

GRAND PRIX 2023 SCIENCE ET RECHERCHE DE L'ACADEMIE AMORIM

Etude pluriannuelle de la sporée aérienne de *Plasmopara viticola* par quantification moléculaire : un nouvel indicateur de risque des épidémies du mildiou de la vigne

« Détecter les pathogènes avant l'apparition des symptômes : traiter mieux pour traiter moins »

Pièce n°3 / Synthèse

Antonin Douillet

Docteur en Sciences
Agronomiques et Forestière

Contact

6, Allée des Althéas
26000 Valence

06 70 22 99 02

antonin.douillet@gmail.com

Etude pluriannuelle de la sporée aérienne de *plasmopara viticola* par quantification moléculaire : un nouvel indicateur de risque des épidémies du mildiou de la vigne

Date de la soutenance : 27 Février 2023

Membre du jury

Mme LEGREVE Anne	Professeure des universités à l'Université de Louvain, Belgique	Présidente du Jury
Mme ABADIE-FOURNIER Catherine	Directrice de Recherche – CIRAD, France	Rapporteuse
Mme MERCIER Laurence	Ingénieure Recherche & Innovation – MOËT HENNESSY, France	Examinatrice
M. DUBUIS Pierre-Henri	Chargé de Recherche – Agroscope Changins, Suisse	Examineur
M. DELMOTTE François	Directeur de Recherche – INRAE, France	Directeur de thèse
M. RAYNAL Marc	Ingénieur – IFV, France	Co-directeur de thèse

Obtenu avec les félicitations du Jury

1. INTRODUCTION

Contexte de l'étude

Accompagnant l'histoire de l'être humain, la vitiviniculture s'est répandue à travers le monde, et l'on retrouve dorénavant des bassins de production sur tous les continents habités. Depuis des origines diverses, le genre *Vitis* a donc colonisé, naturellement ou par le biais des échanges commerciaux, l'ensemble de la planète. Les vignes européennes ont été disséminées suite à l'homogénéisation mondiale des standards de production de raisin de cuve. De la même manière, durant la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, du matériel biologique provenant de vignes sauvages américaines fut introduit en Europe pour leur qualité ornementale. Cette arrivée en Europe de lianes américaines est certainement responsable de l'introduction sur le vieux continent d'un ensemble de pathogènes et de ravageurs auxquels *V. vinifera* était, et reste, extrêmement sensible.

En 1878, le mildiou de la vigne, causé par l'oomycète *Plasmopara viticola*, fut identifié pour la première fois dans un vignoble bordelais (Millardet, 1881). Originaire d'Amérique du Nord, il s'est alors propagé très rapidement dans l'ensemble du continent, atteignant le vignoble caucasien en 1887 (Fontaine et al., 2013). La vigne européenne étant très sensible à l'oomycète, certaines épidémies furent dévastatrices pour la filière, causant des pertes pouvant atteindre 70% de la vendange comme en France en 1915 (Chen et al., 2020). La bouillie bordelaise, remède à base de sulfate de cuivre mis au point par Alexis Millardet en 1885, s'avère quant à elle très efficace en traitement préventif contre le mildiou (Millardet et Gayon 1888). Entre 1939 et 1945, durant la Seconde Guerre Mondiale, le complexe militaro-industriel intensifia la demande en cuivre et la protection des cultures vit sa provision mise sous quotas (Gessler et al., 2011). La recherche s'est alors orientée sur l'expérimentation de produits non cupriques afin d'apporter des solutions alternatives au secteur démuné. Plusieurs tentatives plus ou moins fructueuses furent nécessaires avant la mise en évidence de l'efficacité de molécules issues de la chimie de synthèse, conduisant à la fin des années 1980 à la découverte des produits systémiques (Gessler et al., 2011). La protection phytosanitaire offre alors un niveau d'efficacité inégalé, avec un panel de molécules et de modes d'action qui s'étoffent jusqu'à l'apparition des premières limites d'un tel modèle de protection certes très performant mais également très impactant sur les plans de la santé publique (ANSES, 2014 ; Kim et al., 2017 ; Mostafalou et Abdollahi, 2017) et de l'environnement (Beketov et al., 2013 ; Arena et Sgolastra, 2014 ; Pelosi et al., 2014).

En France, la viticulture est l'une des filières agricoles les plus consommatrices en produits phytosanitaires par unité de surface, derrière les filières pomme et pomme de terre (Urruty et al., 2016). Les fongicides anti-mildiou représentent la moitié des fongicides appliqués dans le vignoble français, soit 40% de la totalité des produits phytosanitaires appliqués (insecticides et herbicides compris ; Simonovici, 2019). Ces conséquences négatives ont conduit à raisonner la protection de la production. Dans le contexte de la protection contre *P. viticola*, il s'agit de mobiliser, en amont des pesticides issus de la chimie de synthèse, l'ensemble des méthodes de lutttes disponibles pour diminuer voire empêcher l'installation de maladie : les produits de biocontrôle et les stimulateurs des défenses de la plante, la plantation de cépages résistants et la mise en place d'itinéraires techniques incluant des mesures prophylactiques (Lamichhane et al., 2016).

Un autre levier est de réduire l'utilisation des produits d'origine de synthèse au strict nécessaire, que ce soit en termes de fréquence et de dosage de l'application. Dans le cas du mildiou de la vigne, de nombreuses études scientifiques ont été réalisées depuis son introduction en Europe. Elles ont permis, entres autres, de mieux définir les stades phénologiques durant lesquels la vigne est réceptive (ou sensible), où le pathogène est actif, et les conditions environnementales propices au départ de l'épidémie. Cet ensemble de connaissances permet de définir sur la base d'indicateurs, des modèles prédictifs plus ou moins complexes, des Outils d'Aide

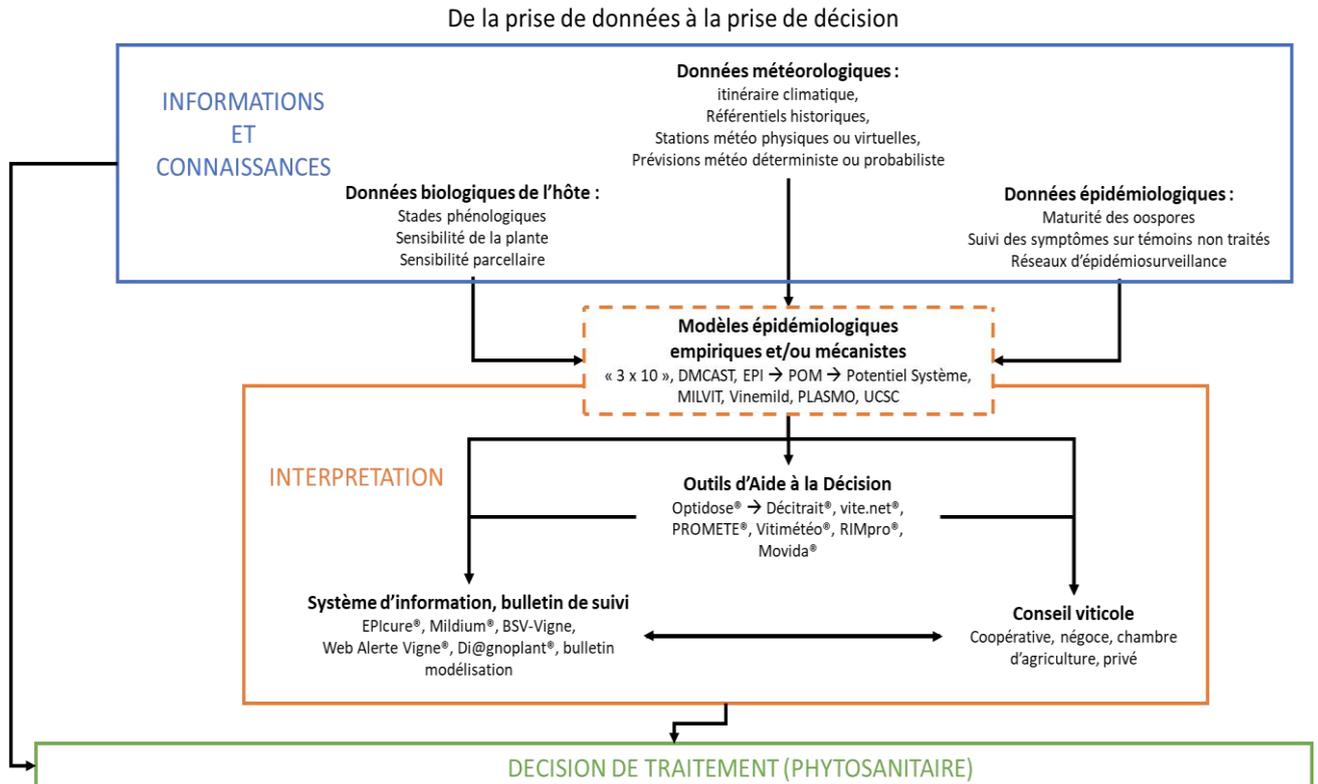


Figure 1 : Schéma de l'ensemble des informations et outils mis à la disposition des viticulteurs pour prendre la décision d'appliquer un traitement phytosanitaire.

à la Décision (OAD), des périodes ou des événements climatiques durant lesquels le risque épidémique augmente, rendant la couverture phytosanitaire nécessaire. L'ensemble des informations disponibles pour la prise de décision des viticulteurs est schématisé dans la figure 1.

La figure 2, réalisée grâce aux résultats de l'étude des Services de Statistique et de Prospection sur les pratiques des viticulteurs (Simonovici, 2019), illustre les principaux groupes d'indicateurs intervenant dans la prise de décision de déclenchement des traitements. En France, les indicateurs météorologiques et les observations de maladies sont pris en compte dans le traitement de 96% et 87% des surfaces viticoles, respectivement. Les Outils d'Aide à la Décision (OAD) sont définis comme des outils « *prenant appui sur des modèles clairement explicités mais non nécessairement complètement formalisés, qui aident à obtenir des éléments de réponses aux questions que se pose un intervenant dans un processus de décision* » (Jallas et Crétenet, 2003). Censés apporter, sans s'y substituer, une meilleure interprétation des indicateurs météorologiques et des observations des maladies, ils sont utilisés dans le déclenchement des traitements de 19% des surfaces uniquement (figure 2). Ce paradoxe peut être expliqué par le fait que les OAD disponibles manquent de pertinence à l'échelle de l'exploitation viticole qui est le niveau de prise de décision. Il se peut que les personnes décisionnaires manquent de formation et d'accompagnement à l'utilisation de ces outils. Un autre levier permettant d'acquérir de l'information avant l'apparition des symptômes est de détecter l'émission de propagules infectieuses (les sporanges pour *P. viticola*) avant l'établissement de l'épidémie. L'atmosphère est le milieu de propagation des sporanges dans le cas de *P. viticola*. L'étude des aérosols d'origines biologique présent dans l'atmosphère est appelée aérobiologie. L'utilisation de méthodes de suivi aérobiologiques permet d'anticiper l'apparition et la propagation de la maladie (Brischetto et al., 2020).

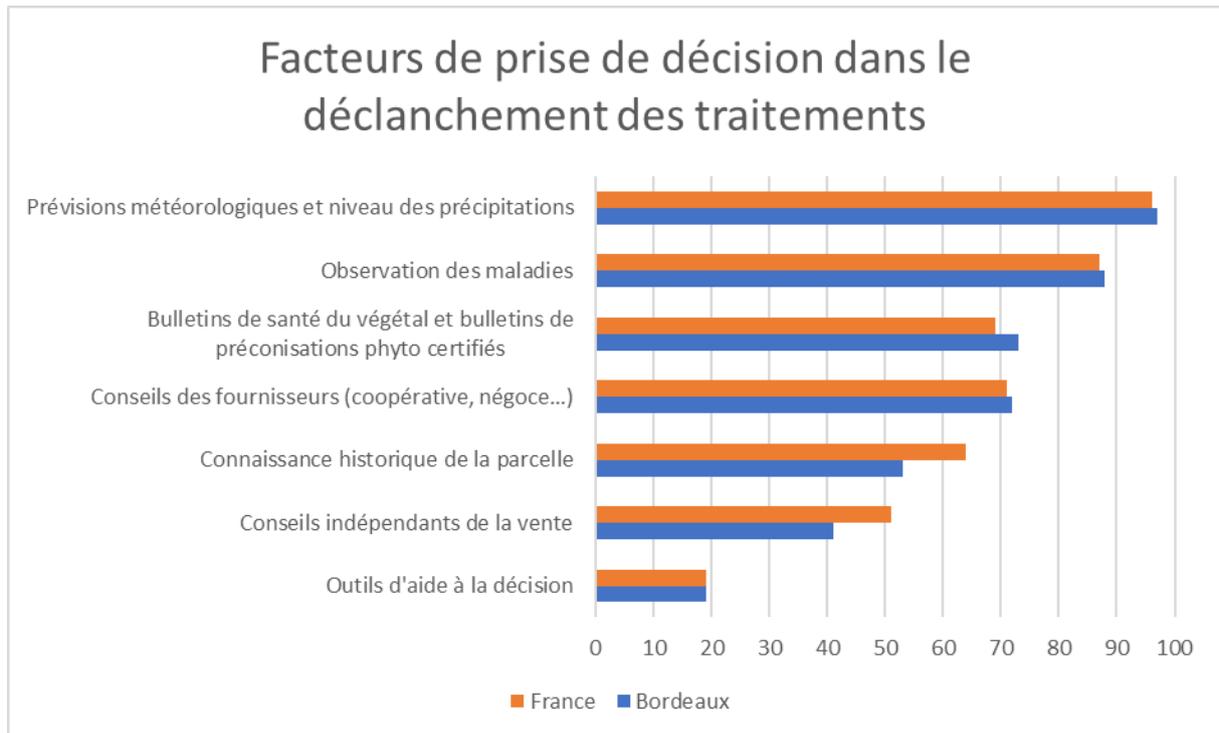


Figure 2 : Facteurs de prise de décision dans le déclenchement des traitements (plusieurs réponses possibles, part de surface en pourcent). Exemple : dans le Bordelais, sur 97% des surfaces, l'exploitant déclenche les traitements phytosanitaires en fonction des prévisions météorologiques et des niveaux de précipitations (Chiffres extraits de Simonovici, 2019).

Objet de ma thèse

Mon projet de thèse est réalisé au sein de l'Unité Mixte Technologique Santé des Écosystèmes Viticoles Économiques en intraNts (UMT SEVEN). Cette UMT a été créée en 2017, du partenariat entre l'IFV, l'UMR SAVE de l'INRAE de Bordeaux et l'école d'ingénieur Bordeaux Sciences Agro pour favoriser le contact entre les membres des instituts de recherche, les membres des instituts techniques et les acteurs de la formation. La thèse s'inscrit dans le cadre du projet de suivi de la Sporée Aérienne du Vignoble (VISA). L'hypothèse de travail de ce projet est que l'intégration d'une mesure directe du pathogène dans les parcelles permettra d'améliorer la prévision du risque épidémique à l'échelle de l'exploitation. Ce projet propose l'élaboration chez un ensemble de viticulteurs partenaires d'un réseau participatif de capture de spores des quatre principaux pathogènes cryptogamiques de la vigne que sont *P. viticola*, *Erysiphe necator* (l'oidium), *Guignardia bidwellii* (le black rot) et *Botrytis cinerea* (la pourriture grise des grappes). Les objectifs portés par ce projet sont (i) de développer une méthode interopérable de capture et de détection/quantification de la sporée aérienne des pathogènes facilement transférable, (ii) de proposer des indicateurs de suivi de la sporée aérienne intégrables aux modèles météorologiques de prévision des risques épidémiques, afin de (iii) préciser les préconisations des OAD déjà existants à différentes échelles spatiales (de la région à l'exploitation viticole) et temporelles. Le sujet de cette thèse est la mise au point d'une méthode de suivi de la sporée de *P. viticola*, pathogène le plus problématique du vignoble de la façade Atlantique, en éprouvant méthodologiquement les différents outils envisagés et de proposer les premières bases de la création d'indicateurs de sporée aérienne de l'oomycète intégrables aux modèles météorologiques et OAD déjà existants. Le premier impératif de ce projet global est de garder en vue un objectif de transfert de la méthode vers les différents acteurs de la protection phytosanitaire (viticulteurs, conseillers viticoles, coopératives viticoles et laboratoires d'intérêt territorial). Les méthodes et outils de suivi ont été sélectionnés pour leur robustesse, leur simplicité et rapidité d'utilisation, et bien sûr leurs prix attractifs pour permettre un déploiement généralisé.

La première étape de cette étude fut d'adapter un protocole de biologie moléculaire déjà existant (Kong et al., 2016) utilisant la technologie LAMP (Amplification isotherme médiée par les boucles). Du fait de sa réaction isotherme, il s'agit d'une technologie rapide (30 à 45 minutes de réaction), que j'utilise en combinaison avec un protocole simplifié d'extraction d'ADN (lyse alcaline réalisée en 10 minutes). Pour valider le caractère quantitatif de ce protocole, je l'ai éprouvé en comparaison avec la Digital Droplet PCR, méthode de quantification absolue d'acides nucléiques la plus sensible et la plus précise décrite à ce jour. La deuxième étape de cette étude traite deux sous-questions autour de la capture de sporanges, à savoir s'il existe (i) un rythme circadien d'émission de sporanges et (ii) une hauteur de capture optimale pouvant évoluer au cours de la saison. Il s'agit de valider un protocole de capture robuste et diffusable par la suite. La troisième étape de l'étude propose une preuve de concept de l'apport d'information de la mesure de la concentration aérienne en sporanges dans les modèles et les OAD existants, en se basant sur le suivi des six parcelles sur trois millésimes. J'y propose la construction d'un indicateur épidémique adapté à la relation entre sporée et évolution des symptômes, mais également des indicateurs climatiques construits de manière empirique basés sur l'étude bibliographique de la relation entre cycle de vie de *P. viticola* et de l'itinéraire climatique.

2. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE LAMP POUR L'ÉVALUATION QUANTITATIVE SUR LE TERRAIN DE L'INOCULUM AÉROPORTÉ DE MILDIOU DE LA VIGNE (DOUILLET ET AL., 2022A)

Avec comme premier objectif la transférabilité de la méthode, j'ai réalisé des choix de protocoles, la lyse cellulaire alcaline, et de technologies, la LAMP, lui permettant d'être rapide et peu coûteuse. Ces choix ne devant pas se faire au détriment de la sensibilité de la méthode, j'ai comparé le caractère quantitatif de la méthode avec le protocole d'extraction d'ADN de référence, le protocole CTAB, et la technologie de biologie moléculaire la plus précise et la plus sensible à ce jour, la ddPCR (Digital Droplet PCR).

Un protocole de LAMP permettant de détecter spécifiquement *P. viticola* était déjà publié dans la littérature scientifique (Kong et al., 2016). Ce protocole permet d'amplifier la séquence spécifique ITS2 du cluster ribosomique de l'oomycète. J'ai cependant adapté l'étape d'extraction des acides nucléiques du protocole original qui restait chronophage. L'extraction et la purification d'acides nucléiques par le procédé CTAB demande 24h de réalisation. Il existe des kits commerciaux d'extraction/purification mais ils demandent 12h de réalisation et restent assez onéreux. Un protocole simplifié de lyse cellulaire à base d'hydroxyde de potassium a été mis au point et adapté à mes besoins. Grâce à cette innovation, l'étape d'extraction dure maintenant 10 minutes et ne demande pas de matériel particulier : elle peut être réalisée sur le terrain.

Malgré l'efficacité démontrée de la LAMP pour détecter la présence d'organismes cibles, sa pertinence pour une utilisation dans des approches quantitatives reste sujet à débat en raison de sa capacité modérée à quantifier de petites quantités d'ADN cible (Hardingue et Murray 2020). Malgré le fort potentiel de la LAMP pour la surveillance quantitative des agents pathogènes en condition de terrain, le protocole LAMP de Kong et al. (2016) est limité à la détection qualitative de *P. viticola*. La Digital Droplet (ddPCR) peut être utilisée pour la quantification absolue du nombre de séquences cibles présentes dans un échantillon (Hindson et al., 2011). Cette méthode est très précise mais prend beaucoup de temps. Elle nécessite également un niveau élevé de compétences techniques et est, par conséquent, moins adaptée aux analyses de routine bon marché des échantillons. Néanmoins, elle reste la meilleure méthode de référence pour la quantification des acides nucléiques (Ristaino et al., 2019). J'ai développé des amorces de ddPCR ciblant la même séquence ITS2 que la LAMP afin de pouvoir éprouver son caractère quantitatif, sur des échantillons

de plusieurs souches pures de *P. viticola*, mais également sur 88 échantillons d'air issus du suivi aérobiologique d'un vignoble commercial.

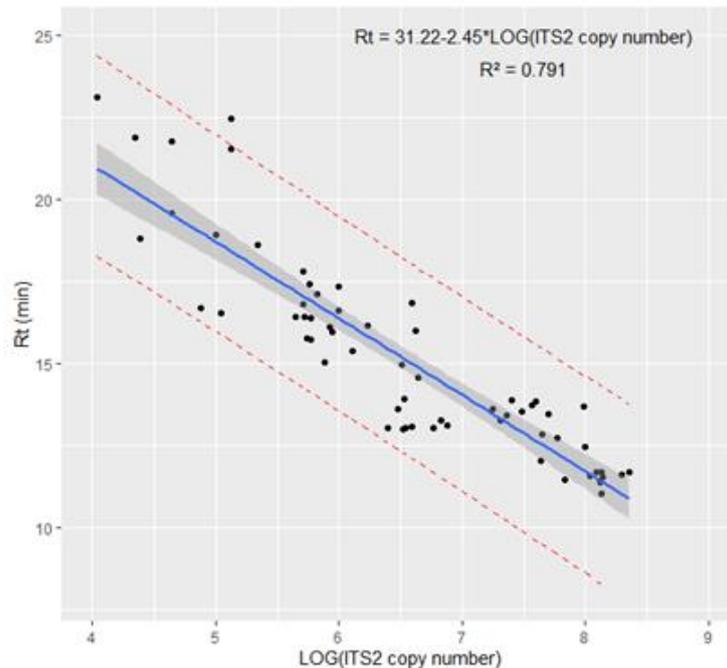


Figure 3 : Régression linéaire entre la valeur de R_t obtenue par l'analyse LAMP et le $\log(\text{nombre de copie d'ITS2})$ obtenu par l'analyse ddPCR (les « 0 » et les concentrations plus faibles que la LoQ sont extraites).

La spécificité des jeux d'amorces à *P. viticola* (souches françaises et européennes) a été validé pour la LAMP et la ddPCR. La Limite de Détection (LoD) de la méthode LAMP sur *P. viticola*, définie comme la plus faible concentration de sporanges pour laquelle 95% des échantillons sont détectés, se situe entre 100 et 1000 sporanges collés sur les collecteurs. La Limite de Quantification (LoQ) de la méthode, définie comme la concentration la plus faible pour laquelle 100% des échantillons sont détectés, avec un coefficient de variation inférieur à 35%, est de 1000 sporanges. La relation quantitative entre le R_t obtenu par LAMP et le logarithme base 10 du nombre de copies de ITS2 obtenu par ddPCR pour les échantillons est présentée dans la figure 3, avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,791.

Du 13 mars 2020 au 14 octobre 2020, 88 échantillons d'air ont été collectés dans une parcelle de vigne gérée sans traitement fongicide. Ils ont révélé des concentrations variant de 0 à 243 sporanges. m^{-3} . Ces échantillons ont été analysés à la fois par ddPCR et LAMP. Les 46 échantillons positifs avec les deux méthodes et présentant un R_t inférieur à 30 minutes ont été utilisés pour créer une courbe standard afin d'évaluer la relation entre le R_t de la LAMP et le logarithme base 10 du nombre de copies d'ITS2. La courbe standard des échantillons d'air montre un R^2 de 0,523 (figure 4). Au cours des premiers stades de l'épidémie, avant le 15 mai 2020 (stade 19 sur l'échelle d'Eichhorn et Lorenz), 37,5 % des échantillons sont testés positifs par ddPCR, contre seulement 8,3 % pour la LAMP (figure 4). L'analyse bayésienne des résultats est basée sur les 88 échantillons d'air collectés dans le vignoble. Avec une valeur de 3,2, le $LR(+)$ est supérieur à 1, ce qui traduit la bonne capacité de la LAMP à détecter la présence probable de l'agent pathogène, et donc un risque épidémique potentiel. Le $LR(-)$ a une valeur de 0,27 ; il est positif et proche de 0. Il montre donc également la capacité de la LAMP à indiquer l'absence probable de l'agent pathogène et indique donc un faible risque épidémique. Le coefficient Kappa, K révèle une valeur de concordance moyenne selon Desquilbet (2012). Sur l'ensemble de la campagne d'échantillonnage, la probabilité d'obtenir un faux négatif est de 0,36. Ces scores de qualité moyenne indiquent la performance relative de la LAMP sur la détection de faibles concentrations

de sporanges dans l'air au début de l'épidémie (avant le 15 mai en 2020). Ce risque de manquer la détection de l'évènement à l'origine d'un processus épidémique nous semble trop élevé à l'échelle d'un piège isolé. Afin d'éviter tout risque de perte économique au viticulteur, nous considérons que la mesure de l'inoculum local doit être mise en relation avec d'autres indicateurs. La décision de traitement ne peut être prise uniquement à partir d'un indicateur de la sporée aérienne. Nous proposons que cette incertitude de détection de la mesure et le risque qu'elle représente, soient compensés par l'augmentation du nombre de pièges. Notre stratégie repose ainsi sur l'organisation d'une analyse et l'interprétation des résultats sur un large réseau de mesures. En effet, le prix et les délais nécessaires à la réalisation d'une détection par ddPCR ne permettent pas à ce jour d'envisager cette méthode comme technique de substitution pour des mesures fiables en début de campagne.

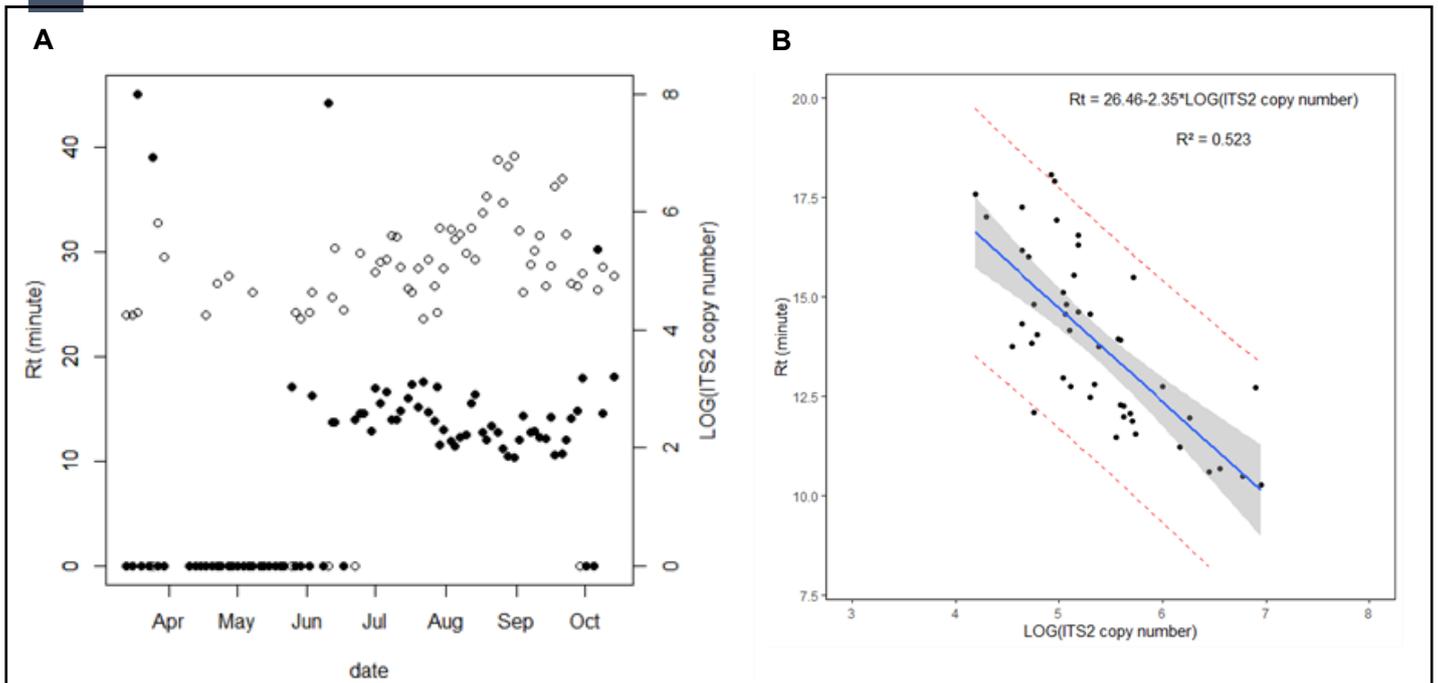


Figure 4 : Résultats des analyses LAMP et ddPCR de séries d'échantillons provenant de la parcelle non traitée du Château Dillon, du 13 mars 2020 au 14 octobre 2020. A : Représentation des séries temporelles de 88 échantillons en LAMP (● ; axe de gauche) et en ddPCR (○ ; axe de droite). B : Régressions linéaires entre la valeur Rt obtenue par LAMP et le log(nombre de copies ITS2) obtenu par ddPCR ("○" et valeurs Rt supérieures à 30 minutes exclues).

3. OPTIMISATION DE LA CAPTURE DE SPORANGES AÉROPORTÉS EN PARCELLE VITICOLE PAR CAPTEUR À BRAS ROTATIF

La nature de l'information apportée par la mesure de la sporée de micro-organismes pathogènes va dépendre directement de la méthode choisie. Le premier choix concerne le type de capteur. Dans ce travail, notre choix s'est arrêté sur le capteur actif par impaction ou capteur à bras rotatif (marque Sporestick® ; OptiSense Limited). Il s'agit d'un bras mis en rotation rapide (2400 rpm) sous l'action d'un petit moteur électrique. Ce bras porte à chacune de ses extrémités un collecteur, soit un bâtonnet en bois enduit de vaseline. Ce type de capteur est facile à manutentionner et donc à utiliser en routine. Il s'agit du capteur principalement conseillé dans la bibliographie pour ce type de suivi (Van der Heyden et al., 2021). La collecte de spores est peu impactée par la vitesse du vent ou la taille des particules (quand leur diamètre est supérieur à 10µm) (Atkinson et al., 2018 ; Torfs et al., 2019). En résumé, ce capteur a l'avantage de capturer l'ensemble des spores et sporanges présents dans un vignoble indépendamment de leurs tailles, ce qui reste un prérequis du projet VISA. Ici sont présentés les résultats obtenus sur deux

dispositifs expérimentaux durant trois années de suivis, visant à apporter des éléments de réponses à l'aérobiologie de *Plasmopara viticola*, ainsi que des questions d'ordre pratique, sur l'utilisation des capteurs à bras rotatifs. Le premier dispositif vise à déterminer s'il existe un rythme circadien d'émission des sporanges. La deuxième expérimentation vise à définir une hauteur optimale de positionnement des capteurs, notamment en fonction des différentes phases – initiation/propagation - du cycle épidémique au cours de la saison. Bien sûr, un des objectifs de cette partie est de définir le cadre opérationnel optimal du protocole de capture pour favoriser la pertinence spatio-temporelle des données collectées.

L'évolution journalière de la concentration aérienne de spores et sporanges impacte le protocole de suivi des pathogènes concernés. Pour la grande majorité des espèces fongiques, la sporulation combine une phase de production de spores majoritairement nocturne, et une phase d'émission majoritairement diurne. La temporalité d'émission de propagules est plus ou moins structurée en fonction des espèces, la plupart des études s'intéressant à la périodicité de captures de spores chez les champignons / oomycètes concluent à des pics quotidiens d'émission compris entre 8h et 17h (Van der Heyden et al., 2021). De ces spécificités vont dépendre l'heure d'échantillonnage optimale, sa durée et sa fréquence, pour déterminer le meilleur compromis entre lourdeur de l'échantillonnage et précision de la détection. Six capteurs à bras rotatif sont disposés en ligne au-dessus de la canopée sur une potence en bois, à 130 cm au-dessus du niveau du sol. Les capteurs sont programmés pour entrer successivement en rotation pendant 4 heures chaque jour sur chacune des 6 tranches horaires préalablement définies (de 1h à 5h, de 5h à 9h, de 9h à 13h, de 13h à 17h, de 17h à 21h, et de 21h à 1h UTC). Les résultats sont analysés par millésime, afin de déterminer, indépendamment des conditions climatiques annuelles fortement variables, si une tranche quadri-horaire est plus propice à la capture de sporanges qu'une autre. La variable étudiée est la concentration aérienne en sporanges capturés pour une tranche horaire rapportée à la concentration aérienne en sporanges totale mesurée sur la journée (Albelda et al., 2005 ; Fernandez Gonzalez et al., 2009). La concentration journalière totale est estimée en sommant les concentrations obtenues pour chaque tranche horaire pour un jour donné. Elle est appelée Proportion de l'Emission Quotidienne (PEQ) et exprimée en pourcentage (%).

De manière générale, les émissions sont plus faibles la nuit (entre 21h et 5h) que la journée (entre 5h et 21h). La figure 5 illustre les résultats des proportions d'émissions quotidiennes moyennes pour les trois années 2019, 2020 et 2021. Aucun effet de la variable « tranche horaire » sur la variance ne semble se dégager pour les années 2019 et 2020. Une légère tendance semble se dégager pour la tranche 17h-21h en 2019, et celles de 13h-17h, et 17h-21h en 2020, sans que ces tendances ne soient statistiquement significatives. Pour l'année 2021, la tranche horaire de 9h-13h présente une proportion d'émission quotidienne moyenne significativement plus élevée que les autres, mais pas différente de l'intervalle 13h-17h. De la même manière, les tranches horaires de 21h-1h et 1h-5h font parties du groupe statistique avec les proportions moyennes les plus faibles. La sporulation de *P. viticola* est décrite comme se déroulant la nuit (Blaeser et Weltzien, 1978 ; Brook, 1979 ; Rumbolz et al., 2002) ce qui est en accord avec la notion générale proposée par Van der Heyden et al. (2021) d'une production de spore nocturne et d'une émission diurne. Cependant, pour certaine date en 2019, 2020 et 2021, l'entièreté de la sporée quotidienne est émise la nuit (figure 5). Par ailleurs, Williams et al. (2007) montrent que l'efficacité d'infection est beaucoup plus importante en l'absence de lumière. L'importance des émissions nocturnes, même plus faibles en quantité de sporanges émis, ne doit pas être négligée. Caffi et al. (2013) suggèrent que l'émission de sporanges serait induite par des variations d'humidité relatives, ce qui est également montré chez d'autres oomycètes comme *Peronospora destructor* (Leach et al., 1982) et *Bremia lactucae* (Su et al., 2000). Les résultats d'Albelda et al. (2005) sont obtenus grâce à des captures réalisées des jours sans pluie. Ils correspondent à la tendance observée dans notre essai en 2019 et 2020. Or, pour ces deux années les prélèvements sont réalisés majoritairement en août,

mois plutôt secs pour ces millésimes. En 2021 où l'été est beaucoup plus pluvieux, le pic significatif se trouve plus en milieu de journée. Ces corrélations semblent concorder dans la mesure où les conditions météorologiques dans une parcelle agricole évoluent au cours d'une journée, avec un maximum de température et un minimum d'humidité généralement atteints lorsque le soleil est à son zénith, en l'absence de précipitation, autour de 12h. L'heure serait alors un indicateur de l'itinéraire climatique à une échelle de la journée plus qu'une variable à effet direct.

La disposition des capteurs dans les rangs de vigne afin de suivre l'évolution de la sporée

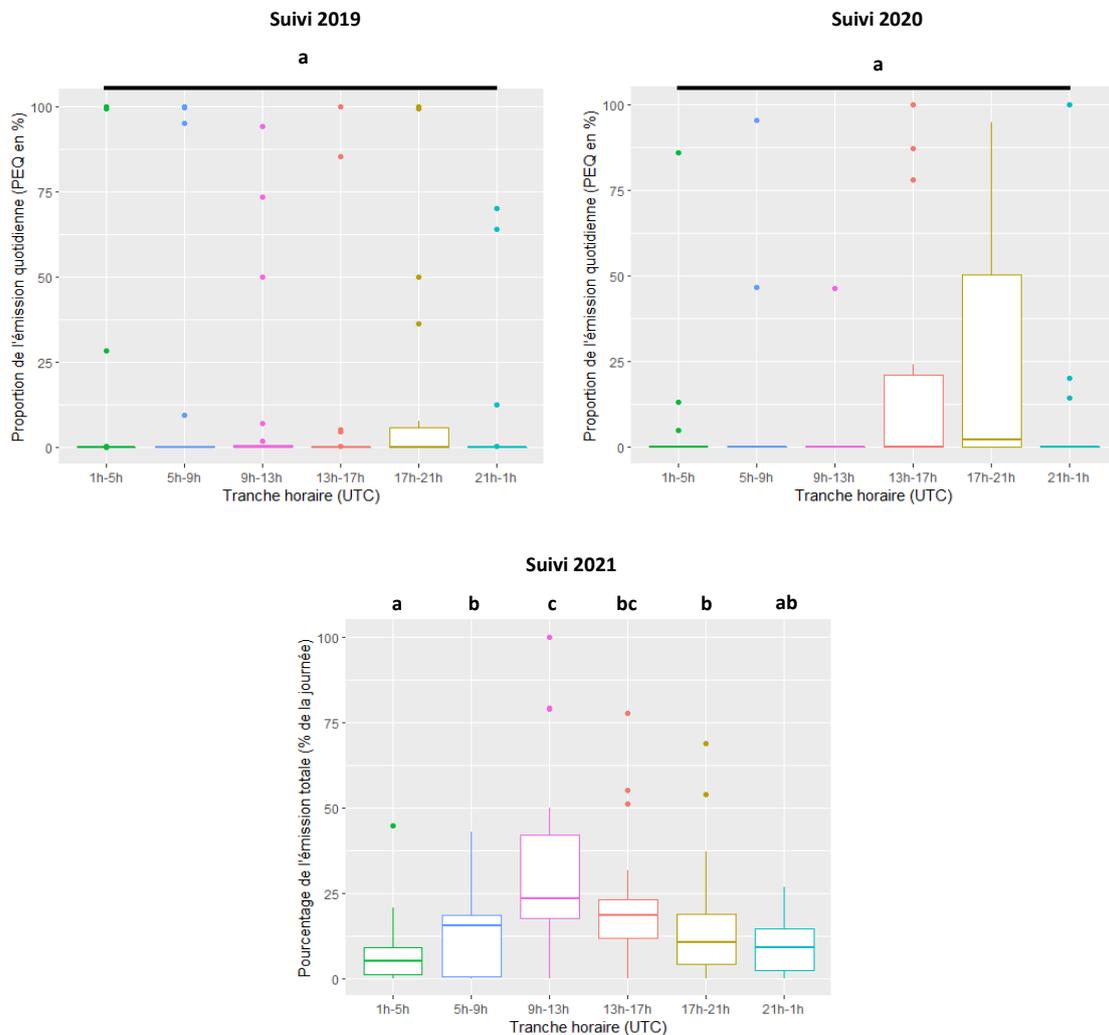


Figure 5 : Graphique en boîte représentant le PEQ moyen pour chaque tranche horaire pour les années 2019, 2020 et 2021

de *P. viticola* doit prendre en compte le motif de dispersion de ses propagules. Le cycle biologique de l'oomycète implique une diversification des sources d'émissions de particules infectieuses au cours de la saison, entre forme sexuée et forme asexuée. Les formes de conservation hivernale du pathogène se trouvent majoritairement au niveau du sol, qui joue alors le rôle de première source d'émission. Les parties aériennes présentant des symptômes deviennent également source d'émission, sans que le sol ne perde complètement ce rôle. La question du positionnement des capteurs, pour le suivi d'autres espèces de champignons pathogènes, a été soulevée dans plusieurs travaux largement rapportés dans l'article de Van der Heyden et al. (2021). Il semble ne pas exister de hauteur de capture optimale et celle-ci dépendrait surtout de l'objectif de l'étude. L'idéal est de pouvoir comparer plusieurs hauteurs (Aylor, 2017) afin de déterminer celle qui correspond le mieux à l'hypothèse de travail. Le but de cette expérimentation est d'évaluer la pertinence de trois hauteurs de capture sur l'efficacité de détection des sporanges de *P. viticola*

au sein d'une parcelle de vigne. Pour ce faire, trois capteurs à bras rotatif sont positionnés sur un piquet de palissage à 30 cm, 80 cm et 130 cm au-dessus du niveau du sol.

Le cumul de la quantité de sporanges capturés pour les 3 hauteurs sur deux parcelles pour l'année 2021 est présenté dans les figures 6 et 7. Les flèches représentent la date de première capture pour chaque hauteur. En 2021, sur la parcelle n°1, la première capture positive sur le capteur à 130 cm du sol est le 06 juin, la première sur le capteur à 80 cm du sol est le 22 juin, la première sur le capteur à 30 cm du sol est le 13 juin. Sur la parcelle n°2, la première capture positive sur le capteur à 130 cm du sol est le 02 mai, la première sur le capteur à 80 cm du sol est le 29 juin, la première sur le capteur à 30 cm du sol est le 29 mai. La série de captures réalisée en 2021 est la seule à commencer dès le début de saison. Même si l'analyse de variance ne permet pas de mettre en évidence un effet significatif de la hauteur du piège sur la quantité de sporanges capturés, la première détection est observée sur les capteurs positionnés à 130 cm du sol, c'est-à-dire au-dessus de la canopée, pour les deux parcelles suivies.

Ce résultat corrobore l'hypothèse du modèle gaussien de dispersion atmosphérique, avec un effet source marqué (Severns et al., 2019). Plus le capteur est proche de la source d'émission, qui est la litière et le sol en début de campagne, plus la quantité de bioaérosol émise est concentrée dans un petit volume d'air. Plus l'on s'éloigne de la source d'émission, plus le volume d'air contenant les bioaérosols émis s'agrandit. Parallèlement, la probabilité que le capteur soit contenu dans ce volume, et donc qu'il capte un bioaérosol, augmente également. Ce résultat confirme le consensus proposé par Van der Heyden (2021) de placer les capteurs au-dessus de la canopée pour suivre l'inoculum de la parcelle. Cependant, il serait également intéressant de tester des méthodes de captures passives à différentes hauteurs. En effet, elles sont décrites dans la littérature comme complémentaires des méthodes de captures actives (Aylor, 2017).

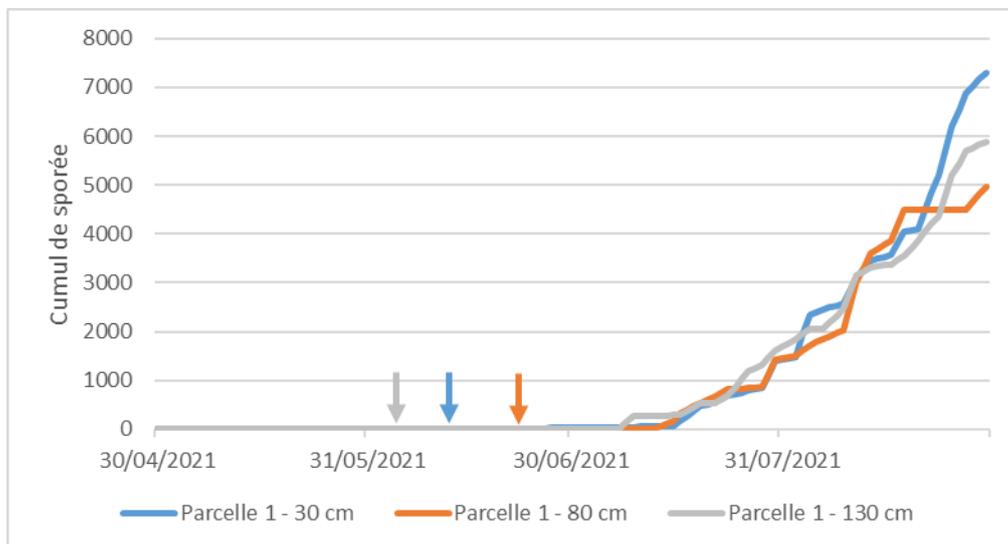


Figure 6 : Graphique représentant le cumul de sporée (en sporanges.m⁻³) pour chaque hauteur de capture, sur la parcelle n°1.

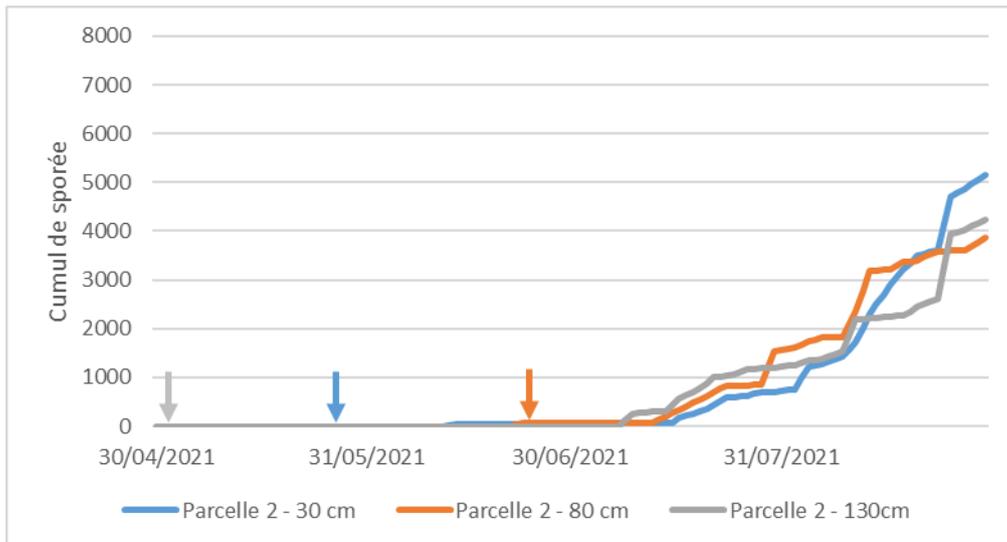


Figure 7 : Graphique représentant le cumul de sporée (en sporanges.m⁻³) pour chaque hauteur de capture, sur la parcelle n°2.

4. CRÉATION D'INDICATEURS POUR UNE PREMIÈRE INTÉGRATION DE LA MESURE DE SPORÉE DANS LA PRÉVISION DU RISQUE ÉPIDÉMIQUE

Les objectifs de cette troisième et dernière partie sont i) d'éprouver en conditions de production la méthode de capture et de quantification de sporanges aéroportés précédemment développée ; ii) d'identifier les relations entre itinéraire climatique, concentration en sporanges aéroportés et évolution des symptômes, selon deux stratégies de protections phytosanitaires. Cette mise à l'épreuve permettra d'avoir un aperçu du profil global d'émission de sporanges au cours d'une année ainsi que l'enchaînement des événements conduisant ou non à l'apparition d'une épidémie de mildiou. Pour réaliser cette preuve de concept, nous disposons d'un dispositif expérimental composé de 6 capteurs de sporanges positionnés dans un îlot de parcelles de 1,22 hectares, subissant un même itinéraire climatique durant trois années de suivi. Confronté à la difficulté de corréliser les différentes variables mesurées entre elles de manière individuelle, la stratégie alternative retenue a été de créer des indicateurs composites, permettant de simplifier la mise en relation des différentes composantes de l'épidémie (tableau 1). La pertinence des différents indicateurs sera évaluée. L'expérimentation est réalisée sur le vignoble de l'unité expérimentale de l'INRAE de Villenave d'Ornon, Nouvelle Aquitaine. La région Nouvelle Aquitaine est soumise à un climat océanique marqué par des températures moyennes annuelles douces et des niveaux de précipitations élevés. Les six parcelles de Merlot suivies sont réparties en 3 blocs. Chaque bloc contient deux parcelles conduites selon des pratiques phytosanitaires différentes :

- une stratégie de protection sécurisée, utilisant tous types de spécialités commerciales autorisées par l'homologation (produits de contact, pénétrants ou systémiques). Les traitements majoritairement préventifs commencent avant l'apparition des premiers symptômes ;
- une stratégie de protection minimale, basée sur la seule application de produits de contact et pour laquelle les traitements commencent après l'apparition du premier symptôme repéré.

Tableau 1 : Résumé des indicateurs créés pour faciliter l'interprétation des mécanismes épidémiques

Indicateur météo du potentiel infectieux	Il s'agit d'un indicateur exprimé sans unité, traduisant la fenêtre horaire météorologique favorable à la contamination. Son élaboration résulte d'une estimation des conditions favorables à l'infection par le mildiou basée sur la littérature, en termes de présence d'eau libre et de température : elle prend donc en compte la présence d'eau libre sur une plage de température adéquate.
Taux de mortalité horaire des sporanges aéroportés	Brischetto et al. (2020) proposent un mode de calcul du taux journalier de mortalité des sporanges basé sur la mesure horaire de la température et de l'humidité relative. Ce mode de calcul est appliqué à nos concentration en sporanges mesurées afin de caractériser la durée d'infectiosité potentielle ou « durée de vie » des pics de sporée détectés et leur rôle possible dans les processus épidémiques des jours suivant leur apparition.
Indicateur épidémique unique	Cet indicateur a été raisonné en termes de surfaces extérieure des organes sensibles de la vigne, en prenant en compte leur variabilité de sensibilité au cours de la croissance végétative de la vigne. Il permet de compiler les taux d'attaque sur feuille et sur grappe au sein d'une valeur commune.

Le taux de mortalité quotidien permet le calcul d'un indicateur de sporée total estimé prenant en compte la sporée du jour J et des jours précédents avec :

- la sporée mesurée par capture et quantifiée par LAMP pour le jour J ;
- la sporée résiduelle (i.e. sporée viable), calculée d'un jour à l'autre sur une séquence pluri-journalière en fonction du taux de mortalité ;
- la sporée totale estimée, prenant en compte la sporée capturée du jour J et la sporée résiduelle pour le même jour.

Le suivi sanitaire des parcelles permet de déterminer deux grandes phases dans l'évolution épidémique de chaque millésime : une phase pré-symptomatique et une phase post-symptomatique déclenchée dès l'apparition du premier symptôme. Cette approche en deux temps se justifie par le cycle de vie du pathogène. En l'absence de symptôme dans les parcelles, la probabilité de détection de formes asexuées est très faible. L'hypothèse la plus probable est qu'il s'agisse de formes sexuées provenant du sol. Lorsque les symptômes, lieux de la reproduction asexuée, apparaissent, l'hypothèse précédente ne peut être maintenue. Ces phases ont donc été traitées séparément dans l'analyse statistiques des données. La corrélation présentée dans cette synthèse porte sur la phase pré-symptomatique. Elle vise à établir la relation entre l'itinéraire climatique, les événements de capture de la sporée, et la vitesse moyenne d'évolution de l'indicateur épidémique, calculée pour un pas de temps de 7 jours (figure 8).

Différentes variables explicatives ont été étudiées pour cette phase pré-symptomatique :

- La somme de l'indicateur météo du potentiel infectieux, calculée pour les seuls jours de captures de sporanges, ou alors pour les jours incluant aussi la sporée totale estimée (capturée + résiduelle viable) ;
- La somme de la sporée capturée ou de la sporée totale estimée (capturée + résiduelle calculée) ;
- La somme des produits de l'indicateur météo du potentiel infectieux avec la sporée capturée uniquement, ou de l'indicateur météo du potentiel infectieux avec la sporée totale, le tout à l'échelle journalière.

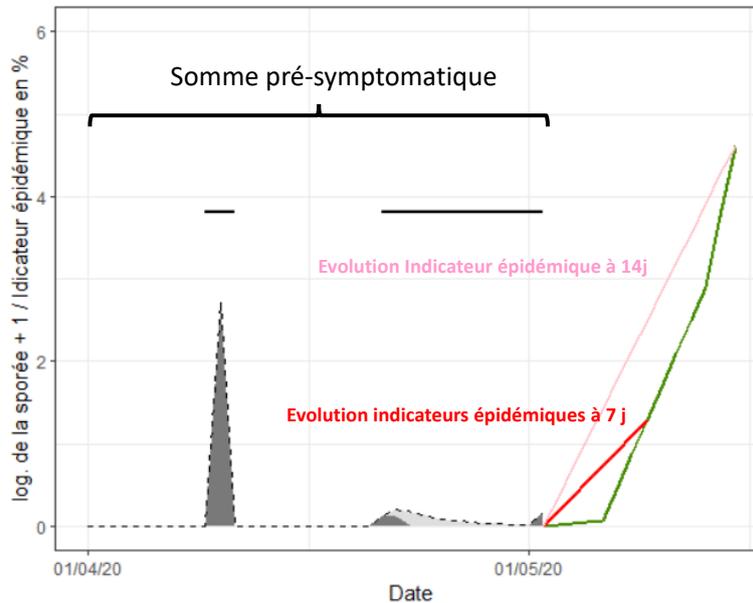


Figure 8 : Précision autour des variables utilisées pour la mise en relation entre sommes d'indicateurs pré-symptomatiques et vitesse d'évolution de l'indicateur épidémique en début d'épidémie

Nota : La surface en gris foncé représente la sporée capturée ; la surface en gris clair représente la sporée résiduelle et la courbe en pointillée représente la sporée totale. La courbe verte représente l'évolution de la valeur de l'indicateur épidémique. Ici, seule la somme pré-symptomatique de l'indicateur de sporée est présentée. Le calcul de la somme pré-symptomatique de l'indicateur météo du potentiel infectieux et de l'indicateur composite météo et sporée suivent la même méthode (non représentées sur ce graphique).

Profil d'émission et évolution de l'indicateur épidémique

Un exemple de l'évolution temporelle de la sporée capturée et totale et de l'indicateur épidémique pour les parcelles stratégie de protection « modérée » est présentée dans la figure 9. Les trois millésimes de suivi présentent des niveaux de pression épidémique différents avec une pression faible en 2019 (IE moyen en fin de saison sur les 6 parcelles = 3,5%), une pression forte en 2020 (IE moyen en fin de saison = 29,8%) et une pression moyenne arrivée tardivement en saison 2021 (IE moyen en fin de saison = 12,9%). Globalement, la fréquence et les niveaux de captures sont les plus faibles en période pré-symptomatique. Conjointement à l'apparition et à l'augmentation des symptômes (début de la phase post-symptomatique), les captures sont plus fréquentes avec des concentrations en sporanges aéroportés plus élevées. Puis en fin de saison, à partir de mi-août à début septembre environ, des captures quasiment quotidiennes sont observées avec les niveaux de concentration en sporée aérienne les plus élevés. Ainsi, la grande majorité des captures se révélant positives sont réalisées durant la phase post-symptomatique (89% des captures en 2019, 97% des captures en 2020 et 94% des captures en 2021).

Relation entre les conditions météo favorables à l'infection et niveaux de sporée durant la phase pré-symptomatique, et la vitesse d'apparition des premiers symptômes

Il existe une corrélation positive et significative entre la vitesse d'évolution des symptômes lors des 7 premiers jours du démarrage épidémique, avec la somme de l'indicateur météo du potentiel infectieux durant l'entièreté de la phase pré-symptomatique, ou avec la somme des différentes mesures de sporées (capturées ou totales) sur la même période. Les corrélations les plus fortes sont retrouvées pour les variables combinant l'indicateur météo du potentiel infectieux avec les valeurs de sporée (capturée et totale). En effet, la valeur du R^2 pour chaque régression linéaire est la plus faible pour l'indicateur météo du potentiel infectieux (0,21 et 0,30). Elle est la

plus forte pour l'indicateur combinant l'indicateur météo du potentiel infectieux avec la sporée (0,73 et 0,59 ; encadrée en rouge sur la figure 10). La dispersion des points pour ces variables composites est caractéristique d'un effet seuil de détection, en deçà duquel la sporée n'est pas détectée, alors qu'une évolution de symptôme est observée (figure 10, encadré rouge). Par exemple, lorsque la vitesse d'évolution de l'indicateur épidémique à 7 jours est faible, inférieure à $0,1\%.jr^{-1}$ (soit une évolution de la valeur du IE de 0% à 0,7% en une semaine), les indicateurs composites de sporée et d'itinéraires climatiques d'infection sont quasiment nuls. Cet effet seuil peut s'expliquer par le manque de sensibilité de notre méthode de suivi durant les phases pré-symptomatiques. En effet, les concentrations en sporanges à cette période de la saison dépassent rarement la limite de quantification qui est pour rappel de $3,33 \text{ sporanges.m}^{-3}$. Seules 9,8% des concentrations analysées durant cette phase dépassent ce seuil. La sporée capturée en phase pré-symptomatique est très probablement sous-estimée. Les émissions de faibles concentrations de sporanges ne sont pas ou partiellement détectées. Elles suffisent cependant à initier l'apparition de symptômes. L'amélioration de la sensibilité de la méthode permettra probablement d'améliorer, pour les faibles valeurs, la relation statistique entre la combinaison de la sporée et l'indicateur météo de potentiel infectieux et la vitesse d'apparition des symptômes. Cette sous-estimation induit que l'ensemble des valeurs calculées à partir de cette mesure, somme de la sporée mesurée et totale et somme de l'indicateur météo du potentiel infectieux, l'est également. Cette sous-estimation en période pré-symptomatique renforce la conclusion de la première partie concernant la nécessité d'améliorer le seuil de détection et de quantification de la méthode de suivi. Une première voie d'amélioration du protocole de biologie moléculaire, serait d'optimiser l'étape d'extraction, en ajoutant une étape de lyse thermique. Elle permettrait d'obtenir des ADN de meilleure qualité. Une deuxième voie serait d'ajouter des capteurs passifs dans la parcelle pour être plus représentatif de l'activité du pathogène, en démultipliant le nombre de points mesures. L'extraction simultanée de l'ensemble des collecteurs permet de concentrer l'ADN pour une date d'échantillonnage et d'augmenter la probabilité de se situer au-dessus de la limite de quantification de la méthode.

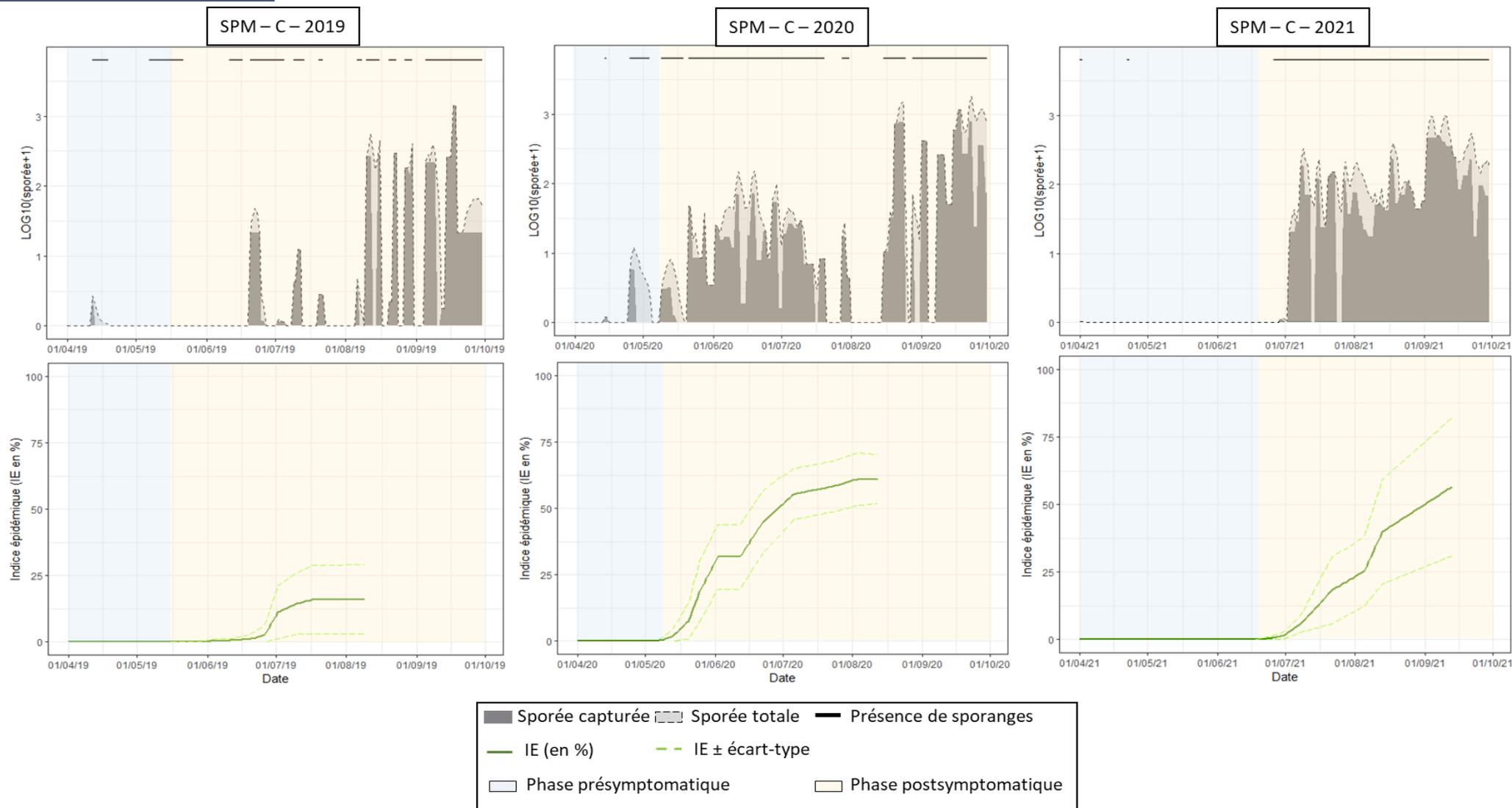


Figure 9 : Graphiques représentant la valeur du Logarithme de la sporée capturée + 1, Logarithme de la sporée totale + 1 ainsi que l'évolution de l'indicateur épidémique pour la parcelle en protection minimale du bloc C en 2019, 2020 et 2021

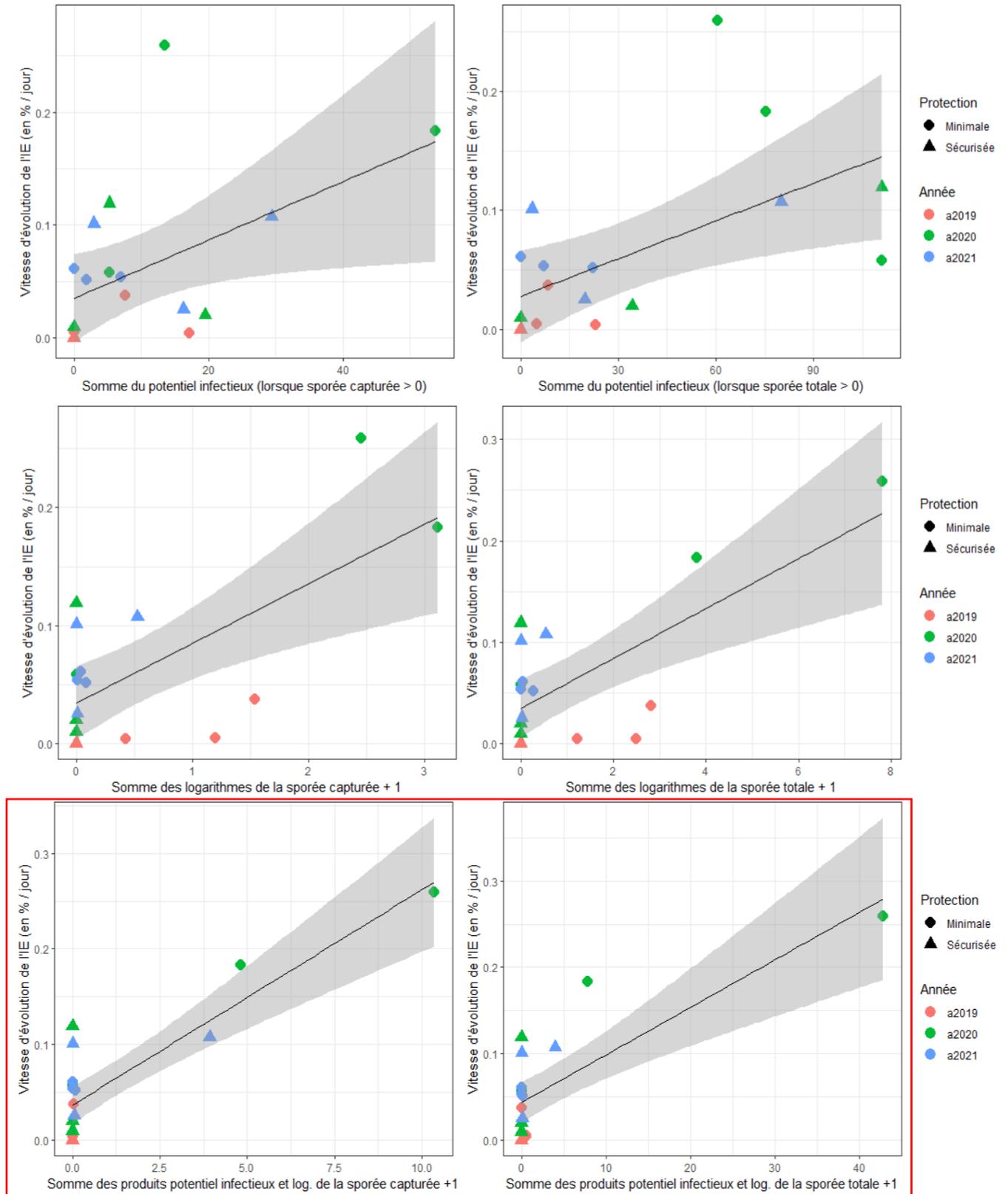


Figure 10 : Régressions linéaires entre les différents indicateurs : Somme du potentiel infectieux (lorsque sporée capturée > 0), Somme du potentiel infectieux (lorsque sporée totale > 0), Somme des logarithmes de la sporée capturée + 1, Somme des logarithmes de la sporée totale + 1, Somme des produits journaliers potentiel infectieux et log. de la sporée capturée + 1 et Somme des produits journaliers potentiels infectieux et logarithme de la sporée totale + 1

5. DISCUSSION

Un effort particulier a été maintenu dans la conception de la méthode pour conserver un potentiel de transfert vers la filière viticole. Une évaluation préliminaire propose un coût d'environ 1000 euros annuel pour le suivi saisonnier d'un site sur la base d'un capteur déployé, dans les conditions actuelles de captures et d'analyse (communication personnelle de B. Laurent ; non publiée). Sans garantie précise du gain associé à l'utilisation de la méthode de capture, le coût actuel de la technologie, pourtant optimisée dans sa conception, ne permet pas à l'heure actuelle le déploiement de l'ensemble des outils chez tous les viticulteurs ou sur toutes leurs parcelles. Toutefois, l'intégration de la méthode dans des règles de décisions de calendrier de traitement, et une estimation plus précise de la diminution IFT permise grâce à son utilisation, permettra de tester la faisabilité économique de l'approche et soutiendra son adoptabilité auprès du plus grand nombre.

Un point majeur d'amélioration de la méthode, en vue de sa capacité à réduire le nombre de traitements, est sa capacité à détecter précisément les éléments contaminants durant la phase pré-symptomatique, par l'amélioration de sa sensibilité. Plusieurs perspectives techniques semblent envisageables à ce sujet, concernant à la fois la méthode moléculaire et la méthode de capture aérobiologique.

Nos résultats ont montré que l'information apportée par la mesure de sporée, était prédictive du développement épidémique dans une échelle de temps inférieure à 14 jours. L'intégration de la mesure de la sporée dans le processus de prise de décision des traitements nécessite donc un délai court entre échantillonnage et analyse. Globalement, une fois installée, l'épidémie est difficile à contrôler, voire impossible à stopper si les conditions favorables au pathogène persistent dans le temps. Ainsi, en l'absence de produits de traitements curatifs efficaces, la lutte contre le mildiou reste donc essentiellement préventive et vise à empêcher la contamination et l'installation du parasite dans les cellules et tissus de la plante. Les stratégies les plus efficaces reposent, quel que soit le type de produit utilisé, sur un positionnement au plus près de la contamination, et si possible en amont de l'évènement contaminant. Ce laps de temps court entre la contamination et l'apparition des symptômes justifie ainsi de privilégier une méthode d'analyse rapide pour permettre au viticulteur d'intervenir au plus vite. Dans les conditions actuelles, l'analyse moléculaire développée produit des résultats dans la demi-journée, et reste cohérente à l'échelle de temps de prédiction de l'épidémie. Dans le cadre du réseau participatif, les viticulteurs envoient les échantillons par service postal, et ces derniers sont analysés et mis en ligne sur une plateforme web sous 48h. Il se passe donc environ quatre jours entre le prélèvement et le rendu, et ce délai, bien que satisfaisant, pourrait être amélioré. Les temps d'analyses pourraient donc être réduits en rapprochant l'analyse des lieux de prélèvement, et en démultipliant les centres d'analyses sur le territoire. En d'autres termes, l'analyse pourrait être externalisée dans des laboratoires de proximité, qui pourraient être, dans certains cas directement internalisés par les propriétés viticoles. La difficulté ici est de structurer l'activité de telle manière que l'information puisse être interoperable entre sites d'analyse, et mises à dispositions des instituts, à des fins de recherche et de développement.

Comment la mesure aérobiologique participe-t-elle à la réduction des usages de fongicides ? Le réseau VISA : un support pour l'élaboration d'indicateurs de pilotage des stratégies de traitements.

Cette étude s'inscrit dans un projet de plus grande envergure, incluant comme décrit précédemment la mise en place d'un réseau participatif de capture aérobiologique chez un ensemble de viticulteurs partenaires. La collaboration étroite entre ce collectif et les instituts de recherche est particulièrement intéressant car il permet une certaine flexibilité dans le

développement technique, tout en s'assurant qu'il réponde aux mieux aux besoins de la profession. Ainsi, une première expérimentation de pilotage des traitements phytosanitaires en condition de production a été menée dès 2022 chez des viticulteurs partenaires du réseau VISA. En l'absence de recul fiable sur la relation quantitative entre mesure de sporée et risque épidémique à cette date, cette expérimentation visait à inclure la présence/absence de sporanges dans le processus de prise de décision, afin de retarder la date des premiers traitements phytosanitaires. L'évaluation du risque basé sur les observations et les prévisions météorologiques reste la méthode de référence, car la plus éprouvée à ce jour et la seule à permettre l'anticipation des développements épidémiques. La mesure de la sporée complétée par la donnée d'observation de l'apparition des premiers symptômes sur les parcelles du viticulteur ou celles du réseau, permet de pondérer cette prévision météorologique du risque. Un exemple de rapport technique du Château Léoville-Las Cases rapporte un recul de 21 jours de la date de premier traitement sur l'expérimentation VISA, par rapport à la stratégie de protection classique du château. Dans l'ensemble, sur les 10 sites expérimentaux suivis en 2022, la règle de décision VISA a permis d'économiser de 1 à 4 traitements, sans perte économique déclarée (Douillet et al., 2022b). L'expérimentation est très intéressante car elle permet une première estimation de la faisabilité économique de la méthode : sur la base d'une protection anti-mildiou coûtant entre 600 et 800 euros/ha/an (Pinto et al., 2012), une réduction d'uniquement 20% des usages phytosanitaire anti-mildiou, sur une propriété de 9 ha, soit la surface moyenne des exploitations à l'échelle nationale, permet un gain direct de 1080-1440 euros. Bien sûr les gains seront supérieurs lorsque l'outil permettra l'analyse d'autres pathogènes, notamment l'oïdium, sans compter les bénéfices indirects comme l'amélioration globale de la santé de l'écosystème viticole - incluant la santé des salariés et des riverains, ou de l'image de marques associée à une viticulture durable.

Notre stratégie de développement, à la faveur d'un déploiement territorial de mesures aérobiologiques à l'échelle de la Nouvelle-Aquitaine, participe tout d'abord à générer les données nécessaires pour mieux comprendre et intégrer les interactions entre environnement, sporée et plante, dans des terroirs et au travers de pratiques techniques variées. Ainsi, l'approche multi-sites est un atout majeur pour modéliser ces relations complexes et calibrer des indicateurs pertinents permettant le pilotage des traitements phytosanitaires, mais aussi pour comprendre l'effet de pratiques et de terroirs sur la capture de spores et plus globalement, sur l'épidémiologie générale du mildiou de la vigne. La conception de ce type d'outils nécessite d'approfondir l'effort d'homogénéisation de l'acquisition de données. Il peut s'agir du choix de la source de données climatiques, de la méthode de capture aérobiologique, ou de la nature des données biologiques du végétal. De plus, les techniques de l'agriculture de précision restent encore trop onéreuses pour permettre d'envisager leur déploiement auprès de tous les viticulteurs. L'interpolation spatiale de la donnée de la mesure de sporées entre sites, à l'aide de méthodes géostatistiques (Vélez-Pereira et al., 2021) permettrait de communiquer une information, bien que certainement plus imprécise, à un public beaucoup plus élargi. La qualité des résultats d'une telle approche de spatialisation est fortement dépendante de la qualité des données et de la densité du réseau, dont il faut privilégier le nombre de points de mesures le plus élevé possible. Cet effort de synthèse de l'information, sous forme de cartes de risques compilant les mesures climatiques et biologiques par exemple, pourra ainsi être porté dans des bulletins techniques tels que le Bulletin de Santé du Végétal et permettra de rendre les résultats du projet VISA accessibles à l'ensemble des acteurs de la filière.

Quelles sont les autres perspectives d'utilisation de l'aérobio-surveillance agricole, au-delà de l'utilisation dans du conseil au pilotage de stratégie de traitements phytosanitaires ?

L'effort d'échantillonnage réalisé sur le réseau de surveillance biologique constitue une ressource biologique précieuse pour de nombreuses autres applications. Un avantage conséquent de l'analyse moléculaire est l'accès à l'ADN environnemental qui ouvre des portes multiples sur la compréhension globale de l'écosystème microbien viticole. L'accès au matériel génétique de la

sporée de *P. viticola* peut constituer une source importante d'information sur l'évolution des populations de mildiou de la vigne. Le couplage entre données épidémiques (quantité de spores) et données génétiques, dans le cadre d'étude de démo-génétique, constitue une perspective intéressante de ce travail de thèse.

Par exemple, afin de tenter d'apporter des premiers éléments de réponses aux questionnements sur la synchronisation des cycles sexués et asexués, le travail de Yolaine Fougerousse, étudiante de Master encadrée durant la thèse a conduit, entre autres, à la création d'un ensemble de marqueurs moléculaires permettant d'étudier la diversité génétique composant les populations de *P. viticola* en milieu viticole, directement à partir des captures de sporanges (Fougerousse, 2022). L'hypothèse principale de cette approche est que le niveau de diversité génétique des sporanges capturés dans l'atmosphère reflète la contribution relative de la reproduction sexuée ou asexuée en saison. Cette hypothèse est à contextualiser par le niveau de gravité de l'épidémie à l'échelle locale qui augmente la probabilité de transport inter-parcellaire de formes asexuées, bien qu'on puisse imaginer que du transport aérien d'inoculum issu de la reproduction asexuée augmenterait de toute manière le taux de clonalité à la parcelle. Ces marqueurs moléculaires pourraient permettre d'explorer la relation entre le profil épidémique d'un millésime et l'évolution de la diversité génétique de la population de pathogène.

De récentes avancées nées de la collaboration entre l'UMR SAVE et l'IFV au sein de l'UMT SEVEN ont conduit, entre autres, à la mise au point d'une méthode de quantification moléculaire de l'inoculum primaire contenu dans les sols viticoles. L'application de tels marqueurs sur de l'ADN extrait d'échantillons de sol en début de saison pourrait améliorer le monitoring de la phase pré-symptomatique, en termes de quantité de sporée et de diversité génétique, et sa relation avec le début de l'épidémie. Les suivis pluriannuels réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en évidence une forte émission de sporanges (formes sexuées et/ou asexuées) à la fin de l'été. Plusieurs études rapportent une contamination issue d'oospores durant cette période (Kennelly et al., 2007 ; Rouzet et Jacquin, 2003). Il s'agit d'une période, pré/post vendange, pendant laquelle les traitements phytosanitaires sont stoppés (entre le 1er et le 15 août pour la dernière application) et dont le climat, notamment la nuit, redevient plus propice au développement de l'oomycète (températures moyennes plus douces et humidité relative plus importante). Les millésimes 2021 et 2022 sont caractérisés par des épidémies de mildiou tardives, comparées à celles habituellement beaucoup plus précoces en Gironde débutant dès les mois d'avril ou mai. En 2021, les premiers symptômes sont apparus à la fin du mois de juin, et les captures ont été très abondantes dès l'apparition des symptômes. En 2022, année particulièrement chaude et sèche, peu d'émission et de symptômes ont été détectés. Une forte attaque des jeunes tissus foliaires a été observée lors des premières pluies en octobre 2022 sur plusieurs secteurs de la Gironde (communication personnelle de M. Raynal ; non publiée). Cette amplification des signaux de captures concorde avec la période de fécondation et de formation des oospores, dont le génotype résulte de la rencontre aléatoire entre deux individus compatibles. Ces oospores iront rejoindre le pool d'inoculum contenu dans le sol lors de la chute des feuilles. Le monitoring complet des populations de *P. viticola*, de l'inoculum de la parcelle, de la sporée et des symptômes (jusqu'à la chute des feuilles), en termes de quantité et de diversité génétique, est une source d'information nécessaire pour une meilleure compréhension du cycle de vie du pathogène, et de sa relation avec l'évolution des épidémies dans un continuum pluriannuel.

Au-delà d'approche non-ciblée visant à suivre les dynamiques populationnelles, cette même méthode, en ciblant des marqueurs génétiques d'intérêts peut permettre de produire des données qualitatives sur le niveau d'adaptation des populations aux pressions de sélection qu'elle subit, comme par exemple, la résistance aux fongicides, ou bien la virulence vis-à-vis d'un gène de résistance de la vigne. En effet, de nombreux travaux ont mis en évidence des mutations génétiques dans le génome de *P. viticola* qui conduisent à l'émergence de phénomènes de

résistances à certains produits phytosanitaires (Qol, CAA, etc), (voir Massi et al., 2021 pour une revue) et des marqueurs génétiques de ces résistances aux fongicides sont donc disponibles pour la plupart des molécules étudiées. L'inclusion de ces marqueurs dans le monitoring peut appuyer le choix du viticulteur quant à l'efficacité des molécules à appliquer.

De même, le déploiement progressif en France de nouvelles variétés de vigne portant des résistances majeures au mildiou de la vigne conduit à l'apparition de souches virulentes capables de contourner ces résistances. Ce phénomène a été documenté dans plusieurs pays européens et des souches contournant les gènes Rpv3, Rpv10 et Rpv12 ont été maintenant décrites (Paineau et al., 2022). Pour le moment, les facteurs génomiques responsables de ces adaptations n'ont pas été identifiés, mais des études en cours à SAVE (INRAE) devraient déboucher sur leur identification dans les prochaines années (Paineau, 2022). L'Observatoire national du déploiement des cépages résistants dit OSCAR est un dispositif participatif constitué d'un réseau de parcelles de variétés résistantes plantées par les viticulteurs qui sont suivi sur le long terme. L'objectif principal de ce dispositif créé en 2017 par INRAE et IFV, est d'organiser la surveillance du déploiement afin d'anticiper les risques liés à l'évolution des populations de mildiou face à ces résistances (<https://observatoire-cepages-resistants.fr/>). L'utilisation de la capture de sporanges dans ce réseau de parcelles permettrait, par l'analyse de la fréquence et de la distribution des génotypes virulents dans les populations, de disposer plus rapidement d'information sur le niveau d'adaptation des populations à l'échelle locale.

Le cheminement méthodologique de développement et calibration de l'outil présenté dans cette thèse peut facilement être transposé aux autres agents pathogènes cryptogamiques de la vigne, dont les principaux sont *E. necator*, responsable de l'oïdium, *G. bidwellii* à l'origine du Black rot et *B. cinerea* de la pourriture grise. Les amorces LAMP et qPCR pour quantifier la sporée de *E. necator*, *G. bidwellii* et *B. cinerea* sont déjà développées ou en cours de développement (Tomlinson et al., 2010, Thiessen et al., 2016, Moreno-Velázquez et al., 2019). Dans le cas précis de *E. necator*, le suivi de la sporée a été intégrée au pilotage de la protection phytosanitaire et a déjà montré des résultats encourageants (Carisse et al., 2009 ; Thiessen et al., 2016 ; 2017 ; 2018).

La capture par bras rotatif n'est certes pas la plus efficace pour détecter les sporanges de mildiou en période pré-symptomatique. Elle est cependant la méthode la plus recommandée pour un monitoring routinier multi-espèce (Aylor, 2017). Le déploiement du réseau de captures aérobiologiques permet le suivi de la sporée de ces ascomycètes pathogènes de manière simultanée, grâce au multiplexage des quantifications moléculaires. L'interopérabilité de l'échantillonnage d'air et de l'extraction de l'ADN permet, après une étape de mise au point des protocoles de biologie moléculaire, de générer une multitude de suivis sur une série de prélèvement unique, optimisant d'autant plus la viabilité économique du dispositif. Cette stratégie multi-pathogènes est d'autant plus pertinente que les applications de fongicides sont raisonnées globalement à l'échelle d'une exploitation.

Bibliographie

- Albelda, Y., Rodríguez-Rajo, F.J., Jato, V., Aira, M.J., 2005. CONCENTRACIONES ATMOSFERICAS DE PROPAGULOS FUNGICOS EN VIÑEDOS DEL RIBEIRO (GALICIA, ESPAÑA). *Bol. Micol.* 20. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2005.20.0.264>
- ANSES, 2014. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'efficacité de vêtements de protection portés par les applicateurs de produits phytopharmaceutiques (No. 2011- SA- 0216).
- Arena, M., Sgolastra, F., 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23, 324–334. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>
- Atkinson, C.T., Roy, K., Granthon, C., 2019. Economical environmental sampler designs for detecting airborne spread of fungi responsible for Rapid `Ōhi`a Death (Report).
- Aylor, D., 2017. CHAPTER 19: Integrated Pest Management and Decision Support Systems, in: *Aerial Dispersal of Pollen and Spores, Epidemiology*. The American Phytopathological Society, pp. 321–337. <https://doi.org/10.1094/9780890545430.019>
- Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schäfer, R.B., Liess, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 11039–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>
- Blaeser, M., Weltzien, H., 1978. The importance of sporulation, dispersal, and germination of sporangia of *Plasmopara viticola* [grapes]. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*.
- Brischetto, C., Bove, F., Languasco, L., Rossi, V., 2020. Can Spore Sampler Data Be Used to Predict *Plasmopara viticola* Infection in Vineyards? *Front. Plant Sci.* 11, 1187. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01187>
- Brook, P.J., 1979. Effect of light on sporulation of *Plasmopara viticola*. *New Zealand Journal of Botany* 17, 135–138. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1979.10426886>
- Caffi, T., Gilardi, G., Monchiero, M., Rossi, V., 2013. Production and Release of Asexual Sporangia in *Plasmopara viticola* 10.
- Carisse, O., Bacon, R., Lefebvre, A., 2009. Grape powdery mildew (*Erysiphe necator*) risk assessment based on airborne conidium concentration. *Crop Protection* 28, 1036–1044. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.06.002>
- Chen, M., Brun, F., Raynal, M., Makowski, D., 2020. Delaying the first grapevine fungicide application reduces exposure on operators by half. *Sci Rep* 10, 6404. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62954-4>
- Desquilbet, L.L., 2012. Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance.
- Douillet, A., Laurent, B., Beslay, J., Massot, M., Raynal, M., Delmotte, F., 2022a. LAMP for in-field quantitative assessments of airborne grapevine downy mildew inoculum. *Journal of Applied Microbiology* 133, 3404-3412. <https://doi.org/10.1111/jam.15762>
- Douillet, Antonin, Laurent, B., Fougèrouse, Y., Beslay, J., Bordes, A., Delmotte, F., Debord, C., Raynal, M., 2022b. Surveiller le mildiou de la vigne en capturant les spores. *Phytoma. La Défense des Végétaux* 18.
- Douillet, A., Laurent, B., Beslay, J., Delmotte, F., Raynal, M., 2022c. In-field LAMP quantification of *Plasmopara viticola* airborne inoculum to improve the forecast of epidemic risk. *BIO Web Conf.* 50, 01001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20225001001>

- Douillet, Antonin, Laurent, B., Beslay, J., Harte, I., Massot, M., Delmotte, F., Raynal, M., 2022d. Is airborne *Plasmopara viticola* spore quantification a spatially stable indicator of grapevine downy mildew epidemic risk on a plot scale? Presented at the Journées Jean Chevaugéon - SFP, Aussois.
- Fernandez-Gonzalez, M., Rodriguez-Rajo, J., Jato, V., Aira, J., 2009. Incidence of fungals in a vineyard of the denomination of origin ribeiro (Ourense - north-western Spain). *Ann Agric Environ Med* 16, 263–271.
- Fontaine, M.C., Austerlitz, F., Giraud, T., Labbé, F., Papura, D., Richard-Cervera, S., Delmotte, F., 2013. Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Molecular Ecology* 22, 2771–2786. <https://doi.org/10.1111/mec.12293>
- Gessler, C., Pertot, I., Perazzolli, M., 2011. *Plasmopara viticola*: A review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* 50, 3–44. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* 83, 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Jallas, E., Crétenet, M., 2003. Aide à la décision en agriculture et gestion des ressources naturelles : note introductive, in: Jamin, J.-Y., Boukar, L.S., Floret, C. (Eds.), *Savanes Africaines : Des Espaces En Mutation, Des Acteurs Face à de Nouveaux Défis*. Cirad - Prasac, Garoua, Cameroon, p. 8 p.
- Kennelly, M.M., Gadoury, D.M., Wilcox, W.F., Magarey, P.A., Seem, R.C., 2007. Addressing the Gaps in our Knowledge of Grapevine Downy Mildew for Improved Forecasting and Management. *Plant Health Progress* 8, 66. <https://doi.org/10.1094/PHP-2007-0726-03-RV>
- Kim, K.-H., Kabir, E., Jahan, S.A., 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment* 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kong, X., Qin, W., Huang, X., Kong, F., Schoen, C.D., Feng, J., Wang, Z., Zhang, H., 2016. Development and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Plasmopara viticola*. *Sci Rep* 6, 28935. <https://doi.org/10.1038/srep28935>
- Lamichhane, J.R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., Messéan, A., 2016. Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture. *Plant Disease* 100, 10–24. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0574-FE>
- Laurent, B., Douillet, A., Beslay, A., Bordes, J., Delmotte, F., Debord, C., Raynal, M., 2022. The VISA network: a collaborative project between research institutes and vineyard owners to create the first epidemiological monitoring network of downy mildew epidemic based on aerial spore capture. *BIO Web Conf.* 50, 04007. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20225004007>
- Leach, C.M., Hildebrand, P.D., Sutton, J.C., 1982. Sporangium Discharge by *Peronospora destructor* : Influence of Humidity, Red-Infrared Radiation, and Vibratio. *Phytopathology* 72, 1052–1056.
- Massi, F., Torriani, S.F.F., Borghi, L., Toffolatti, S.L., 2021. Fungicide Resistance Evolution and Detection in Plant Pathogens: *Plasmopara viticola* as a Case Study. *Microorganisms* 9, 119. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010119>

- Millardet, A., 1881. Notes sur les vignes américaines et opuscules divers sur le même sujet, Université de Bordeaux. ed.
- Millardet, A., Gayon, U., 1888. Les Nouvelles formules de la bouillie bordelaise : résultats des expériences faites en 1887. *Journal d'agriculture pratique* 24.
- Moreno-Velázquez, M., Hernández-Ramos, L., Preuss-Angeles, A.K., Ronces-Frutos, L.E., Morales-González, I., Carrillo-Ortiz, N., Cárcamo-Rodríguez, A., 2019. PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot. *Revista mexicana de fitopatología* 37, 383–398. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1905-5>
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol* 91, 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Paineau, M., 2022. Caractérisation et évolution de la virulence du mildiou face aux résistances de la vigne : apports croisés de la génomique d'association et de l'évolution expérimentale [WWW Document]. <http://www.theses.fr>. URL <http://www.theses.fr/s219097> (accessed 10.10.22).
- Paineau, M., Mazet, I.D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Fabre, F., Delmotte, F., 2022. The characterization of pathotypes in grapevine downy mildew provides insights into the breakdown of Rpv3, Rpv10 and Rpv12 factors in grapevines. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-21-0458-R>
- Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandenbulcke, F., 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 199–228. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>
- Pinto, R., 2017. Rapport d'analyse des coûts de production sur les cépages résistants (No. GT1-E.1.2.1). INRA, INIAV, ADVID, Université de Bordeaux, CREDA.
- Ristaino, J.B., Saville, A.C., Paul, R., Cooper, D.C., Wei, Q., 2020. Detection of *Phytophthora infestans* by Loop-Mediated Isothermal Amplification, Real-Time LAMP, and Droplet Digital PCR. *PLANT DIS.* 104, 708–716. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1186-RE>
- Rouzet, J., Jacquín, D., 2003. Development of overwintering oospores of *Plasmopara viticola* and severity of primary foci in relation to climate*. *EPPO Bulletin* 33, 437–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2003.00670.x>
- Rumbolz, J., Wirtz, S., Kassemeyer, H.-H., Guggenheim, R., Schäfer, E., Büche, C., 2002. Sporulation of *Plasmopara viticola*: Differentiation and Light Regulation. *Plant Biology* 4, 413–422. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32342>
- Severns, P.M., Sackett, K.E., Farber, D.H., Mundt, C.C., 2019. Consequences of Long-Distance Dispersal for Epidemic Spread: Patterns, Scaling, and Mitigation. *Plant Disease* 103, 177–191. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0505-FE>
- Simonovici, M., 2019. Enquête Pratiques phytosanitaires en viticulture en 2016 (No. 2019–2). Service de la Statistique et de la Prospection.
- Su, H., van Bruggen, A.H., Subbarao, K.V., 2000. Spore Release of *Bremia lactucae* on Lettuce Is Affected by Timing of Light Initiation and Decrease in Relative Humidity. *Phytopathology* 90, 67–71. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.67>
- Thiessen, L.D., Keune, J.A., Neill, T.M., Turechek, W.W., Grove, G.G., Mahaffee, W.F., 2016. Development of a grower-conducted inoculum detection assay for management of grape powdery mildew. *Plant Pathol* 65, 238–249. <https://doi.org/10.1111/ppa.12421>
- Thiessen, L.D., Neill, T.M., Mahaffee, W.F., 2018. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of *Erysiphe necator*. *PeerJ* 6, e4639. <https://doi.org/10.7717/peerj.4639>

- Thiessen, L.D., Neill, T.M., Mahaffee, W.F., 2017. Timing Fungicide Application Intervals Based on Airborne *Erysiphe necator* Concentrations. *Plant Disease* 101, 1246–1252. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1727-RE>
- Tomlinson, J.A., Dickinson, M.J., Boonham, N., 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification: *Botrytis cinerea* detection by LAMP. *Letters in Applied Microbiology* 51, 650–657. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02949.x>
- Torfs, S., Van Poucke, K., Van Campenhout, J., Ceustermans, A., Croes, S., Bylemans, D., Van Hemelrijck, W., Keulemans, W., Heungens, K., 2019. *Venturia inaequalis* trapped: molecular quantification of airborne inoculum using volumetric and rotating arm samplers. *Eur J Plant Pathol* 155, 1319–1332. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01858-0>
- Urruty, N., Deveaud, T., Guyomard, H., Boiffin, J., 2016. Impacts of agricultural land use changes on pesticide use in French agriculture. *European Journal of Agronomy* 80, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.07.004>
- Van der Heyden, H., Dutilleul, P., Charron, J.-B., Bilodeau, G.J., Carisse, O., 2021. Monitoring airborne inoculum for improved plant disease management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 41, 40. <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00694-z>
- Vélez-Pereira, A.M., De Linares, C., Belmonte, J., 2021. Aerobiological modeling I: A review of predictive models. *Science of The Total Environment* 795, 148783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148783>
- Williams, M.G., Magarey, P.A., Sivasithamparam, K., 2007. Effect of temperature and light intensity on early infection behaviour of a Western Australian isolate of *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen of grapevine. *Australasian Plant Pathology* 36, 325–331. <https://doi.org/10.1071/AP07029>