles, elle figure parmi les maladies de quarantaine. Sa lutte en France est régie par les arrêtés ministériels du 17 avril 1987 et du 1er avril 1994, qui instituent la lutte insecticide obligatoire contre la cicadelle vectrice en zone contaminée pour les vignes de production, et sur tout le territoire national pour les vignes-mères et les pépinières. Des arrêtés préfectoraux déterminent pour chaque région les dates et les périmètres de lutte, et définissent le seuil de maladie entraînant l'arrachage obligatoire des parcelles contaminées.

Les moyens de lutte contre la cicadelle vectrice sont particulièrement limités en agriculture biologique. Seulement deux spécialités à base de roténone sont homologuées. L'emploi de tout autre insecticide fait perdre la certification "agriculture biologique", même dans le cas où la parcelle concernée se trouve dans un périmètre défini de lutte obligatoire.

---

<sup>1</sup> Pour la partie ITAB, le volet expérimentation a été délégué au GRAB par convention, d'où la notation ITAB/GRAB concernant ces actions dans le reste du document.

Les viticulteurs biologiques sont donc confrontés à un dilemme d'une extrême gravité, tandis que la progression de la maladie laisse prévoir que de plus en plus d'exploitations biologiques seront concernées dans les prochaines années.

Mais les besoins de recherche de protection durable concernent également l'ensemble de la filière viticole, car force est de constater que la lutte conventionnelle, si elle permet d'assainir progressivement les régions touchées, n'empêche pas la diffusion sournoise de la maladie et son signalement chaque année dans de nouvelles zones jusque-là indemnes.

### III - MATERIELS ET METHODES

#### III.1 - Recherches en cours sur les relations hôte-phytoplasme : comportement de ceps "résistants" et bases de la transmission spécifique par la cicadelle vectrice

La première partie de la présente étude s'est intéressée aux observations antérieures de cas de résistance, dans une démarche prospective. Les résultats obtenus ne permettent encore aucune mise en cause de pathogènes latents interagissant avec les phytoplasmes mais les travaux se poursuivent car l'expérimentation est extrêmement lourde. La deuxième partie de l'étude est une approche biochimique des systèmes de reconnaissance entre le phytoplasme de la FD et les organes des cicadelles vectrices : la cicadelle *Scaphoideus titanus*, seul vecteur naturel connu, et la cicadelle *Euscelidius variegatus*, vecteur expérimental à une plante hôte expérimentale, la fève *Vicia faba*.

##### III.1.1 - Étude du comportement par rapport à la FD de la descendance de ceps "résistants" au vignoble

###### III.1.1.1 - Préparation et entretien du matériel biologique

###### *Origine et multiplication du matériel végétal "résistant"*

Au cours des années 1960 en Armagnac, des ceps de Baco 22A (francs de pied) sont restés indemnes de FD en dépit de la progression de la maladie. Plusieurs ceps repérés dans une parcelle dès 1962 (Tableau 1) ont été suivis chaque année jusqu'en 1977 (CAUDWELL et LARRUE, non publié). Ceux qui étaient restés sans symptômes chaque année au cours de ces 15 ans, ont été inoculés volontairement avec des cicadelles infectieuses installées sous manchon en 1977. Ils n'ont à nouveau montré aucun symptôme jusqu'en 1982, date à laquelle ils ont été multipliés et leur descendance installée dans un conservatoire en plein champ. Le tableau 2 représente ces 17 lignées (ceps-fils), nommées SA1 à SA17. En 2001, 16 des 17 têtes de lignées (SA1 à SA12, SA14 à SA17) étaient en vie et sans symptômes d'aucune maladie dégénérative. Ils ont fourni deux séries de matériel par multiplication:

- **A** : une multiplication en vert en juillet 2001 : 3 à 5 exemplaires par lignée ont été obtenus
- **B** : une multiplication en bois dormant en novembre 2001 : 5 boutures par lignée ont été établies

Tout ce matériel est conservé en serre et a été rajeuni en 2002 et 2003, par bouturage en vert.

|        | Pas de symptômes | Symptômes variables | Attaque très grave |
|--------|------------------|---------------------|--------------------|
| Rang 1 | 36 %             | 56 %                | 8 %                |
| Rang 2 | 44 %             | 30 %                | 26 %               |
| Rang 3 | 28 %             | 52 %                | 20 %               |
| Rang 4 | 34 %             | 40 %                | 26 %               |
| Rang 5 | 58 %             | 28 %                | 14 %               |

| Ceps-fils                  | Rang et cep de la parcelle mère | Cep 16 |
|----------------------------|---------------------------------|--------|
| SA1, SA2                   | Rang 1                          | Cep 18 |
| SA3                        | Rang 1                          | Cep 19 |
| SA4                        | Rang 1                          | Cep 39 |
| SA5                        | Rang 1                          | Cep 11 |
| SA6, SA7                   | Rang 2                          | Cep 9  |
| SA8, SA9, SA10, SA11, SA12 | Rang 4                          | Cep 16 |
| SA13, SA14                 | Rang 4                          | Cep 5  |
| SA15, SA16, SA17           | Rang 5                          |        |

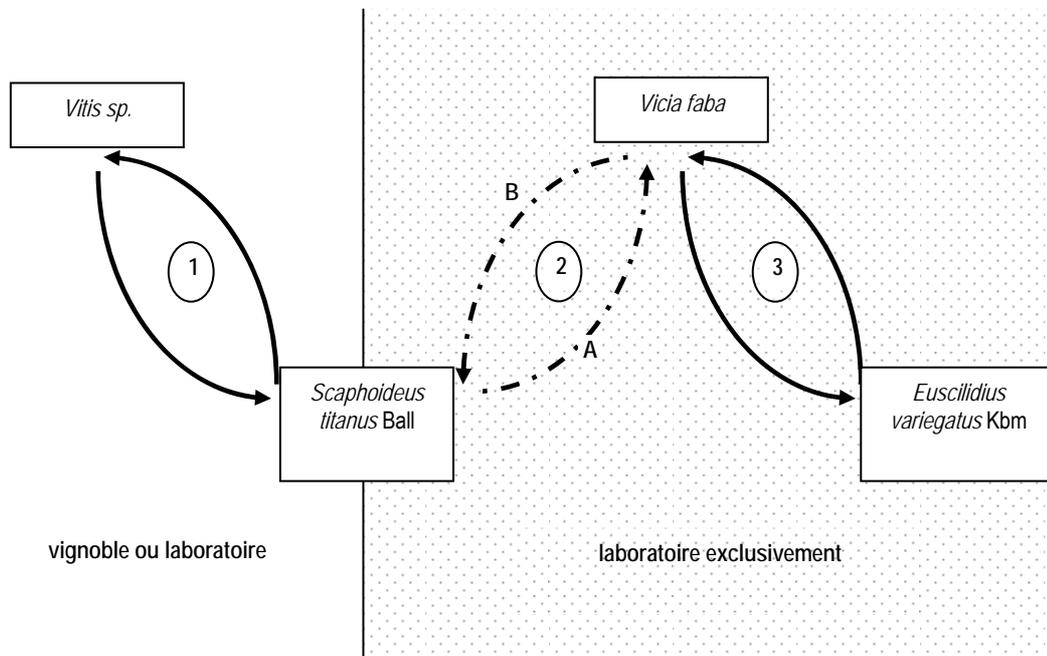
### Origine et entretien de matériel végétal sain

Du matériel de Baco 22A et LN33 sains (origine ENTAV) est propagé au laboratoire, par bouturage en vert. Les plants sont utilisés comme témoins sains dans la recherche de pathogènes. Ces deux cultivars sont très sensibles à la FD et peuvent être utilisés en indexage et comme témoins d'inoculation. Le matériel LN33 est utilisé pour la recherche du virus de l'écorce liégeuse (corky bark) par l'indexage

### Production expérimentale de cicadelles *Scaphoideus titanus* saines ou vectrices de la FD et inoculation des boutures de vigne

Schéma 1 : Transmission naturelle (1) et expérimentale (1, 2, 3) du phytoplasme de la FD par les cicadelles *Scaphoideus titanus*, vecteur naturel ampélophage et *Euscelidius variegatus*, vecteur expérimental ne se nourrissant pas sur la vigne.

Le cycle (2) permet l'importation au laboratoire sur la fève (A) de phytoplasmes infectant la vigne, ou l'acquisition sur la fève par *S. titanus* (B), de phytoplasmes multipliés par le cycle (3). Ce dernier est réalisé grâce au vecteur expérimental *E. variegatus*. Les phytoplasmes ne sont pas cultivables *in vitro*. L'inoculation à la vigne ne peut être obtenue qu'avec *S. titanus*. (cycle 1).



Des fragments de bois de vigne de 2 ans sont récoltés chaque hiver après la taille dans des vignobles non traités aux insecticides où se développent des populations importantes de *S. titanus*. Ils portent des œufs de *S. titanus*.

Ces bois sont conservés en chambre froide à 4 °C où la diapause de la cicadelle est assurée. Pour obtenir une colonie, suffisamment de bois (1 à 2 kg) sont disposés dans une cage d'éclosion à la

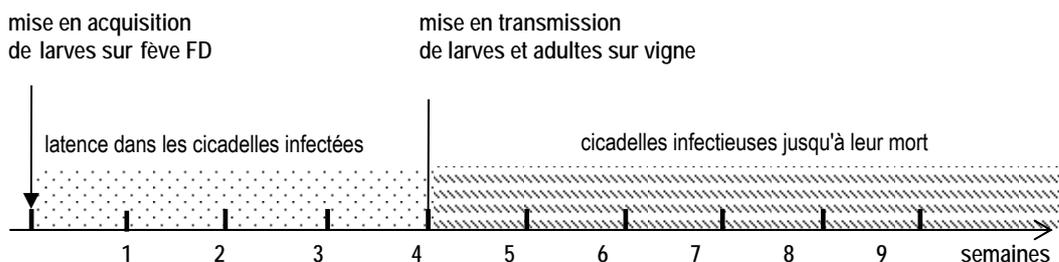
température ambiante de 22 °C en photopériode 16h/8h. Les éclosions des cicadelles *S. titanus* interviennent à partir du 21ème jour. Les insectes se développent en passant par 5 stades larvaires qui durent chacun de 8 à 10 jours et sont suivis du stade adulte de longévité allant jusqu'à 8 semaines.

Le phytoplasme de la FD est multiplié au laboratoire dans des fèves infectées artificiellement par inoculation à l'aide de la cicadelle *Euscelidius variegatus* domestiquée (qui ne se nourrit pas sur vigne) (Schéma 1, cycle 3). Pour obtenir des *S. titanus* capables d'inoculer la vigne, des larves sont mises en acquisition par installation 1 semaine sur des fèves contaminées par la FD (Schéma 1, cycle 2, trajet B). Puis les larves sont à nouveau transférées aux boutures de vigne devant être inoculées (Schéma 1, cycle 1), à partir de la 4ème semaine depuis le début de l'acquisition, période où elles deviennent infectieuses (Schéma 2). Les larves et adultes ont le même régime alimentaire et sont tous utilisables pour les tests de vection, mais on privilégie de jeunes individus afin qu'ils restent en vie suffisamment longtemps après leur passage à l'état infectieux.

Le contrôle visuel ne permet de déceler aucun signe d'infection virale ou phytoplasmique.

### III.1.1.2. Étude de l'état sanitaire du matériel "résistant" par rapport à la présence de virus ou de phytoplasmes latents

Schéma 2 : Inoculation contrôlée de vignes par des larves et jeunes adultes de cicadelles *Scaphoideus titanus*, porteuses du phytoplasme de la FD après acquisition forcée sur des fèves contaminées



#### Recherche de phytoplasmes

Sur le matériel de la série A, 5 feuilles sont récoltées pour chaque lignée. Les nervures sont excisées et l'ADN est extrait par la méthode au CTAB (Boudon-Padieu *et al.*, 2003). La recherche de phytoplasmes est effectuée par amplification en PCR gigogne (nested-polymerase chain reaction) de régions d'ADN ribosomique des phytoplasmes, à l'aide des amorces P1/P7 pour la première amplification, et U5/U3 pour la seconde amplification (Boudon-Padieu *et al.*, 2003). Ces amorces sont dites "universelles", car elles permettent d'amplifier un fragment de l'ADN ribosomique d'environ 800 bp chez tous les phytoplasmes connus.

Deux répétitions complètes de ces tests ont été réalisées sur tous les individus de la série A. Aucun phytoplasme n'a été détecté dans aucun échantillon.

#### Recherche de virus :

##### Recherche de virus par méthode ELISA

Des antisérums nous ont été fournis par le Laboratoire de virologie de la vigne de l'INRA de Colmar. Les virus recherchés sont en priorité des virus connus pour ne pas induire des symptômes visibles dans certaines situations, en particulier chez les vignes jeunes. Ainsi, les virus 1 et 3 de l'enroulement, dont on peut supposer qu'ils induiraient des symptômes visibles, ne sont pas recherchés dans un premier temps.

Les antisérums sont spécifiques pour les virus suivants.

- Népovirus associés aux maladies de dégénérescence: GFLV, ArMV, TBRV (un sérotype)
- Virus associés à l'enroulement : GLRaV-2
- Virus de la marbrure : GFkV
- Virus associé aux cannelures : GVA

Pour chaque virus, un antisérum polyclonal et un conjugué biotinylé sont disponibles.

5 grammes de feuille de chaque lignée de la série A sont soumis à l'extraction de protéines virales qui sont ensuite testées (3 puits ELISA par échantillon) pour chacun des virus ci-dessus.

#### Recherche de virus par indexage

La présence de virus associé au corky bark est recherchée par indexage des individus "résistants" SA(X) avec des greffons de LN33. Deux individus par lignée sont indexés.

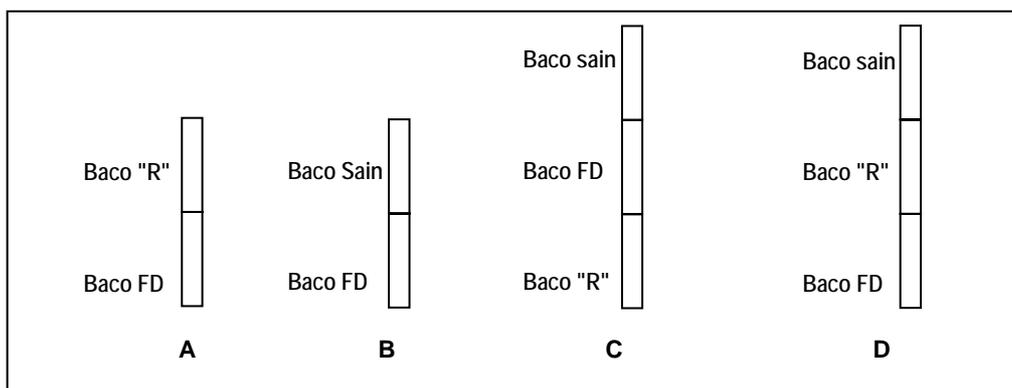
A ce jour nous n'avons aucun résultat indiquant la présence d'aucun des virus recherchés dans les lignées "résistantes".

#### III.1.1.3. Etude de la sensibilité à la FD des lignées de matériel "résistant"

L'inoculation de boutures "résistantes" à l'aide de cicadelles *S. titanus* rendues infectieuses par acquisition contrôlée de phytoplasmes de la FD, est réalisée sur des lots de 5 individus de la même lignée "résistante" SA et de 5 individus de Baco 22A sains comme témoins. Ces boutures sont placées dans une cage d'élevage de *S. titanus*, rendues infectieuses par pâturage pendant 3-4 semaines sur des fèves infectées par la FD. L'exposition des boutures de vigne à l'inoculation dure 2 semaines, puis les vignes sont retirées des cages, toutes précautions étant prises pour s'assurer de ne pas libérer de cicadelles. Les vignes sont ensuite installées en serre où l'expression de symptômes est observée. Cette dernière peut demander plusieurs mois. Si les symptômes ne s'expriment pas au cours d'une première période d'observation de 6-à 8 semaines, on provoque une dormance artificielle par arrêt de l'arrosage en conditions de température modérée. En effet, en conditions du champ, les symptômes de FD ne s'expriment le plus souvent que la 2<sup>ème</sup> année de l'inoculation, après un passage de la plante par la dormance hivernale. Il est donc parfois nécessaire de passer par un état de dormance avant d'observer les symptômes sur des vignes inoculées.

Les premières lignées inoculées sont en cours d'observation de symptômes. D'autres lignées sont en cours d'inoculation. Si des individus "résistants" sont confirmés, ils seront multipliés. Les individus fils seront soumis à de nouveaux essais d'inoculation par cicadelle ainsi que par greffage sur Baco FD (Schéma 3, A et B). Il sera recherché si cette "résistance" est transmissible par la greffe (Schéma 3, C et D).

Schéma 3. Vérification de la résistance à l'inoculation par la greffe et essai de transmission de la protection par greffe à étage



#### III.1.1.4. Essais de protection de plantes herbacées contre les phytoplasmes par des éliciteurs de réaction de défense

Des essais de protection contre les phytoplasmes par l'application d'éliciteurs chimiques ou biochimiques ont été entrepris. En effet, des résultats probants ont été obtenus précédemment chez le tabac infecté par le stolbur, par l'application d'élicitines (Lherminier *et al.*, 2003). Cependant les élicitines ne sont efficaces que sur les solanacées. Nous nous sommes donc tournés vers d'autres éliciteurs à large spectre. Une première molécule, l'acide  $\beta$ -amino-butérique (BABA), qui a élicité des protections notables contre divers agents pathogènes épiphytes et sur différentes cultures, dont la vigne (COHEN *et al.*, 1999) a été appliquée à des pervenches de Madagascar (*Catharanthus roseus*). Cette plante convient

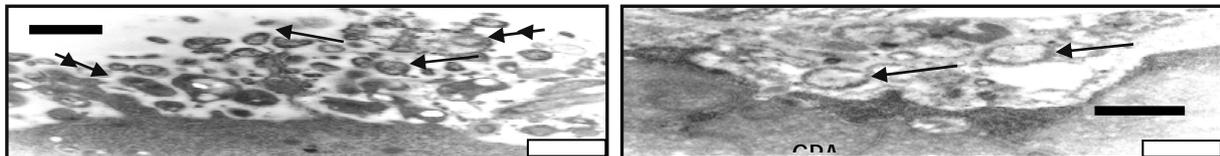
particulièrement bien à la transmission de phytoplasmes par la greffe et elle exprime des symptômes de phytoplasme assez rapidement (1 à 2 mois).

Des jeunes pervenches de semis ont été traitées par pulvérisation avec une solution de BABA et greffées 3 jours plus tard avec des greffons contaminés par la FD, ou avec des greffons sains comme témoins. Cinq plantes par condition ont été utilisées. Trois concentrations de BABA ont été appliquées (0,1 g/L; 0,5 g/L; 2 g/L) et un lot n'a pas été traité.

Les observations de symptômes ont été irrégulières dans le lot témoin non traité, sans doute parce que l'inoculation par greffe est difficile à standardiser. Ces résultats rendent incertains les effets de protection apparente observés dans certaines combinaisons.

Un nouveau protocole est mis en place sur des fèves inoculées par des cicadelles, pour lesquelles près de 100% de symptômes sont régulièrement obtenus. Toutefois, le choix s'était d'abord porté sur la pervenche de Madagascar car un inconvénient de la fève est la faible durée de son cycle végétatif, qui ne permet pas d'observer des effets retardés.

### III.1.2. Bases de la transmission spécifique du phytoplasme de la FD par la cicadelle vectrice



**Figure 1. Processus de pénétration des phytoplasmes dans les glandes salivaires d'une cicadelle vectrice.**

Le trajet du phytoplasme dans le corps de l'insecte a été étudié sur différents modèles. L'une des approches les plus achevées a été obtenue sur la cicadelle *Euscelidius variegatus* et le schéma de transmission contrôlée du phytoplasme de la FD (Boudon-Padiou *et al.*, 1989; Lefol *et al.*, 1993, 1994). Plusieurs des conclusions obtenues sur ce modèle ont été confirmées pour *S. titanus* et la FD : la pénétration des glandes salivaires est le dernier élément clé de la transmissibilité; des systèmes de reconnaissance cellulaires peuvent être invoqués (Lefol *et al.*, 1993). Cette pénétration se réalise aux environs de la 4<sup>ème</sup> semaine suivant la mise en acquisition; c'est un phénomène actif au cours duquel les phytoplasmes sont internalisés dans des vacuoles d'endocytose par des cellules sécrétrices de la salive (acinus des glandes salivaires antérieures principales (GPA)). La figure 1 (A et B) (Guegneau et Lherminier, non publié) montre deux événements successifs de ce processus.

La recherche de marqueurs de l'infection des cicadelles s'avère donc cruciale pour étudier et mieux comprendre, d'une part la reconnaissance insecte vecteur-phytoplasme, d'autre part les mécanismes conduisant à l'invasion des cellules de l'insecte par les phytoplasmes.

Au sein des phytoplasmes viticoles, la FD *sensu stricto* appartient au groupe de la Jaunisse de l'orme (16SrV) et est transmise par *S. titanus*. D'autres phytoplasmes viticoles associés à la jaunisse Palatine grapevine yellows (PGY) appartenant au même groupe, ont été identifiés en Allemagne où *S. titanus* ne vit pas (Maixner *et al.*, 2000). Enfin, plusieurs souches de phytoplasmes appartenant au même groupe 16SrV sont des phytoplasmes isolés d'arbres forestiers et d'arbustes, en Amérique, Europe et Asie. La comparaison du génome de ces phytoplasmes ainsi que de leurs principaux antigènes, les protéines membranaires, nous indiqueront si des traits particuliers peuvent être associés à la transmission par la cicadelle *S. titanus*.

Les comparaisons de onze isolats de phytoplasmes du groupe 16SrV, parmi lesquels 4 isolats de FD *sensu stricto* et 3 isolats de PGY, basées sur l'homologie entre un fragment d'ADN génomique non ribosomique et un fragment d'ADN ribosomique, indiquent que les phytoplasmes de la FD appartiennent à un cluster nettement distinct (Angelini *et al.*, 2001; 2003).

Des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre le phytoplasme de la FD (Boudon-Padiou *et al.*, 1989; Seddas *et al.*, 1996) sont utilisés en Western blotting (WB), Far western blotting (FWB) et Far western blotting inverse (FWBI) (Tableau 3) pour tenter de voir si les protéines membranaires majeures du phytoplasme de la FD sont impliquées dans les phénomènes d'attachement du phytoplasme aux

organes de la cicadelle et pour mettre en évidence les sites moléculaires des organes de la cicadelle impliqués dans cette reconnaissance (Desqué, 2003).

Tableau 3. Protocole WB, FWB et FWBI et visualisation potentielle des récepteurs

| Protocole | protéines séparées et transférées           | incubation 1                   | incubation 2      | protéines mises en évidence   |
|-----------|---|--------------------------------|-------------------|---|
| WB        | cicadelles FD (témoins : cicadelles saines) | anticorps anti FD              | /                 | protéines membranaires du phytoplasme – détection directe   |
| FWB       | cicadelles saines                           | suspension de phytoplasmes     | anticorps anti FD | protéines de l'insecte ligand des phytoplasmes - détection indirecte                                    |
| FWBI      | cicadelles FD                               | protéines de cicadelles saines | anticorps anti-FD | par défaut : protéines de phytoplasme impliquées dans l'attachement sur l'insecte : comparaison avec WB |

La révélation en WB des protéines de phytoplasmes permet de caractériser les isolats de FD, de comparer cette caractérisation avec l'arbre de parenté fourni par les comparaisons génomiques et de voir quels sont leurs traits communs et leurs différences

Le FWB peut permettre d'accrocher sur une membrane où les protéines de cicadelles séparées en électrophorèse ont été transférées, des phytoplasmes de FD purifiés, par les sites de reconnaissance phytoplasme – cicadelle.

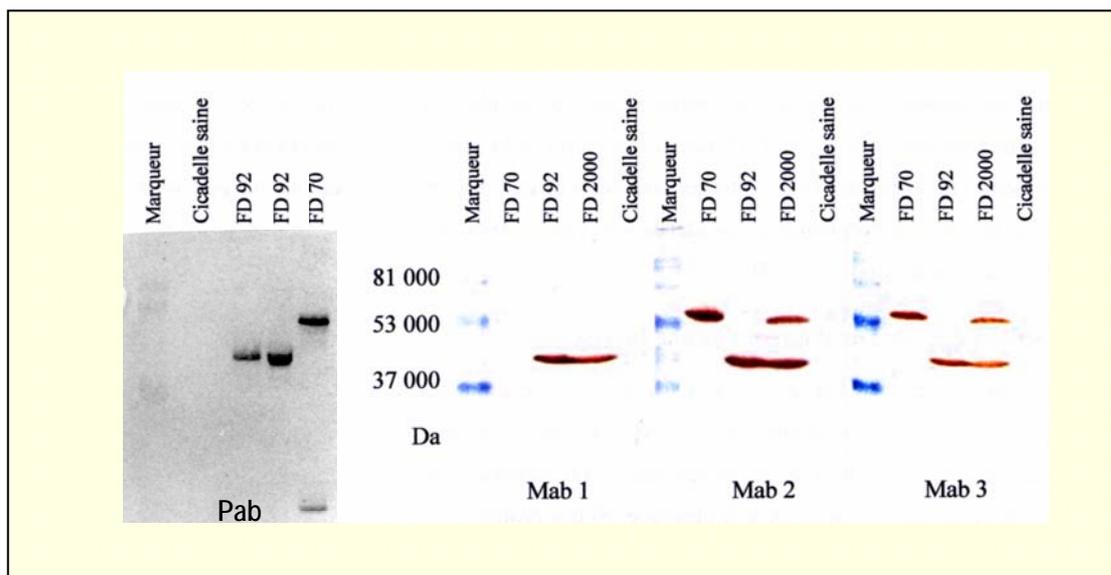
Le FWBI consiste à transférer sur membrane des protéines de cicadelles infectées et à incuber cette membrane avec des protéines de cicadelles saines, puis avec des anticorps anti-phytoplasme FD. Ces derniers ne s'accrocheront pas aux antigènes homologues de phytoplasmes présents sur la membrane si ces derniers contiennent des sites affins aux protéines de cicadelle saine incubées précédemment.

FWB et FWBI peuvent donc permettre de démontrer l'existence d'interactions protéine-protéine (P-P) entre le phytoplasme et les organes de la cicadelle. Les bandes d'intérêt sur les membranes pourront être séparées en électrophorèse 2D et préparative aux fins de caractérisation moléculaire et de recherche de gènes homologues dans le génome du phytoplasme.

Il faut rappeler que les phytoplasmes ne sont pas cultivables et donc l'importance du cycle de production expérimental (Schéma 1, cycle 3) qui permet de multiplier 3 isolats de FD, nommés FD70, FD92 et FD2000).

Les résultats (Desqué, 2003) indiquent en WB une variabilité sérologique entre les trois isolats de phytoplasmes de FD (Figure 2). Le FWB n'a pour l'instant pas permis de montrer l'existence d'interactions P-P. Une concentration insuffisante des extraits de phytoplasmes (qu'il est très difficile d'obtenir à l'état pur) utilisés pour l'incubation des membranes, peut être mise en cause. Par contre, le FWBI a donné des résultats encourageants, indiquant que de telles interactions existent (résultats non illustrés).

Figure 2. Réponse en WB d'anticorps polyclonaux (Pab) et monoclonaux (Mab) anti-FD sur protéines de cicadelles infectées par l'un des 3 isolats de FD entretenus au laboratoire



Les travaux se poursuivent pour optimiser le rendement des différentes techniques de purification des phytoplasmes et la sensibilité du marquage en favorisant les interactions, pour cribler de nouveaux anticorps d'intérêt et pour appliquer ces méthodes à des séparations de protéines en 2D.

### III.2 - Enquête sur la situation et l'évolution dans les vignobles en agrobiologie, (ITAB)

#### 1<sup>ère</sup> Enquête sur les vignobles certifiés en zones de traitements obligatoires

Un premier questionnaire a été envoyé à tous les viticulteurs biologiques certifiés<sup>2</sup> des régions Languedoc-Roussillon et Aquitaine et inclus dans les zones de traitements obligatoires. Il portait sur des critères généraux : âge des vignes, cépages et porte-greffes, origine des plants, taille de l'exploitation, type de parcellaire, historique de la maladie dans l'environnement et sur le domaine, présence de cicadelles, traitements insecticides... Sur les 114 questionnaires envoyés, seulement une vingtaine a été retournée en Languedoc –Roussillon et 15 sur 94 en Aquitaine. Ce taux de retour très faible n'a pas permis d'obtenir tous les résultats escomptés, et notamment de savoir si la fréquence d'apparition de la maladie chez les agrobiologistes est la même que chez les conventionnels. Ce premier sondage a surtout permis de retenir un certain nombre d'exploitations intéressantes pour réaliser une étude plus approfondie.

#### 2<sup>ème</sup> enquête : Etude approfondie de quelques vignobles

L'objectif de cette partie était de dégager d'éventuelles corrélations, et donc des pistes de recherche, entre la présence ou non des cicadelles et/ou de la maladie, et des facteurs environnementaux. Sept exploitations cultivées en agriculture biologique depuis 5 ans<sup>3</sup> ou plus et sur lesquelles la flavescence dorée est ou a été présente ont été sélectionnées, soit un total de vingt parcelles. Des données générales : travail du sol, fertilisation, traitements phytosanitaires, état sanitaire, rendements, mais surtout des données environnementales : exposition au vent et au soleil, présence de talus, haies, bois, points d'eau, friches viticoles, proximité de foyers de flavescence, ont été soigneusement répertoriés parcelle par parcelle. L'étude effectuée l'année suivante en Aquitaine, s'est appuyée sur les résultats de

<sup>2</sup> Nous avons choisi de ne travailler qu'avec des vignobles certifiés biologiques et d'exclure les vignobles en conversion car on considère que les effets des traitements insecticides chimiques antérieurs peuvent se faire encore sentir pendant la période de conversion et donc influencer certains résultats, notamment l'abondance des cicadelles sur les parcelles

<sup>3</sup> Pour la même raison que dans la note précédente l'étude approfondie ne se fait que dans des vignobles en cultures biologiques depuis plus de 5 ans afin que l'influence de traitements chimiques notamment insecticides ne puissent pas se faire sentir.

l'année précédente le questionnaire était donc plus ciblés sur les facteurs considérés comme les plus importants (l'état de la maladie, les populations de cicadelle, le niveau de lutte (traitements d'hiver, prophylaxie et traitements roténone), la topographie, l'humidité, la densité de végétation environnante). Cette deuxième enquête se fait sur les vignobles touchés par la maladie ainsi que sur les vignobles proches de foyers et ceux dont les parcelles sont suivies par un technicien pour le comptage des cicadelles. En effet, contrairement au Languedoc-Roussillon, le nombre de vignoble biologique touché par la maladie est très restreint.

### III.3 - Lutte contre la cicadelle de la flavescence dorée (ITV et GRAB/ITAB)

L'expérimentation concernant les différents points de cette partie, est réalisée à partir de méthodes validées telles la CEB n° 147, pour l'étude de l'efficacité des insecticides au vignoble (aussi bien pour les essais réalisés par l'ITV que ceux réalisés par le GRAB), et la CEB n° 167, pour apprécier l'effet non intentionnel des insecticides sur les acariens prédateurs (typhlodromes).

#### III.3.1 – Optimisation de l'efficacité de la Roténone

Pour l'ensemble des essais conduits le Roténobiol à la dose de 3 l/ha a été utilisé, car c'est le seul produit commercial à avoir une homologation (Cf. Index phytosanitaire ACTA). Une comparaison avec un produit de référence<sup>4</sup> Dursban 2 à la dose de 1,250 l/ha ou Karaté vert à la dose de 0,250 l/ha, est systématiquement réalisée dans tous les essais ITV. De ces deux insecticides neurotoxiques, c'est le Karaté vert qui est retenu comme référence dans la nouvelle méthode CEB n° 147. Tous les traitements sont réalisés face par face, sur la base de 100 litres de bouillie par hectare pour les essais ITV et de 120l/ha pour les essais GRAB, avec un pulvérisateur pneumatique à dos. Tous les essais ont été conduits comme préconisé par la méthode, c'est-à-dire un dispositif en blocs à quatre répétitions, dont les parcelles élémentaires sont de trois rangs de 15 à 20 ceps.

Le « témoin » non traité est le plus souvent constitué de deux rangs de part et d'autre du dispositif, afin de mieux cerner une éventuelle hétérogénéité.

Les contrôles réalisés sur les rangs centraux de chacune des parcelles, portent sur le nombre de larves présentes sur 50 feuilles observées (face inférieure), dans le tiers basal des pousses à raison de 5 feuilles par cep. Pour le témoin, le nombre de feuilles passe à 200.

Quatre contrôles successifs sont réalisés après le ou les traitements, soit T + 3, T + 7, T + 14 et T + 21 jours, pour connaître l'effet choc, ainsi que la rémanence des produits ou des modalités à l'étude.

#### ***Approche sur le positionnement de la Roténone (ITV et GRAB/ITAB)***

Le vecteur de la Flavescence dorée, *S. titanus*, n'a qu'une génération par an. Les œufs d'hiver, pondus l'année précédente par les femelles, courant août-septembre, commencent à éclore début mai. Cette éclosion se poursuit jusqu'en juin (Cf. Graphiques n° 1 et n° 2 pour les essais ITV et n°3 pour l'essai GRAB) tant qu'il y a présence de L1. La recherche (INRA) a clairement montré que les larves sont potentiellement vectrices dès qu'elles atteignent l'âge de 30 jours. Il est donc indispensable d'éliminer les larves avant qu'elles n'arrivent jusqu'à cet âge, pour éviter toute contamination nouvelle au vignoble. Ainsi, pour une larve née sur un pied malade, cela veut dire qu'elle sera infectieuse grosso modo au moment de sa troisième mue larvaire (passage au stade L4). Il faut donc positionner le traitement de façon à ce qu'il agisse avant ce moment là, mais aussi de façon à ce qu'il tue le plus de larves possibles (il ne sert à rien étant donné la faible rémanence du produit de traiter dès l'apparition des larves). Or, la roténone semble ne pas agir immédiatement, mais avoir une certaine latence. Ceci pourrait être dû à son mode d'action : les substances inhibitrices de la respiration cellulaire mettent plus de temps à agir que les neurotoxiques. Cet effet retardé par rapport à l'application n'est pas lié à la rémanence du produit, mais au temps de transfert du principe actif jusqu'à sa cible. Dans ce cas, il devient nécessaire de traiter encore plus tôt. Les essais réalisés par le CIVAM Viticole de Corse et l'ITV d'Orange en 2001 montrent

---

<sup>4</sup> Pour les essais du GRAB il n'y a pas de référence chimique, seulement un témoin non traité

que le plein effet du produit à lieu 8 jours après application.

Les deux graphiques montrent, avec un décalage suivant l'année (2003 étant très chaude et donc beaucoup plus précoce que 2002) que 30 jours après le début des éclosions, nous observons les premiers stades L3 (vers le 15 juin en 2002 et le 5 juin en 2003) soit au stade phénologique correspondant au début nouaison des grappes, le stade J. Les observations réalisées en 2001, vont également dans ce sens. Ce stade, facilement identifiable par le viticulteur, ne doit donc pas être dépassé pour réaliser la première intervention. Fort de ce constat, tous les essais mis en œuvre ont été bâtis avec au moins une intervention à ce stade pour la Roténone et systématiquement à ce stade pour la référence neurotoxique s'il y a lieu. Pour les différentes modalités mettant en œuvre plusieurs traitements Roténone ou autres insecticides, les traitements supplémentaires sont positionnés soit avant J, soit après J, dans des intervalles de 7 à 8 jours.

### **Approche sur l'augmentation de l'efficacité de la Roténone (ITV)**

Il s'agit dans ce cas, de tenter d'accroître l'efficacité du Roténobiol, soit en ajoutant à la bouillie des adjuvants ; deux ont été testés, il s'agit de Héliosol à la dose de 1,00 l/ha et de Abion E à la dose de 0,20 l/hl de bouillie, soit 0,20 l/ha dans nos essais, soit en positionnant au mieux la ou les interventions de Roténobiol, dans la plage décrite ci-dessus.

### **Etude du caractère photosensible de la roténone (GRAB/ITAB)**

Il est couramment évoqué que la roténone est dégradée par la lumière du soleil. La formule de la molécule laisse supposer une sensibilité aux ultraviolets, ce qui a amené l'entreprise commercialisant le produit à préconiser plutôt l'application le soir, toutefois, nous n'avons pas trouvé de références à des expérimentations au champ sur cette propriété. Nous avons donc étudié ce qu'il en est en comparant l'effet d'applications le matin et le soir.

### **III.3.2 – Test d'autres insecticides pouvant présenter autorisés en AB mais non homologués en France**

Le pyrèthre est comme la roténone un insecticide naturel connu depuis longtemps. Le pyrèthre extrait de *Chrysanthemum* est un mélange de plusieurs molécules (pyréthrine I et II, cinérine I et II, jasmoline I et II) de toxicités différentes, les plus actifs étant la pyréthrine I et la cinérine I. Tous ces composés agissent sur la transmission de l'influx nerveux, ce qui explique l'effet « knock-down » important du pyrèthre. Le pyrèthre est considéré comme inoffensif pour les mammifères, bien que des phénomènes d'allergies puissent se produire, d'où les précautions à prendre par l'utilisateur. Sa DL50 chez le rat vaut 584 à 900 mg.kg<sup>-1</sup>, selon l'origine du produit. De plus, il est très sensible au soleil, ce qui fait son atout en agriculture biologique, puisqu'il est très peu rémanent. Mais il demeure toxique pour les poissons et possède un large spectre insecticide, comme beaucoup de molécules d'origine naturelle

Le pyrèthre n'est pas à l'heure actuelle homologué en France dans le cadre de la lutte contre les cicadelles, mais il semble qu'il puisse être une alternative intéressante à l'utilisation de la roténone. Des essais effectués en 2000 par le CIVAM de Corse donnent une efficacité intéressante pour ce produit (95% d'efficacité avec deux traitements). Toutefois, des essais plus anciens effectués notamment par le CIVAM-bio Languedoc Roussillon et le Service de Protection des Végétaux de l'Aude donnent des résultats contradictoires concernant l'efficacité du pyrèthre. Ces essais ont à l'époque été abandonnés car les sociétés (italiennes notamment) commercialisant le pyrèthre ne souhaitaient pas s'engager dans un processus d'homologation en France. Reste que les raisons des différences d'efficacité constatées entre la Corse et le Languedoc Roussillon (où les résultats furent hétérogènes et dans l'ensemble peu intéressants) sont inconnues. S'il s'avérait que le pyrèthre était plus efficace que la roténone, cela pourrait conduire à une homologation du produit, l'homogénéisation des législations européennes aidant.

(Les protocoles sont les mêmes que pour les essais avec la roténone, puisque les essais sont effectués simultanément)

### **III.3.3 - Effet du nombre de traitement sur l'efficacité des insecticides à base de pyrèthre et de roténone (ITV et GRAB/ITAB)**

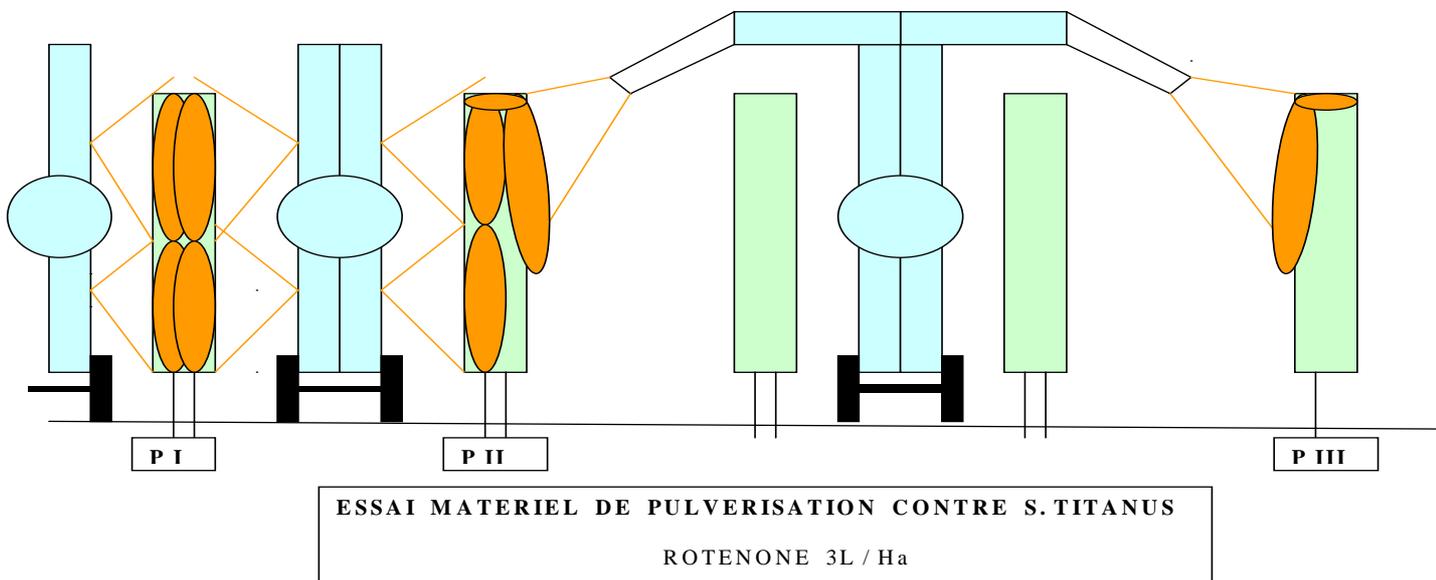
Les Services de Protection des Végétaux, qui supervisent l'application des arrêtés de traitement obligatoire,

imposent trois traitements en zone de lutte obligatoire : l'un fin mai, début juin (grosso modo à l'apparition des L4), le deuxième environ dix jours plus tard (selon la rémanence du produit utilisé), et le dernier en août, visant les adultes. Toutefois, cela est valable pour les insecticides de synthèse, mais pas pour la roténone, pour laquelle cinq traitements sont obligatoires, en raison de son efficacité supposée moindre. Toutefois, ces cinq traitements ne semblent pas tous utiles, puisque les derniers traitements visent les adultes, sur lesquels la roténone n'agit pas ou peu. Ces derniers traitements sont plus semble t-il destinés à rassurer les viticulteurs conventionnels voisins qui estiment parfois que les bios ne prennent pas suffisamment part à la lutte. Deux ou trois traitements bien positionnés sur les stades larvaires pourraient être aussi efficaces. Les efficacités d'un, deux et trois traitements cumulés (pour les essais GRAB) et de deux ou quatre traitements (pour les essais ITV) vont donc être comparés.

### III.3.4 – Conditions pratiques de l'application pour une efficacité optimale

L'objectif est de mesurer l'efficacité pratique d'une lutte contre *S. titanus*, avec un produit insecticide en Agriculture Biologique. Utilisation de la Roténone (Roténobiol) à 3 l/ha avec une application réalisée par le viticulteur avec son pulvérisateur selon trois modalités de mise en œuvre :

- matériel utilisé : TECNOMA pneumatique réglé sur la base de 150 l/ha de bouillie avec 6 diffuseurs,
- date d'application unique au stade L3 des Cicadelles de Scaphoïdeus soit dans cet essai le 11 juin avec à ce stade 42 larves pour 100 feuilles en moyenne sur l'essai avant traitement.
- Modalités comparées :
  - o P1 passage tous les rangs, traitement face par face en utilisant seulement les diffuseurs couvrant la végétation des rangs adjacents, quantité de bouillie mise en œuvre 300 l/ha
  - o P2 passage tous les deux rangs en utilisant tous les diffuseurs, quantité de bouillie mise en œuvre 250 l/ha
  - o P3 traitement de couverture général, passage tous les quatre rangs en utilisant tous les diffuseurs, quantité de bouillie mise en œuvre 150 l/ha.



Différents contrôles par comptage des larves présentes dans la végétation sont réalisés 2, 6, 9, 14 et 20 jours après le traitement.

### III.3.5 – Roténone et Résidus

La méthode concernant le dosage des résidus de Roténone communiquée par le laboratoire de la Société SAMABIOL, a été validée par le laboratoire d'analyses ITV d'Orange. A partir de celle-ci, une expérimentation a été mise en place sur raisins de table, avec pour objectif, de détecter d'éventuels résidus de Roténone sur fruits, par rapport aux délais d'application. Ainsi, il est possible de conjuguer de façon pratique la lutte préconisée contre le ravageur et mesurer les conséquences éventuelles du délai d'application avant récolte et l'accumulation des applications spécifiques sur des raisins à maturité.

Le protocole expérimental adopté sur ce thème, a été le suivant :

- Traitement le 17 juillet (T1) : Roténobiol à la dose de 3 l/ha au moyen d'un pulvérisateur pneumatique sur la base de 100 l/ha de bouillie, passage face par face,
- Prélèvements pour analyse dans la partie traitée et la partie témoin à T1 + 8, T1 + 15 et T1 + 21 jours.

Suite aux premiers résultats obtenus montrant dans tous les cas une teneur inférieure à la LMR retenue et à la DAR admise de 48 heures, une nouvelle application est réalisée (T2) le 18 septembre, avec récolte 24 heures après.

Les échantillons ont été réceptionnés au laboratoire à l'état frais.

| Références échantillons | Références échantillons<br>Laboratoire ITV France | Dates de réception au<br>laboratoire. |
|-------------------------|---|---------------------------------------|
| Témoin                  | 015   | 25/07/02                              |
| Traité T1 + 8 jours     | 016   | 25/07/02                              |
| Témoin                  | 017   | 01/08/02                              |
| Traité T1 + 15 jours    | 018   | 01/08/02                              |
| Témoin                  | 019   | 06/08/02                              |
| Traité T1 + 21 jours    | 020   | 06/08/02                              |
| Témoin                  | 031   | 19/09/02                              |
| Traité T2 + 1 jour      | 032   | 19/09/02                              |

Méthode de stockage : Dès leur réception au laboratoire, les échantillons ont été identifiés, puis stockés et conservés congelés à environ moins 20°C, jusqu'à leur analyse.

Le principe de la méthode utilisée est le suivant : Les résidus de Roténone, éventuellement présents dans les raisins, sont extraits à l'acétone à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax. L'extrait obtenu est évaporé au résidu aqueux, puis purifié sur cartouche Extrélut. La Roténone est éluée avec 100 ml d'hexane. L'extrait purifié obtenu est analysé par chromatographie en phase liquide (H.P.L.C.) avec un détecteur à barrettes de diodes.

La Limite de quantification (L.Q.) est de 0,020 mg/kg de raisins, exprimée en Roténone.

Compte tenu des conditions d'extraction :

Prise d'essai = 25 g

Volume final de reprise = 10 ml d'où R = Rapport d'extraction = 0,4

Le domaine de linéarité défini, va de : 0,050 à 0,500 mg/l de roténone.

### III.3.6 – Roténone et acaracénose

Les acariens prédateurs, sont des arthropodes de plus en plus pris en compte dans le cadre de la protection globale du vignoble, par leur utilité évidente d'une part et par l'équilibre biologique qu'ils représentent d'autre part. Il était donc intéressant de connaître l'effet secondaire sur ces auxiliaires, que peuvent induire la Roténone et le Pyrèthre. Pour ce faire, deux expérimentations ont été conduites en Aquitaine et en Bourgogne par les équipes régionales d'ITV France, sur *Typhlodromus pyri*, l'acarien prédateur le plus connu dans le monde viticole. Le Roténobiol et le Pyrèthre « CAPISCOL » (=CABI-4C) ont été mis en œuvre à Bordeaux, le Roténobiol seul a également été testé en Bourgogne ; les résultats figurent en ANNEXE n°2 et n° 2 bis.

Le détail des protocoles est présenté en annexe

## IV -Principaux Résultats

### IV.1 - Enquête sur la situation et l'évolution dans les vignobles en agrobiologie, (ITAB)

La deux enquêtes l'une menée uniquement sur des vignobles biologiques touchés par la maladie (Languedoc-Roussillon), l'autre plus largement sur des vignobles en zone de traitement obligatoire (Aquitaine) pour essayer de mettre en évidence des liens éventuels entre la présence et/ou l'absence de la maladie et/ou de la cicadelle et des facteurs environnementaux et/ou liés aux itinéraires techniques n'ont pas permis de tirer des conclusions définitives en raison d'échantillonnage insuffisant ce travail permet d'avoir une meilleure connaissance des pratiques des vignerons agrobiologiques, en matière de lutte contre la flavescence dorée et la cicadelle vectrice. A l'issue des stages, des restitutions des résultats des enquêtes a été faits, auprès des vignerons biologiques des régions enquêtées (Languedoc-Roussillon et aquitaine) ce qui a permis de les sensibiliser à l'importance de la rigueur des traitements obligatoires et de l'usage des méthodes prophylactiques.

### IV.2 - Lutte contre la cicadelle de la flavescence dorée (ITV et GRAB/ITAB)

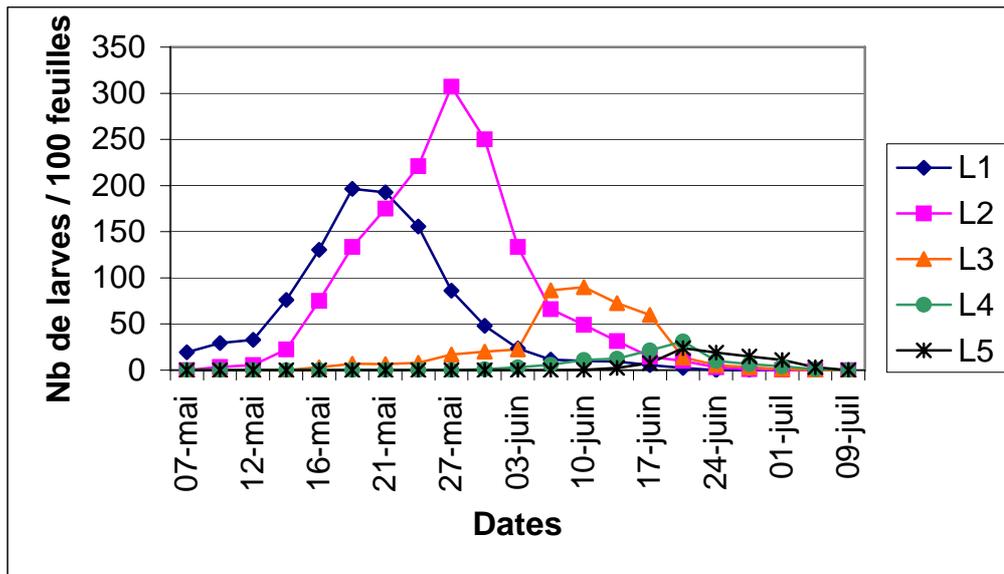
#### IV.2.1 Optimisation de l'efficacité de la roténone

##### **Approche du positionnement de la roténone**

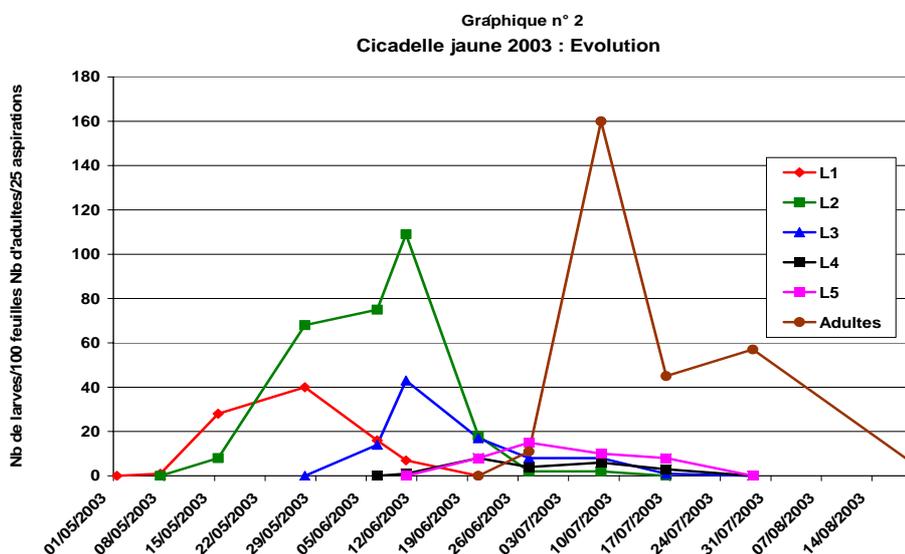
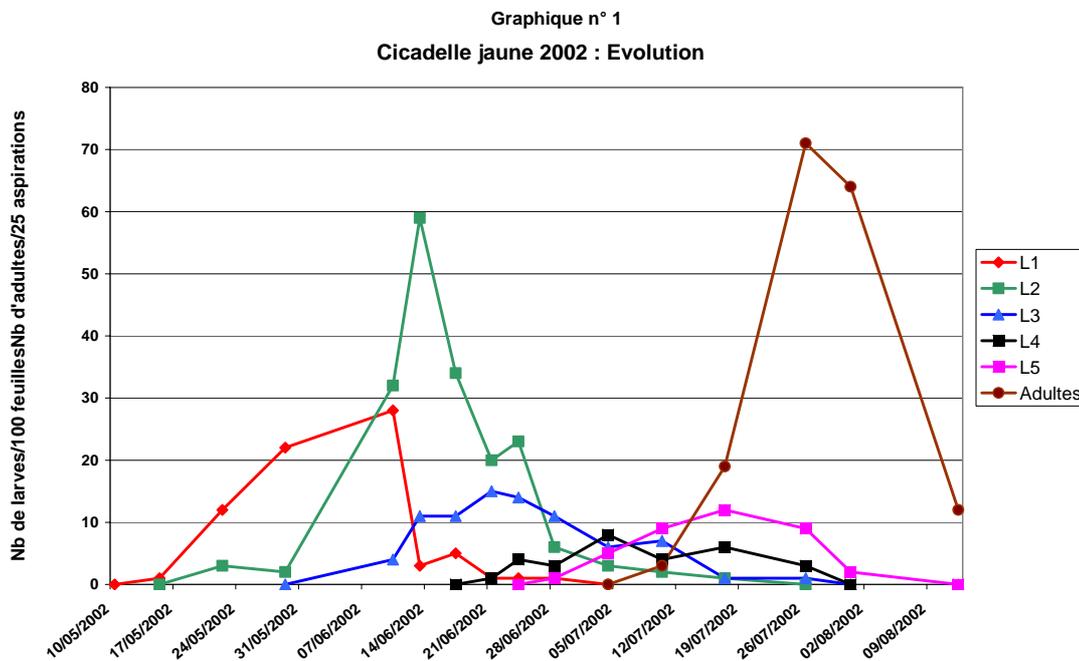
Pour faciliter l'ensemble des travaux à entreprendre, les différentes séries d'essais dont les résultats figurent ci-après, ont pris en compte aussi bien :

- les différentes dates de positionnement,
- les adjuvants,
- les insecticides autres que la Roténone.

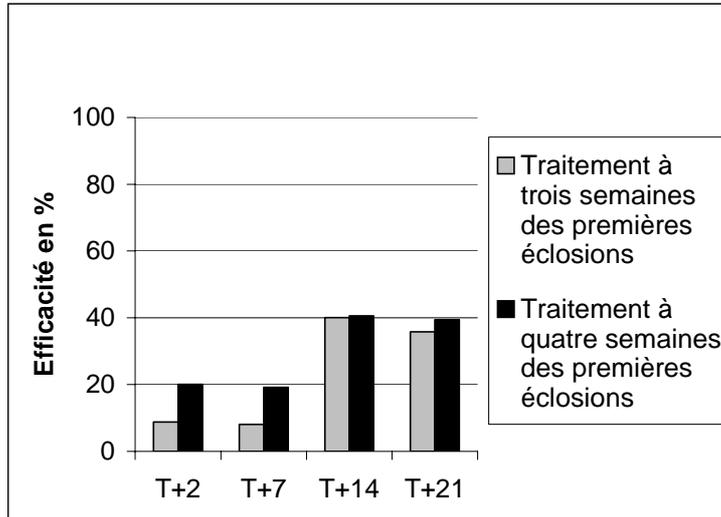




Graphique 3 : Evolution des différents stades larvaires au cours du temps (Les Baux de Provence 2003):



D'après la figure ci-dessous, il semble qu'un traitement plus tardif soit légèrement plus efficace qu'un traitement précoce, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les éclosions continuent après le premier traitement dans le cas d'un traitement précoce, alors qu'une semaine plus tard elles deviennent plus sporadiques. Toutefois, cette différence est minime et de toute façon non significative. Ainsi, étant donné le mode d'action de la roténone, le fait que la différence soit faible nous permet de préconiser un traitement plus précoce, pour éviter la dissémination de cicadelles potentiellement infectieuses. Evidemment, la faible efficacité de la roténone tempère l'intérêt de ce résultat.



Comparaison des effets des traitements à deux dates différentes (Les Baux de Provence 2002)

#### Effets de l'ajout d'un adjuvant (ITV)

Etude de l'efficacité du Roténobiol, appliqué une fois (T) ou deux fois (T et T + 8 jours), avec ou sans adjuvants. T correspond au tout début nouaison des grappes.

#### Contrôle à T + 3 jours : Nombre de larves pour 100 feuilles

| Modalités                          | Doses                         | Nombre de larves pour 100 feuilles | % d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------------------------------|
| Dursban 2 (Réf)                    | 1,25 l/ha                     | 3,50                               | 90,50 %        | B                                    |
| Roténobiol à T                     | 3,00 l/ha                     | 24,00                              | 35,00 %        | A                                    |
| Roténobiol à T + Héliosol          | 3,00 l/ha + 1,00 l/ha         | 24,00                              | 35,00 %        | A                                    |
| Roténobiol à T + Abion E           | 3,00 l/ha + 0,20 l/ha         | 25,00                              | 32,50 %        | A                                    |
| Roténobiol à T et T + 8            | 3,00 l/ha x 2                 | 24,00                              | 35,00 %        | A                                    |
| Roténobiol à T et T + 8 + Héliosol | 3,00 l/ha x 2 + 1,00 l/ha x 2 | 23,00                              | 37,80 %        | A                                    |
| Roténobiol à T et T + 8 + Abion E  | 3,00 l/ha x 2 + 0,20 l/ha x 2 | 24,00                              | 35,00 %        | A                                    |
| Témoin                             |                               | 37 larves pour 100 feuilles        |                |                                      |

Le traitement à T + 8 n'est pas encore réalisé.

#### Contrôle à T + 7 jours : Nombre de larves pour 100 feuilles

| Modalités                          | Doses                         | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 %N et K |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Dursban 2 (Réf)                    | 1,25 l/ha                     | 2,50                               | 93,00 %                  | B                                   |
| Roténobiol à T                     | 3,00 l/ha                     | 8,50                               | 76,30 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T + Héliosol          | 3,00 l/ha + 1,00 l/ha         | 9,50                               | 73,60 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T + Abion E           | 3,00 l/ha + 0,20 l/ha         | 8,50                               | 76,30 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T et T + 8            | 3,00 l/ha x 2                 | 9,30                               | 74,00 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T et T + 8 + Héliosol | 3,00 l/ha x 2 + 1,00 l/ha x 2 | 9,00                               | 75,00 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T et T + 8 + Abion E  | 3,00 l/ha x 2 + 0,20 l/ha x 2 | 9,50                               | 73,60 %                  | A                                   |
| Témoin                             | 36 larves pour 100 feuilles   |                                    |                          |                                     |

Le traitement à T + 8 n'est pas encore réalisé.

#### Contrôle à T + 10 jours : Nombre de larves pour 100 feuilles

| Modalités                          | Doses                         | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 %N et K |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Dursban 2 (Réf)                    | 1,25 l/ha                     | 1,00                               | 97,00 %                  | B                                   |
| Roténobiol à T                     | 3,00 l/ha                     | 8,00                               | 77,00 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T + Héliosol          | 3,00 l/ha + 1,00 l/ha         | 8,40                               | 76,00 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T + Abion E           | 3,00 l/ha + 0,20 l/ha         | 8,50                               | 75,70 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T et T + 8            | 3,00 l/ha x 2                 | 8,40                               | 76,00 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T et T + 8 + Héliosol | 3,00 l/ha x 2 + 1,00 l/ha x 2 | 8,60                               | 75,40 %                  | A                                   |
| Roténobiol à T et T + 8 + Abion E  | 3,00 l/ha x 2 + 0,20 l/ha x 2 | 8,20                               | 76,50 %                  | A                                   |
| Témoin                             | 35 larves pour 100 feuilles   |                                    |                          |                                     |

Le traitement à T + 8 est réalisé depuis 3 jours.

#### Contrôle à T + 14 jours : Nombre de larves pour 100 feuilles

| Modalités                          | Doses                         | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Dursban 2 (Réf)                    | 1,25 l/ha                     | 1,30                               | 95,00 %                  | C                                    |
| Roténobiol à T                     | 3,00 l/ha                     | 6,10                               | 77,40 %                  | A                                    |
| Roténobiol à T + Héliosol          | 3,00 l/ha + 1,00 l/ha         | 6,00                               | 77,80 %                  | A                                    |
| Roténobiol à T + Abion E           | 3,00 l/ha + 0,20 l/ha         | 6,20                               | 77,00 %                  | A                                    |
| Roténobiol à T et T + 8            | 3,00 l/ha x 2                 | 4,00                               | 85,00 %                  | A B                                  |
| Roténobiol à T et T + 8 + Héliosol | 3,00 l/ha x 2 + 1,00 l/ha x 2 | 4,50                               | 83,00 %                  | A B                                  |
| Roténobiol à T et T + 8 + Abion E  | 3,00 l/ha x 2 + 0,20 l/ha x 2 | 3,50                               | 87,00 %                  | B                                    |

|        |                             |
|--------|-----------------------------|
| Témoin | 27 larves pour 100 feuilles |
|--------|-----------------------------|

Le traitement à T + 8 est réalisé depuis 7 jours.

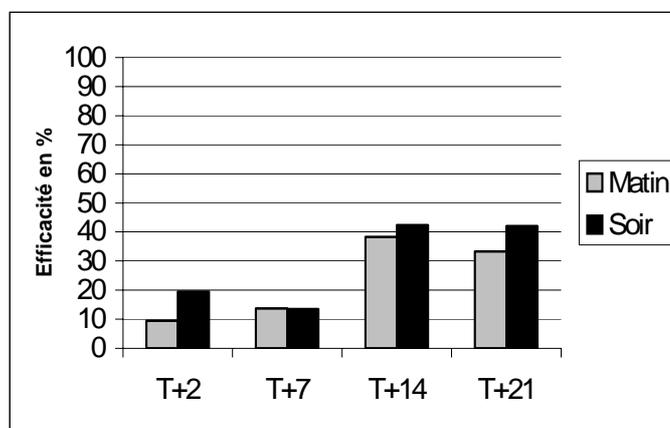
#### Contrôle à T + 21 jours : Nombre de larves pour 100 feuilles

| Modalités                          | Doses                            | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Dursban 2 (Réf)                    | 1,25 l/ha                        | 1,60                               | 93,80 %                  | B                                    |
| Roténobiol à T                     | 3,00 l/ha                        | 6,20                               | 76,00 %                  | A                                    |
| Roténobiol à T + Héliosol          | 3,00 l/ha +<br>1,00 l/ha         | 6,30                               | 75,80 %                  | A                                    |
| Roténobiol à T + Abion E           | 3,00 l/ha +<br>0,20 l/ha         | 6,00                               | 77,00 %                  | A                                    |
| Roténobiol à T et T + 8            | 3,00 l/ha x 2                    | 3,80                               | 85,40 %                  | A B                                  |
| Roténobiol à T et T + 8 + Héliosol | 3,00 l/ha x 2 +<br>1,00 l/ha x 2 | 4,00                               | 84,60 %                  | A B                                  |
| Roténobiol à T et T + 8 + Abion E  | 3,00 l/ha x 2 +<br>0,20 l/ha x 2 | 3,70                               | 85,80 %                  | A B                                  |
| Témoin                             |                                  | 26 larves pour 100 feuilles        |                          |                                      |

Le traitement à T + 8 est réalisé depuis 14 jours.

#### Etude du caractère photosensible de la roténone (GRAB/ITAB)

Il n'y a aucune différence entre les traitements matin et soir, ce que confirme l'analyse de variance. Il semble donc que la photosensibilité de la molécule de roténone soit trop faible pour avoir une influence quelconque sur l'efficacité au vignoble : la roténone pourrait avoir atteint sa cible avant sa dégradation par la lumière.



#### IV.2.2 Test d'autres insecticides autorisés en agriculture biologique mais non homologués en France

Etude de l'efficacité de la Roténone et du Pyrèthre naturel = Piréthro<sup>5</sup> appliqué une fois ou deux fois, comparés au Biophytoz L2<sup>6</sup> et au Karaté vert, appliqués une fois. Le Karaté vert étant la référence de la méthode CEB n° 147.

Le traitement T1 étant appliqué au stade début nouaison le 15/06/02, le traitement T2 étant positionné à T1 + 8 jours. Les contrôles commencent à T1 + 3 jours sur toutes les modalités plus le témoin.

<sup>5</sup> Non homologué au vignoble en France

<sup>6</sup> Association de Roténone (30 g/l) + Pyrèthres (15 g/l) + Butoxyde de pipéronyle, produit non homologué au vignoble.

**Contrôle à T +3**

| Modalités          | Doses                       | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert T1     | 0,250 l/ha                  | 2                                  | 96 %                     | B                                    |
| Roténobiol T1      | 3,00 l/ha                   | 24                                 | 55 %                     | A                                    |
| Roténobiol T1 + T2 | 3,00 l/ha                   | 32                                 | 41 %                     | A                                    |
| Piréthro T1        | 1,50 l/ha                   | 15                                 | 72 %                     | A                                    |
| Piréthro T1 + T2   | 1,50 l/ha                   | 23                                 | 57 %                     | A                                    |
| Biophytoz T1       | 3,00 l/ha                   | 21                                 | 61 %                     | A                                    |
| Témoin             | 54 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

**Contrôle à T +7**

| Modalités          | Doses                       | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert T1     | 0,250 l/ha                  | 1                                  | 98 %                     | B                                    |
| Roténobiol T1      | 3,00 l/ha                   | 11                                 | 71 %                     | A                                    |
| Roténobiol T1 + T2 | 3,00 l/ha                   | 13                                 | 65 %                     | A                                    |
| Piréthro T1        | 1,50 l/ha                   | 11                                 | 71 %                     | A                                    |
| Piréthro T1 + T2   | 1,50 l/ha                   | 13                                 | 65 %                     | A                                    |
| Biophytoz T1       | 3,00 l/ha                   | 7                                  | 81 %                     | A B                                  |
| Témoin             | 38 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

**Contrôle à T +10 (ou T2 + 3)**

| Modalités          | Doses                       | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert T1     | 0,250 l/ha                  | 1                                  | 98 %                     | B                                    |
| Roténobiol T1      | 3,00 l/ha                   | 10                                 | 75 %                     | A                                    |
| Roténobiol T1 + T2 | 3,00 l/ha                   | 9                                  | 78 %                     | A                                    |
| Piréthro T1        | 1,50 l/ha                   | 12                                 | 70 %                     | A                                    |
| Piréthro T1 + T2   | 1,50 l/ha                   | 9                                  | 78 %                     | A                                    |
| Biophytoz T1       | 3,00 l/ha                   | 9                                  | 78 %                     | A                                    |
| Témoin             | 41 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

T2 = date de la deuxième intervention.

**Contrôle à T +14 (ou T2 + 7)**

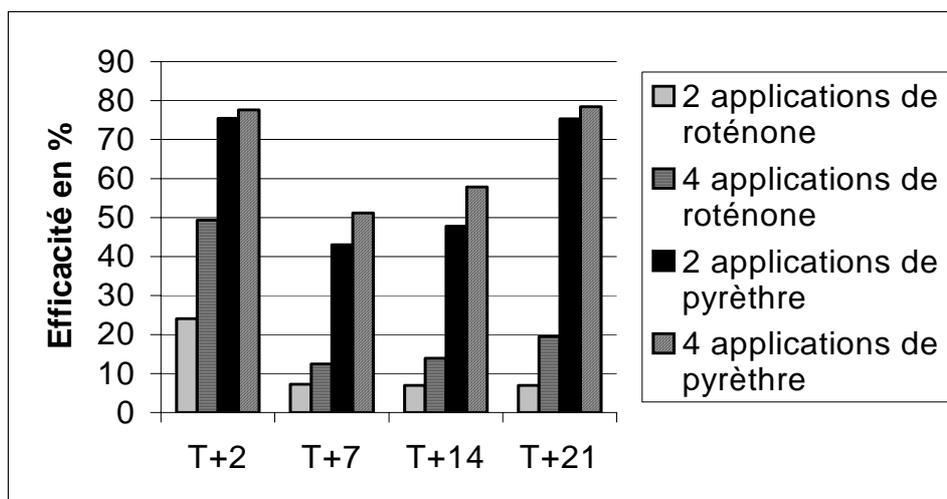
| Modalités          | Doses      | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|--------------------|------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert T1     | 0,250 l/ha | 1                                  | 95 %                     | B                                    |
| Roténobiol T1      | 3,00 l/ha  | 12                                 | 43 %                     | A                                    |
| Roténobiol T1 + T2 | 3,00 l/ha  | 10                                 | 52 %                     | A                                    |
| Piréthro T1        | 1,50 l/ha  | 8                                  | 62 %                     | A                                    |
| Piréthro T1 + T2   | 1,50 l/ha  | 6                                  | 71 %                     | A                                    |

|              |                             |   |      |   |
|--------------|-----------------------------|---|------|---|
| Biophytoz T1 | 3,00 l/ha                   | 9 | 57 % | A |
| Témoin       | 21 larves pour 100 feuilles |   |      |   |

**Contrôle à T +21 (ou T2 + 14)**

| Modalités          | Doses                       | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert T1     | 0,250 l/ha                  | 1                                  | 95 %                     | B                                    |
| Roténobiol T1      | 3,00 l/ha                   | 11                                 | 50 %                     | A                                    |
| Roténobiol T1 + T2 | 3,00 l/ha                   | 11                                 | 50 %                     | A                                    |
| Piréthro T1        | 1,50 l/ha                   | 8                                  | 63 %                     | A                                    |
| Piréthro T1 + T2   | 1,50 l/ha                   | 6                                  | 73 %                     | A                                    |
| Biophytoz T1       | 3,00 l/ha                   | 9                                  | 59 %                     | A                                    |
| Témoin             | 22 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

Les essais du GRAB en 2002 et 2003 ont montré que le pyrèthre est significativement plus efficace que la roténone. Cette différence d'efficacité n'est pas surprenante, étant donné les résultats d'essais précédents (notamment ceux du CIVAM Viticole de Corse). Le pyrèthre semble plus intéressant dans le cadre de la lutte obligatoire contre un insecte vecteur d'une maladie de quarantaine. Il semble en effet difficile d'atteindre l'objectif « zéro cicadelle » avec la roténone, alors que le pyrèthre pourrait avoir une efficacité suffisante.



**IV.3.3 - Effet du nombre de traitement (2 ou 4) sur l'efficacité des insecticides à base de pyrèthre et de roténone (ITV et GRAB/ITAB)**

Etude comparative du Roténobiol et du Piréthro, appliqués deux ou quatre fois dans la phase de l'évolution larvaire de *S. titanus*. Les applications ont été positionnées de la manière suivante :

- 1<sup>er</sup> traitement : tout début floraison (= T1)
- 2<sup>ème</sup> traitement : tout début nouaison (= T2)
- 3<sup>ème</sup> traitement : T2 + 7 jours (= T3)
- 4<sup>ème</sup> traitement : T3 + 7 jours (=T4)

Les deux premiers traitements constituent la modalité à deux applications (Roténobiol x 2 et Piréthro x 2) ; la totalité des interventions représente la modalité à quatre applications (Roténobiol x 4 et Piréthro x 4).

Dans cette même série, ont été ajoutées deux modalités permettant l'évolution d'une nouvelle pyréthrine naturelle, le CAPI-4 C, appliquée soit à T1, (= CAPI x 1), soit à T1 + T2 (=CAPI X 2). Enfin, la référence Karaté vert, positionné une seule fois à T2, a complété le dispositif de cette série.

**Contrôle à T2 + 3 jours (soit 3 jours après la 2<sup>ème</sup> intervention)**

| Modalités      | Doses                        | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|----------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert    | 0,250 l/ha                   | 1                                  | 99,00 %                  | D                                    |
| Roténobiol X 2 | 3,00 l/ha x 2                | 85                                 | 48,50 %                  | A                                    |
| Roténobiol X 4 | 3,00 l/ha x 4                | 64                                 | 61,00 %                  | B                                    |
| Piréthro X 2   | 1,50 l/ha x 2                | 46                                 | 72,00 %                  | C                                    |
| Piréthro X 4   | 1,50 l/ha x 4                | 40                                 | 76,00 %                  | C                                    |
| CAPI X 1       | 1,50 l/ha x 1                | 15                                 | 91,00 %                  | C D                                  |
| CAPI X 2       | 1,50 l/ha x 2                | 14                                 | 91,50 %                  | C D                                  |
| Témoin         | 165 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

**Contrôle à T2 + 7 jours**

| Modalités      | Doses                        | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|----------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert    | 0,250 l/ha                   | 1                                  | 99 %                     | D                                    |
| Roténobiol X 2 | 3,00 l/ha x 2                | 76                                 | 50 %                     | A                                    |
| Roténobiol X 4 | 3,00 l/ha x 4                | 58                                 | 61 %                     | B                                    |
| Piréthro X 2   | 1,50 l/ha x 2                | 49                                 | 66 %                     | B C                                  |
| Piréthro X 4   | 1,50 l/ha x 4                | 39                                 | 73 %                     | B C                                  |
| CAPI X 1       | 1,50 l/ha x 1                | 23                                 | 85 %                     | C                                    |
| CAPI X 2       | 1,50 l/ha x 2                | 19                                 | 87 %                     | C                                    |
| Témoin         | 146 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

**Contrôle à T2 + 14 jours**

| Modalités      | Doses                       | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|----------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert    | 0,250 l/ha                  | 2                                  | 97 %                     | D                                    |
| Roténobiol X 2 | 3,00 l/ha x 2               | 37                                 | 29 %                     | A                                    |
| Roténobiol X 4 | 3,00 l/ha x 4               | 26                                 | 51 %                     | B                                    |
| Piréthro X 2   | 1,50 l/ha x 2               | 30                                 | 43 %                     | B                                    |
| Piréthro X 4   | 1,50 l/ha x 4               | 24                                 | 54 %                     | B                                    |
| CAPI X 1       | 1,50 l/ha x 1               | 10                                 | 81 %                     | C                                    |
| CAPI X 2       | 1,50 l/ha x 2               | 9                                  | 83 %                     | C                                    |
| Témoin         | 52 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

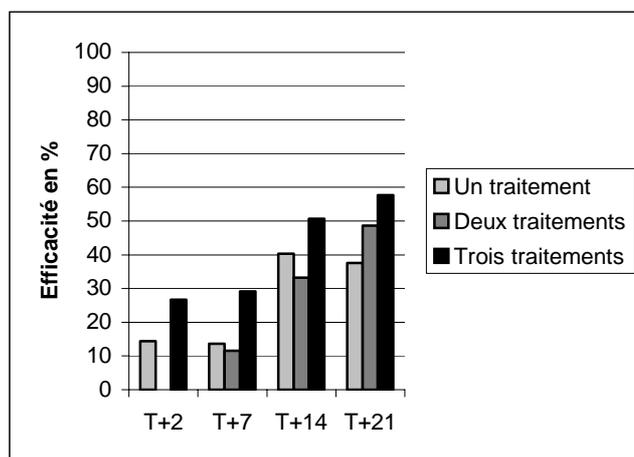
**Contrôle à T2 + 21 jours**

| Modalités      | Doses                       | Nombre de larves pour 100 feuilles | Pourcentage d'efficacité | Signification au seuil de 5 % N et K |
|----------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Karaté vert    | 0,250 l/ha                  | 1                                  | 97 %                     | D                                    |
| Roténobiol X 2 | 3,00 l/ha x 2               | 24                                 | 30 %                     | A                                    |
| Roténobiol X 4 | 3,00 l/ha x 4               | 15                                 | 54 %                     | B                                    |
| Piréthro X 2   | 1,50 l/ha x 2               | 17                                 | 49 %                     | B                                    |
| Piréthro X 4   | 1,50 l/ha x 4               | 13                                 | 61 %                     | B                                    |
| CAPI X 1       | 1,50 l/ha x 1               | 8                                  | 77 %                     | C                                    |
| CAPI X 2       | 1,50 l/ha x 2               | 7                                  | 80 %                     | C                                    |
| Témoin         | 33 larves pour 100 feuilles |                                    |                          |                                      |

Dans les essais menés par le GRAB, on compare les efficacité de 1 à 3 traitements de roténone et de 2 et 4 traitement de Piretro.

Comparaison : délais à partir du premier traitement

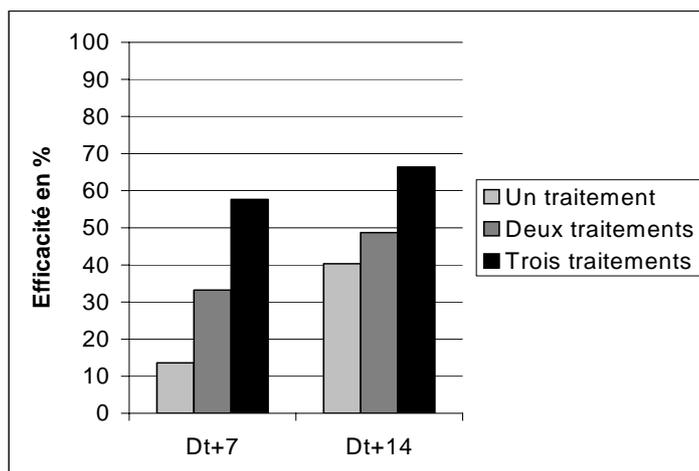
Les efficacités mesurées à partir de la date du premier traitement ne permettent pas de dégager de différences significatives.



Efficacité d'un, deux ou trois traitements (Les Baux de Provence 2002)

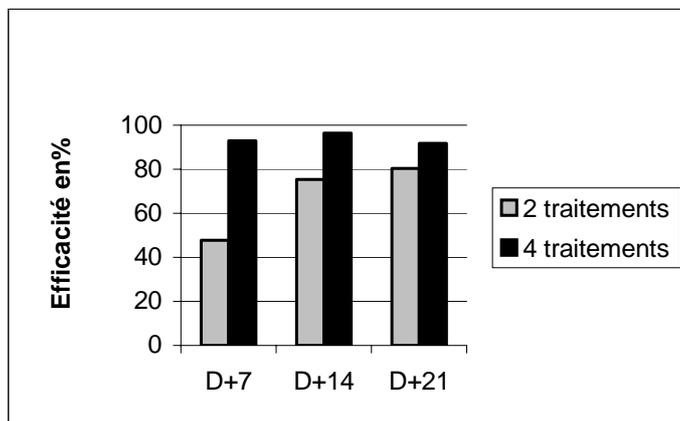
Comparaison : délais à partir du dernier traitement :

Cette deuxième série (délais à partir du dernier traitement) est plus intéressante car elle donne l'efficacité du produit 7 et 14 jours après le dernier traitement de la série, ce qui donne une image de l'efficacité finale de la stratégie employée. Cette fois, la différence entre un, deux ou trois traitements ressort beaucoup plus nettement. On a effectivement dans ce cas une différence significative entre un seul traitement et trois traitements, bien que la modalité «deux traitements» ne soit significativement différente ni de l'une ni de l'autre.

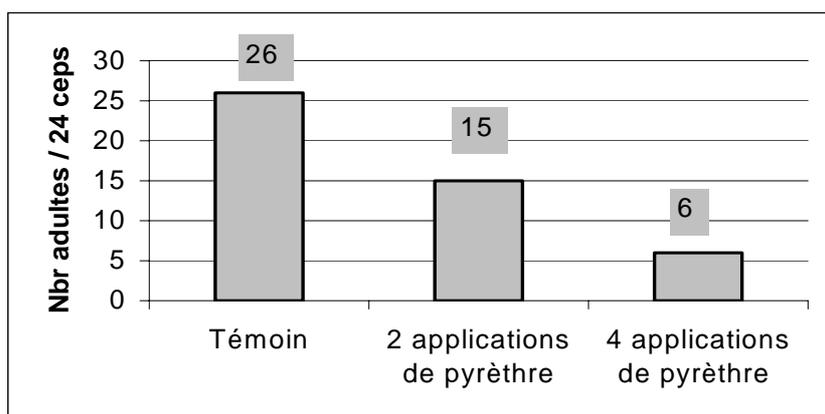


Efficacité d'un, deux ou trois traitements (Les Baux de Provence 2002)

La différence est importante sept jours après le dernier traitement mais elle diminue rapidement et trois semaines après le dernier traitement, la différence n'est plus significative. Cependant, la détermination du nombre d'adultes résiduels au début du mois de juillet laisse apparaître une différence notable compte tenu des objectifs de la lutte obligatoire.



Efficacité entre deux et quatre traitements pyrèthre (Les Baux de Provence 2003 )

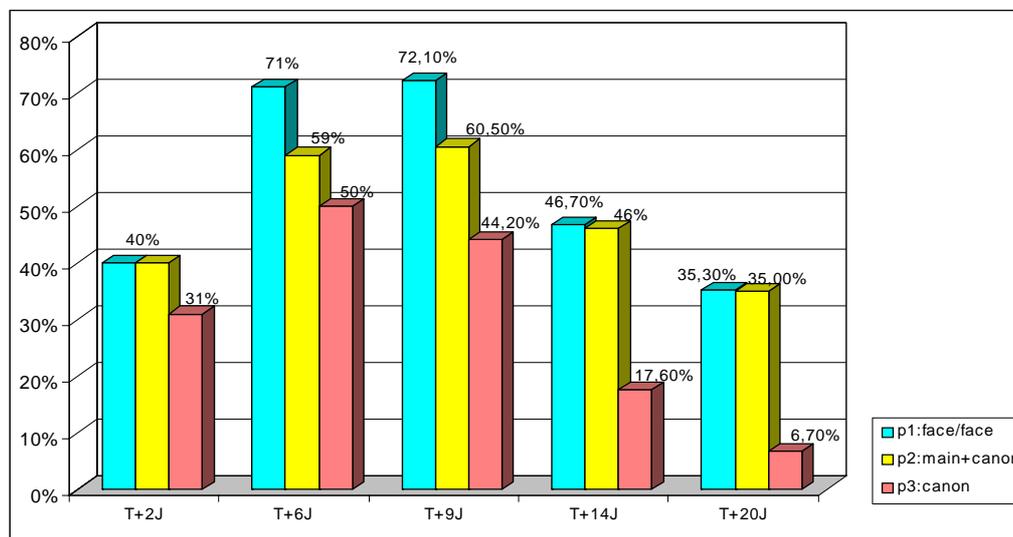


Contrôle d'efficacité sur adultes par aspiration le 10 juillet (Les Baux de Provence 2003 source Grab)

#### IV.3.4 – Conditions pratiques de l'application pour une efficacité optimale

Les résultats obtenus dans le graphique ci-dessous sont exprimés en pourcentage d'efficacité pour les différentes modalités étudiées.

Essai matériel plein champ avec Roténone en % d'efficacité



#### IV.3.5 - Roténone et résidus

Taux de récupération : Des contrôles de validité des résultats ont été réalisés au cours de l'étude, par la détermination de taux de récupération. Un taux ou pourcentage de récupération consiste à effectuer un rajout de la matière active analysée, à une concentration donnée. La valeur retrouvée doit être comprise entre 70 et 110 % de récupération pour être correcte.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Référence échantillons ITV France | Teneur présente exprimée en mg/kg | Teneur rajoutée exprimée en mg/l | Teneur retrouvée exprimée en mg/kg | Pourcentage de récupération |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 019-4                             | < 0,020                           | 0,020                            | 0,0176                             | 88 %                        |
| 019-4                             | < 0,020                           | 0,020                            | 0,018                              | 90 %                        |
| 031-1                             | < 0,020                           | 0,150                            | 0,148                              | 99 %                        |

Teneurs en résidus :

| Référence échantillons (ITV France) | Teneur en Roténone exprimée en mg/kg de raisin |
|-------------------------------------|--|
| 015                                 | < 0,020  |
| 016                                 | < 0,020 (0,016)                                |
| 017                                 | < 0,020  |
| 018                                 | < 0,020 (0,012)                                |
| 019                                 | < 0,020  |
| 020                                 | < 0,020  |

|     |         |
|-----|---------|
| 031 | < 0,020 |
| 032 | 0,182   |

Pour les trois échantillons issus du 1<sup>er</sup> traitement T1 : T1 + 8 ; T1 + 15 et T1 + 21 ; les résultats obtenus sont inférieurs à la Limite de Quantification (0,020 mg/kg) de la méthode. Toutefois, des traces de Roténone ont été décelées dans deux échantillons traités : T1 + 8 et T1 + 15, à des valeurs respectives de 0,016 et 0,012 mg/kg.

Par contre, l'échantillon essai du 2<sup>ème</sup> traitement T2 : T2 + 1 qui correspond à la date de traitement plus 1 jour, présente une teneur en Roténone élevée : 0,182 mg/kg.

On peut donc constater que seulement 8 jours après la date de traitement, la teneur en Roténone diminue fortement. Elle passe en effet de 0,180 à 0,016 mg/kg de raisin. Ceci pourrait être à confirmer dans des études ultérieures.

#### IV.3.6 Roténone et acarocérose (ITV)

Tableau 3 : Série insecticide testée avec 1 application . Evolution du nombre moyen de formes mobiles (N.F.M.) de T.Pyri par lot de 20 feuilles au cours de l'essai – Branne . I.T.V. Bordeaux-Blanquefort – 2003.

| Evolution du nombre moyen de formes mobiles de T. pyri<br>par lot de 20 feuilles au cours de l'essai |                               |                   |                    |                             |                         |
|--|-------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Modalités  |                               |                   |                    |                             |                         |
| Dates  | 1<br>Témoin traité<br>à l'eau | 2<br>Orytis       | 3<br>Roténobiol    | 4<br>Pyrèthre<br>"Capiscol" | Puissance<br>de l'essai |
| NFM à T1-7 j : 18/06<br>Classement   | 344.0                         | 350.4<br>=        | 353.0<br>=         | 350.6<br>=                  | 99 %<br>à priori        |
| NFM à T1+7 j : 2/07<br>Classement<br>P.R.%   | 106.8                         | 10.0<br><<br>9.4  | 103.2<br>=<br>96.6 | 72.4<br>=<br>67.8           | 91 %<br>à posteriori    |
| NFM à T1+21 j : 16/07<br>Classement<br>P.R.%   | 102.6                         | 17.2<br><<br>16.7 | 78.6<br>=<br>76.6  | 77.6<br>=<br>75.6           | 96 %<br>à posteriori    |
| NFM à T1+40 j<br>04/08<br>Classement<br>P.R.%  | 81.2                          | 33.6<br><<br>41.3 | 79.4<br>=<br>97.7  | 75.0<br>=<br>92.3           | 97 %<br>à posteriori    |

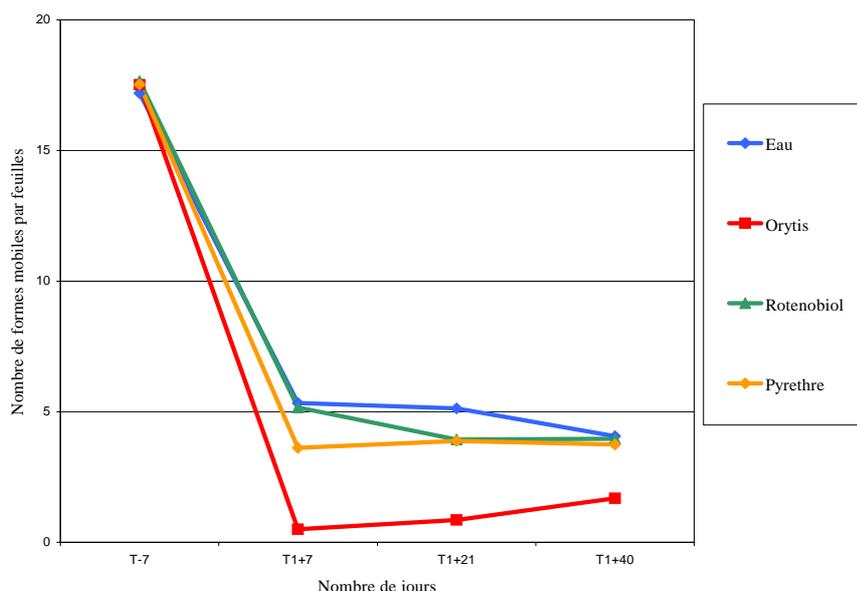
Classement par le test de Dunnet en prenant comme terme de comparaison la référence neutre : eau.

= : pas de différence significative par rapport au témoin

< : le produit est significativement différent du témoin

PR % : population résiduelle en %

L'évolution des densités foliaires de T. pyri est également présentée figure ci-dessous.



La référence toxique Orytis présente un effet de choc marqué 7 jours après le traitement. Les niveaux de population de *T. pyri* sont similaires sur la modalité "Roténobiol" et sur le témoin traité à l'eau. Il n'y a pas de différence significative entre témoin et modalité "Pyrethre", malgré un différentiel de population de 32 %. La puissance a posteriori de l'essai pour ce premier contrôle est relativement élevée (91%).

#### Classement des produits

La puissance de l'essai est supérieure ou égale à 96% jusqu'à la fin des contrôles. A T1+21 jours, seule la modalité Orytis présente une population de *T. pyri* significativement inférieure à celle du témoin (population résiduelle de 17%). Les modalités Roténobiol et Pyrethre "Capiscol" ne présentent pas de différences significatives par rapport au témoin (populations résiduelles de 76 %). Les produits sont donc classés neutres à faiblement toxiques. Lors du comptage suivant, à T1+40 jours, le classement est confirmé. On observe une reconstitution partielle des populations de *T. pyri* sur la modalité "Orytis" (41 %) et pratiquement complète sur les deux autres modalités.

Dans les conditions de cet essai sur *T. pyri* (population de Branne) le classement de la spécialité testée est le suivant :

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| Eau (référence neutre)     | NFT |
| Roténobiol                 | NFT |
| Pyrethre "Capiscol"        | NFT |
| Orytis (référence toxique) | T   |

Les résultats d'une seconde étude sur les effets du roténobiol sur les *T.Pyri* sont présentés en annexe n°2

## V - DISCUSSION

Les problèmes posés par la FD en santé des plantes sont particulièrement ardu du fait de la complexité de la biologie et de la transmission de l'organisme phytopathogène. La viticulture biologique, mais aussi les conduites conventionnelles et raisonnées attendent des solutions permettant de limiter la gravité des attaques de FD et de pouvoir ainsi vivre avec un niveau tolérable de maladie dont les épidémies pourraient être maîtrisées.

Les recherches conduites sur les phytoplasmoses doivent être conduites sur tous les plans : agronomie,

physiologie, entomologie, épidémiologie, bactériologie, biologie moléculaire. La FD bénéficie pour ces recherches des résultats de travaux conduits depuis plusieurs décennies à l'INRA et de comparaisons avec les travaux réalisés depuis une dizaine d'années dans d'autres pays, en particulier en Italie qui connaît maintenant des attaques comparables à la France.

Ainsi, l'étude de la FD bénéficie-t-elle de la connaissance de la cicadelle vectrice naturelle, « élevée » pendant la phase active de son cycle (de l'œuf à l'adulte), de la modélisation de la transmission, d'outils avancés, bien que perfectibles, de détection et de caractérisation, qui ont démontré une grande homogénéité biologique et moléculaire entre les isolats de phytoplasmes de FD *sensu stricto*. Parmi les obstacles au progrès de la recherche, nous trouvons en première ligne la lourdeur expérimentale, due à la longueur des temps nécessaires pour l'expression des symptômes et la mise en place de réactions de défense (postulées), à la complexité et la grande diversité du matériel végétal, cépages et porte-greffes, et à l'impossibilité de l'expérimentation en plein champ, nécessaire à l'expression du comportement et à la sélection de matériel intéressant, mais qui se heurte aux exigences de la prophylaxie et en tout état de cause à la législation qui frappe cette maladie de quarantaine.

Dans ce contexte, l'étude du comportement des ceps résistants, abordée dans une démarche exploratoire, est fatalement inachevée. Il s'agit là de travaux non conventionnels, qui se devaient d'être entrepris et devront être poursuivis car si la "résistance" et le rétablissement de ceps sont connus depuis plusieurs décennies, leur étude n'avait jusqu'alors été que descriptive et les phénomènes ne sont pas compris. Les premiers résultats obtenus ne sont que fragmentaires en raison de la lourdeur expérimentale des essais et du temps nécessaire à la lecture des résultats pour ce qui est de l'indexage, de l'inoculation contrôlée et de la transmission par la greffe. Toutefois les travaux se poursuivent actuellement grâce à la disponibilité des 16 lignées de matériel "résistant" entretenues. Il faut dire que dans les contraintes actuelles de la lutte obligatoire, l'identification de tel matériel serait aujourd'hui impossible.

L'élicitation de mécanismes de défense réalisée sur tabac est un phénomène prometteur. Même si le décryptage des phénomènes cellulaires qui les gouvernent est une problématique très lointaine du fait de sa complexité, l'obtention de protection pourrait être rapidement utilisée sur un plan pratique, dans la mesure où les éliciteurs retenus sont écologiquement neutres.

La connaissance de la spécificité de la vection sera poursuivie par le repérage des protéines d'intérêt, leur séquençage partiel, la construction de sondes et la recherche de gènes homologues dans les banques de données. D'autres approches de génomique du phytoplasme sont en cours, comme l'isolement du chromosome entier, l'établissement d'une carte physique (Constable et Boudon-Padieu, 2003) et la localisation de gènes connus ou bien de fragments clonés au hasard.

L'identification des interactions spécifiques cicadelle-phytoplasme pourra permettre des actions préventives. Pourra s'avérer nécessaire la mise en place de méthodes de limitation des populations de *S. titanus* en zone indemne de FD, dans le cas où il serait démontré qu'un phytoplasme non viticole présent dans l'environnement pourrait être propagé activement par *S. titanus* après son introduction accidentelle à la vigne par un insecte vecteur ampélophage occasionnel. Une autre perspective serait l'utilisation de leurres absorbés par les cicadelles et saturant sur les barrières cellulaires les sites spécifiques de l'accrochage du phytoplasme.

Ces études soulèvent un certain nombre de questions de recherche, comme les raisons de la prolifération de la cicadelle sur certaines parcelles plutôt que d'autres : facteurs d'attractivité de la vigne pour le vecteur, importance de la topographie, importance des opérations culturales, le rôle de la présence de l'eau sur le développement du vecteur et de la maladie, le comportement de certains cépages comme la Syrah. Toutes ces pistes sont à étudier et à approfondir mais dans l'attente de solutions durables de lutte contre la maladie, les méthodes actuelles de lutte contre la maladie : arrachage des pieds atteints, lutte contre le vecteur et mesures prophylactiques doivent se poursuivre sans relâche.

La Roténone présente une variabilité d'efficacité et son comportement se décline au travers des points suivants :

- il n'y a pas d'effet « choc » manqué dans les jours qui suivent l'application. Cet aspect est vraisemblablement lié à son mode d'action non neurotoxique (activité sur la respiration cellulaire),
- l'efficacité maximale se manifeste dans la semaine qui suit l'application et une diminution de celle-ci apparaît dès la deuxième semaine,
- l'augmentation d'efficacité espérée, avec deux interventions positionnées sur larves jeunes en pré et/ou post floraison, n'est pas évidente à obtenir.
- l'importance de la population larvaire, limite l'efficacité de la Roténone. Ce constat peut pour une grande part, expliquer la variabilité de l'effet insecticide mesuré,
- aucune amélioration d'efficacité n'est obtenue avec l'association d'adjuvants,
- bien que la poursuite de la protection après nouaison (Roténobiol x 4, dans la série n° 3) se démarque sur le plan statistique, l'efficacité supplémentaire modérée obtenue, ne permet cependant pas de préconiser cette technique de lutte.

Dans la gamme des pyrèthres, le Piretro a globalement un comportement qui ressemble à celui de la Roténone, hormis le fait que son action de choc à J + 3 est plus intense. Cela est somme toute logique, car il s'agit d'un neurotoxique. Le gain d'efficacité obtenu dès le début, se maintient sur toute la période de contrôles et la double intervention n'apporte pas un gain d'efficacité évident, même si une légère amélioration est constatée dans les jours qui suivent la deuxième application (série n° 2).

Le Pyrèthre CAPI-4C apporte un gain très net d'efficacité. La double application ne paraît pas très intéressante.

L'association Pyrèthre + Roténone (Biophytoz) pourrait être une possibilité, qu'il serait nécessaire d'expérimenter à nouveau, dans le cadre d'une double application par exemple.

L'effet mesuré neutre à faiblement toxique obtenu avec la Roténone et le Pyrèthre, sont des éléments positifs à prendre en compte par la suite, dans le cadre de la poursuite des expérimentations, voire de l'homologation du Pyrèthre.

Notons enfin que l'étude sur la présence éventuelle de résidus de Roténone, montre que la dernière intervention doit se situer 10 jours avant la récolte, pour rester en dessous du seuil de détection de la méthode mise en œuvre.

En conclusion on peut dire que ces essais remettent en cause l'efficacité de la roténone ce qui n'est pas sans poser question, puisqu'il s'agit du seul insecticide autorisé en agriculture biologique en France pour lutter contre la cicadelle de la flavescence dorée. Dans le cas d'une maladie de quarantaine, avec traitements insecticides obligatoires contre le vecteur, c'est particulièrement gênant. Le pyrèthre, homologué au cahier des charges européen mais pas en France, semble être une alternative intéressante. Reste à savoir si son dossier d'homologation pourra être instruit rapidement.

## VI - TRANSFERT DE CONNAISSANCE

- Les résultats ont été présentés lors des journées techniques viticulture biologiques qui ont eu lieu en décembre 2003 à Cognac, ces journées ont essentiellement un public de producteurs et de techniciens.
- Présentation du programme et des résultats lors du séminaire INRA-CIAB de Draveil en novembre 2003.
- Réalisation prévues d'articles dans les revues spécialisées vigne et les revues consacrées à l'agriculture biologique.
- Mise en ligne sur les sites Internet des organismes partenaires, du programme et des principaux résultats.
  - Réalisation d'une fiche technique Techn'ITAB Viticulture, en partenariat avec l'ITV et l'ONIVINS, sur « la lutte contre la flavescence dorée en viticulture biologique », et qui intégrera les résultats obtenus lors de ce programme.

ANNEXE n° 1

**ETUDE EN PLEIN CHAMP DES «EFFETS NON-INTENTIONNELS» DES SPECIALITES  
INSECTICIDES ROTENOBIOLE ET PYRETHRE "CAPISCOL" SUR *TYPHLODROMUS PYRI*  
SCHEUTENEN BORDELAIS**

*Méthode C.E.B. 167*

*Caractéristiques des insecticides utilisés*

Tableau 1 : Série « insecticide » testée avec 1 application : Caractéristiques des insecticides étudiés à Branne –ITV Bordeaux-Blanquefort – 2003

| Spécialités commerciales | Teneur en matières actives | Dose par hectare de spécialité commerciale | Dose par hectare de matières actives |
|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------------------|
| ORYTIS                   | Acrinathrine (75 g/l)      | 0.2 l                                      | 15 g                                 |
| ROTENOBIOL               | Roténone (66,6 g/l)        | 3 l  | 200 g                                |
| PYRETHRE "CAPISCOL"      | Pyréthre (50 %)            | 1,5 l                                      | 0.75 g                               |

Les spécialités testées sont appliquées une fois selon les préconisations de la méthode CEB 167.

*Dispositif expérimental*

Essai bloc à 5 répétitions sur Cabernet Franc /101-14 C.

Densité de plantation : 3333 souches/ha ;

Vigne palissée, taille en Guyot double.

Travail du sol et enherbement alterné un rang sur deux.

Age de la vigne : 18 ans

La dimension des parcelles élémentaires est de 14 ceps consécutifs sur le même rang. Les prélèvements de feuilles nécessaires au contrôle de la dynamique de population sont effectués sur les 10 ceps centraux.

Un rang de garde sépare systématiquement les parcelles élémentaires

*Traitements*

Effectués avec un pulvérisateur pneumatique à dos sur la base de 200 l de bouillie par hectare. Toutes les modalités ont été traitées le même jour.

Le traitement T1 a été appliqué le 25 juin 2003 .

Les erreurs constatées sur la quantité de bouillie effectivement apportée par rapport à la dose homologuée sont précisées tableau II.

La couverture anti-mildiou a été assurée avec du cuivre et la couverture anti-oïdium avec du soufre. Ces deux spécialités phytosanitaires sont référencées neutres à faiblement toxiques sur T pyri.

Aucun acaricide ou insecticide n'a été employé sur la parcelle au cours de la campagne.

Tableau 2 : Série insecticide testée avec 1 application  
Contrôles d'application des traitements – Branne– ITV Bordeaux-Blanquefort – 2003.

| % d'erreur sur la quantité de bouillie apportée/dose homologuée |       |
|---|-------|
| Modalités   | T1    |
| Eau   | +5.5% |
| Orytis  | +8%   |
| Roténobiol  | -3%   |
| Pyréthre  | + 7%  |

### Notations et expression des résultats

Les notations sont effectuées à T1-7j, T1+7j, T1+21j, et T1+40j.

Elles concernent un échantillon de 20 feuilles par parcelle élémentaire, prélevées sur les deux faces du rang à raison de 2 feuilles par cep sur les 10 ceps centraux (par rapport au total de 14 ceps traités pour chaque placette). Niveau de prélèvement des feuilles : zone d'inflorescence.

La variable observée est le nombre de formes mobiles de phytoseïdes pour 20 feuilles, comptage effectué sur filtre après extraction par trempage-lavage. L'identification de l'espèce (ici *T. pyri*) porte sur 2 x 50 individus prélevés en début de saison, le 18 juin et en fin de campagne, le 4 août 2003.

Les résultats des différents comptages, (variable analysée = nombre de formes mobiles pour 20 feuilles) sont soumis à une analyse de variance avec risque de première espèce  $\alpha=5\%$ , suivie d'un test de Dunnett en prenant comme terme de comparaison la référence neutre : eau. Les résultats sont également exprimés en population résiduelle de prédateurs.

### Observations préalables/validation du système expérimental

Le premier contrôle des niveaux de populations de *T. pyri* réalisé le 18 juin 2003 permettait de mettre en place le dispositif expérimental.

La répartition spatiale de la population n'étant pas homogène au sein de la parcelle, et ne présentant pas de gradient simple, nous avons opté pour un dispositif en blocs éclatés constitués de placettes non contiguës, mais présentant des niveaux de population équivalents. Les affectations des différentes modalités à l'intérieur de chaque bloc ont été effectuées par tirage aléatoire. Le dispositif ainsi bâti et soumis à une analyse de variance est validé, le nombre moyen de prédateurs par modalité étant comparable et la puissance a priori pour mettre en évidence des différences supérieures à 40% entre traitements et terme de comparaison égale à 99 %.

ANNEXE n° 2

**ETUDE EN PLEIN CHAMP DES EFFETS NON INTENTIONNELS DE L'INSECTICIDE ROTENOBIOL  
APRES UNE APPLICATION SUR *TYPHLODROMUS PYRI* SCHEUTEN**

Responsables techniques de l'action : Gilles Sentenac, Frédéric Lafage, ITV France, unité expérimentale de Beaune

Situation de l'essai : Saint-Denis de Vaux, lieu-dit "La Vache", AOC Côte Chalonnaise.

Motivations et objectifs :

Le but de cette action est de définir au vignoble les effets non intentionnels de l'insecticide Roténobiol sur une population autochtone de *T. pyri* présente sur le site de Saint-Denis de Vaux (population de référence).

Tableau I : caractéristiques des insecticides étudiés

| Spécialités commerciales | Teneur en matières actives | Dose/ha m.a. | Dose/ha s.c. |
|--------------------------|----------------------------|--------------|--------------|
| Karaté vert              | 50 g/l lambda-cyhalothrine | 17.5 g       | 0.350 l      |
| Roténobiol               | 66.6 g/l roténone          | 200 g        | 3 l          |
| Témoin traité à l'eau    |                            |              |              |

Dispositif expérimental :

Un essai bloc à 5 répétitions a été mis en place dans une vigne traditionnelle ( 8000 cep/ha, 1.25 m x 1.00 m ) complantée en chardonnay greffé sur 3309 C, taillée en guyot simple et âgée de 51 ans. La dimension des parcelles élémentaires est de 40 cep (4 rangs x 2 EP x 5 cep). Un rang de garde (ne recevant que les traitements d'entretien) borde systématiquement les parcelles élémentaires.

Conditions de traitement :

Le traitement expérimental, a été réalisé le 23 juin 2003, en couverture générale, face par face, au moyen d'un pulvérisateur à dos Stihl SR 400, le volume à l'hectare étant de 200 l.

Tableau II: dates de réalisation des traitements expérimentaux; différence par rapport au volume/ha théorique de 200 l.

| Dates        | Stade phénologique                 | Modalités                   |                        |                 |
|--------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|
|              |                                    | 1<br>Karaté vert<br>0.350 l | 2<br>Roténobiol<br>3 l | 3<br>témoin eau |
| 23 juin 2003 | 31 (grains de la taille d'un pois) | - 6.8 %                     | - 6 %                  | - 1.4 %         |

Lors de la réalisation des applications, les conditions météorologiques étaient les suivantes:

|                |            |             |                   |
|----------------|------------|-------------|-------------------|
| Traitement     | Temps      | Température | Humidité relative |
| T (après-midi) | ensoleillé | 33 – 36 °C  | 41%-55%           |

Les traitements de couverture ont été réalisés par le viticulteur:

12 mai : Epylog flash 3.75 kg/ha + thiovit 6 kg/ha

27 mai : Mikal 4 kg/ha + Storia 0.3l/ha

11 juin : Epylog flash 3.75 kg/ha + Storia 0.3l/ha

24 juin : Mikal 4 kg/ha + Stora 0.3l/ha  
11 juillet : Kocide 4.5 kg/ha + thiovit 7.5 kg/ha

#### Notations et expression des résultats

les notations réalisées à T-4j, T+7j, T+22j, T+45j et T+63j portent sur un échantillon de 20 feuilles par parcelle élémentaire, prélevées, à raison d'une par cep, sur les faces internes des rangs centraux. Le niveau de prélèvement est défini pour chaque notation, il change d'une notation à l'autre. La variable observée est le nombre de formes mobiles de *T. pyri* pour 20 feuilles, comptage effectué sur filtre après extraction par trempage-lavage; s'il y a lieu, les formes mobiles de tetranyques ou de tydéides sont également dénombrées.

L'identification de l'espèce (*T. pyri*) porte sur 114 individus prélevés le 19 juin, le 25 et 27 août 2003. Les résultats des différents comptages (variables analysées: nombre de formes mobiles de *T. pyri* par lot de 20 feuilles) sont soumis à une analyse de variance au risque de première espèce  $\alpha = 5\%$ , suivie d'un test de Dunnett en prenant comme terme de comparaison le témoin traité à l'eau. Les résultats sont également exprimés en population résiduelle de prédateurs.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les identifications ont donné les résultats suivants :

19 juin : 52 *T. pyri* 43 ♀, 9 ♂  
1 *Bawus talbii* 1 ♀

25 et 27 août : 61 *T. pyri*, 58 ♀ et 3 ♂

Lors des différentes observations réalisées durant l'expérimentation, outre les Phytoseiidae, nous avons dénombré des Tydeidae.

#### Validation du dispositif expérimental :

Les résultats issus de l'observation préalable du 19 juin 2003 sont soumis à une analyse de variance qui a permis de vérifier l'absence de différence significative entre les modalités simulées. La puissance, pour mettre en évidence des différences significatives supérieures à 40% entre traitement et terme de comparaison, est supérieure à 90 %.

#### Analyse des résultats expérimentaux :

L'évolution des densités foliaires de *T. pyri* est représentée dans la figure n°1. La population rencontrée dans la référence neutre (témoin traité à l'eau) est très élevée à T-4j : 20 fm/feuille. Elle décroît de façon régulière par la suite, 12 fm/f à T+7j, 7 fm/f à T+22j (date retenue pour le classement des modalités à l'étude). Une nouvelle baisse, consécutive aux conditions climatiques exceptionnelles rencontrées début août 2003 (record de chaleur 40 ° C sous abri), est observée : 1 fm/f à T+45j, 0.3 fm/f à T+63j.

figure n° 1 :

**EVOLUTION DES DENSITES FOLIAIRES DE TYPHLODROMUS PYRI SCHEUTEN**

Saint-Denis de Vaux  
2003

ITV France

Unité Expérimentale de Beaune

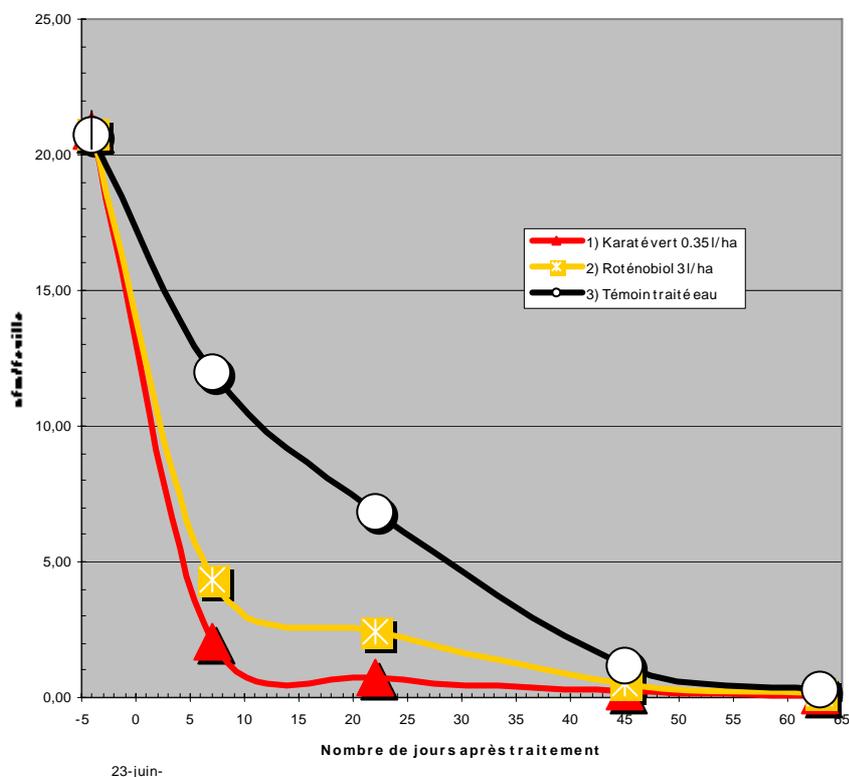


Tableau III : Evolution du nombre moyen de formes mobiles (nfm) de *T.pyri* par feuille

|   | Modalités                      |                           |                 |           |
|---|--------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------|
|   | 1<br>Karaté Vert<br>0.350 L/ha | 2<br>Roténobiol<br>3 L/ha | 3<br>Témoin eau | Puissance |
| 19 juin 2003 : T-4j<br>nfm/feuille<br>classement                              | 20.86<br>NS                    | 20.84<br>NS               | 20.77<br>NS     | 99 %      |
| 30 juin 2003 : T+7j<br>nfm/feuille<br>classement<br>population résiduelle     | 2.07<br><<br>17 %<br>T         | 4.37<br><<br>36.4 %<br>MT | 12.01           | 99 %      |
| 15 juillet 2003 : T+22j<br>nfm/feuille<br>classement<br>population résiduelle | 0.71<br><<br>10.4 %<br>T       | 2.39<br><<br>35 %<br>MT   | 6.81            | 99 %      |
| 7 août 2003 : T+45j<br>nfm/feuille<br>classement                              | 0.24<br><                      | 0.54<br><                 | 1.14            | 99 %      |

|  |                          |                           |      |      |
|--|--------------------------|---------------------------|------|------|
| population résiduelle  | 21 %<br>T                | 47 %<br>MT                |      |      |
| 25 août 2003 : T+63j<br>nfm/feuille<br>classement<br>population résiduelle | 0.08<br><<br>25.8 %<br>T | 0.14<br><<br>45.2 %<br>MT | 0.31 | 82 % |

De T+7j à T+63j, la référence toxique Karaté vert est significativement inférieure au terme de comparaison, elle est classée toxique à chaque notation : PR < 30 %.

Sur la même période, Roténobiol est également inférieur au terme de comparaison, par contre cette modalité est classée moyennement toxique, la population résiduelle étant toujours supérieure à 30 %.

Dans les conditions de cette expérimentation, sur T. pyri population de Saint-Denis de Vaux, le classement est le suivant:

Karaté vert : T

Roténobiol : MT