

**TITRE DU PROJET : PORTRAIT DE LA RÉSISTANCE AUX FONGICIDES
UTILISÉS POUR LUTTER CONTRE LA TAVELURE DU POMMIER**

NUMÉRO DU PROJET : IRDA-1-12-1590

DURÉE : 04/2013 – 11/2014

RAPPORT FINAL

Réalisé par : Vincent Phillion & Valentin Joubert

DATE : 21 novembre 2014

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

Portrait de la résistance aux fongicides utilisés pour lutter contre la tavelure du pommier

Vincent Philion & Valentin Joubert

Durée : 04/2013 – 11/2014

RÉSUMÉ DU PROJET

Dans le cadre de ce projet, nous avons pu confirmer que dans plusieurs vergers choisis au hasard, les populations de tavelure du pommier (*Venturia inaequalis*), champignon responsable de la tavelure du pommier, présentent des niveaux de tolérance variables envers différents fongicides systémiques homologués pour lutter contre cette maladie. Le thiophanate-méthyl (Senator, groupe 1) et le myclobutanil (Nova, groupe 3) présentent les pires cas. Les fongicides du groupe 9 (Vangard et Scala) sont aussi visés par des niveaux de tolérance qui dépassent probablement les seuils d'efficacité pratique attendus pour ces produits. Les résultats pour les fongicides du groupe 11 (ex. : Flint) sont moins concluants. Néanmoins, le niveau de variabilité très élevé dans la sensibilité laisse présager que les populations ne sont plus homogènes et que la résistance s'installe dans plusieurs vergers. L'utilisation de molécules plus récentes comme le difénoconazole (composante du Inspire Super), et du penthiopyrad (Fontelis) ne présentent probablement pas de risque actuellement, mais la situation pourrait évoluer rapidement. Dans certains vergers, une dérive de la sensibilité envers le penthiopyrad après seulement une année d'utilisation en témoigne.

Conséquemment, l'utilisation des fongicides systémiques devient de plus en plus hasardeuse, et seules les molécules les plus efficaces de chaque groupe devraient être recommandées. Ainsi, pour les fongicides du groupe 3 et 7 respectivement, seuls le difénoconazole et le penthiopyrad peuvent être recommandés de façon sécuritaire. Finalement, nous avons observé une variation entre les vergers dans le niveau de tolérance pour le Captan, mais le seuil pour la perte d'efficacité n'a pas été atteint.

OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

La lutte contre la tavelure du pommier (*Venturia inaequalis*) repose essentiellement sur l'utilisation de traitements fongicides pour réprimer les infections qui ont lieu chaque année lors des périodes de pluie entre avril et juin. Les produits disponibles pour lutter contre la tavelure ont beaucoup évolué depuis les soixante dernières années et la toxicité des matières actives homologuées a baissé. Malheureusement, toutes les matières actives homologuées depuis 1959 pour lutter contre cette maladie sont sujettes au développement de populations résistantes du champignon responsable de la tavelure et sont classées par familles (groupe) de résistance définies par le FRAC, de sorte que la résistance pour un produit soit partagée par tous les produits classés dans un même groupe, mais à des degrés divers. Des épidémies de tavelure récentes en Ontario (2009) et en Pennsylvanie (2011) ont révélé une perte d'efficacité à grande échelle pour les IBS (inhibiteurs de la biosynthèse des stérols) (ex. NOVA, groupe 3) et l'apparition soudaine de la résistance aux QoI (inhibiteurs de la respiration mitochondriale) (ex. Flint, groupe 11). La résistance à ces deux familles était attendue puisque le même phénomène a été observé en Europe il y a quelques années. Ces pertes d'efficacité font désormais planer un doute sur l'efficacité de ces deux importantes familles de produits dans les autres régions de production. Cette situation a forcé plusieurs producteurs à abandonner les produits sujets à la résistance et à utiliser des produits plus

toxiques, mais non sujets à la résistance. Le manque d'information sur l'étendue du problème de résistance aux fongicides a mené, en 2011 et 2012, à une vaste enquête pan canadienne qui a confirmé les problèmes pour les produits de la famille des IBS et des QoI. Malheureusement, cette enquête n'incluait pas d'autres fongicides d'intérêt, soit les anilinopyrimidines (AP, groupe 9) (ex. Vanguard, Scala), la dodine (Equal) (groupe U12), les SDHI (groupe 7) (Fontelis, Luna) et le fluazinam (groupe 29, Allegro). Par ailleurs, la méthode de cueillette de traitement et de conservation des échantillons ramassés lors de l'étude canadienne a limité le nombre d'observations possibles sur les échantillons recueillis. Les échantillons de l'étude canadienne ont été conservés et ceux qui étaient encore viables ont été testés à nouveau par le laboratoire de l'IRDA. L'objectif de notre projet était d'augmenter la portée de l'étude fédérale et de faire le point sur la situation québécoise. Pour chaque site d'essai, nous avons étudié la relation dose-réponse de la population des ascospores du champignon pour une gamme de fongicides homologués pour lutter contre la tavelure du pommier (voir les détails de l'analyse en annexe). Brièvement, nous avons exposé des populations d'ascospores en milieu liquide à différentes concentrations de chaque produit et estimé la croissance après 48 heures. Dans chaque cas, nous avons établi la dose qui inhibait 50 % de la croissance, soit le EC50, et comparé la valeur obtenue entre les vergers. L'étude avec les ascospores a porté sur 49 des 100 vergers échantillonnés lors de l'étude pan canadienne.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Notre projet a permis de confirmer que la résistance au myclobutanil (NOVA) est largement répandue dans les vergers (figure 1). Sur 49 vergers choisis au hasard au Canada, on a observé un écart très important entre les doses requises pour inhiber 50 % de la croissance du champignon. Un facteur de résistance de >700 a été observé entre les populations issues des vergers les plus tolérants au myclobutanil ($EC_{50} = 17$ ppm) et la population issue du verger le plus sensible à cette molécule ($EC_{50} = 0,02$ ppm). Or, plus de la moitié des populations testées avait une tolérance 25 fois plus grande que celle du verger le plus sensible, et 95 % des populations avaient une tolérance au moins 10 fois plus grande que la plus sensible.

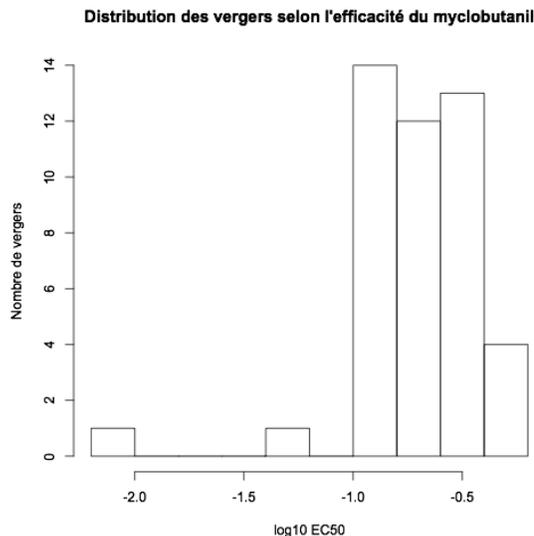


Figure 1. Distribution de la dose EC50 pour le myclobutanil dans différentes populations de *V. inaequalis* choisies au hasard dans des vergers au Canada

Pour le difénoconazole (composante du INSPIRE SUPER), la situation était beaucoup plus nuancée (figure 2). Même si le facteur de résistance observé dans les 45 vergers testés était d'environ 60 fois entre la population la plus résistante (0,11 ppm) et la plus sensible (0,002 ppm), seulement 37 % des populations présentaient une tolérance 10 fois plus grande que la plus sensible, et seulement 10 % présentaient une tolérance 25 fois plus grande que la plus sensible. En général, la EC50 pour le difénoconazole était significativement plus élevée pour les populations tolérantes au myclobutanil. Comme la EC50 des populations avant l'exposition au myclobutanil ou au difénoconazole est inconnue et que l'intensité de l'exposition à ces deux fongicides est difficile à établir, il n'est pas possible de déterminer dans quelle mesure la tolérance du champignon s'est accrue au cours du temps et à quelle vitesse les populations tolérantes sont sélectionnées. De même, il n'est pas possible de déterminer quand les populations sensibles au difénoconazole deviendront tolérantes à cette molécule. Comme la perte d'efficacité pour ces deux molécules est graduelle, il n'existe pas non plus de seuil établi pour déterminer la rentabilité d'utiliser l'une ou l'autre de ces molécules. Néanmoins, il est probable que l'efficacité des produits soit moindre dans les vergers où les populations sont 10 fois plus tolérantes que les populations les plus sensibles. À partir de ce seuil empirique, le difénoconazole (INSPIRE) pourrait être utilisé dans 63 % des vergers alors que le myclobutanil ne serait utilisable que dans 5 % des vergers. À l'échelle du Québec, les populations de 7 vergers sur 14 testées présentaient un facteur de résistance de moins de 10 fois. Un seuil moins sévère basé sur l'efficacité relative entre les produits a été calculé (voir annexe), mais les conclusions générales restent les mêmes.

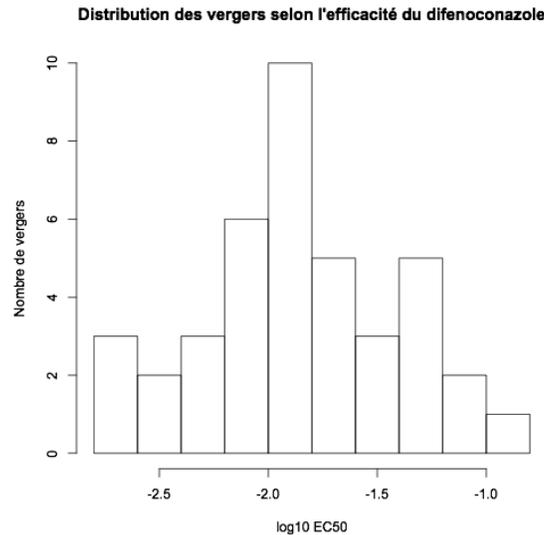


Figure 2. Distribution de la dose EC50 pour le difénoconazole dans différentes populations de *V. inaequalis* choisies au hasard dans des vergers au Canada.

Pour le trifloxystrobin, nous avons également observé des différences significatives entre les populations des différents vergers. Par contre, comme les intervalles des paramètres calculés étaient grands, il n'a pas été possible de conclure quant aux risques de résistance pour les populations testées. Un échantillonnage plus intensif serait nécessaire. Néanmoins, la grande variabilité au sein des populations indique que la proportion des individus résistants augmente et que la résistance en pratique peut apparaître rapidement.

Pour les fongicides de la famille AP (Scala et Vanguard), nous avons observé que les seuils de résistance pratique sont probablement atteints dans plusieurs vergers hors Québec et qu'au moins un échantillon du Québec s'approchait de ce seuil. Conséquemment, une surveillance plus étroite devra être effectuée pour éviter des échecs de traitement.

Pour les fongicides SDHI récemment homologués (Fontelis et Luna), nous avons observé une tolérance du champignon dans des échantillons collectés après une seule année d'utilisation. Il est difficile de prévoir à quel moment cette tolérance se traduira par une résistance pratique, mais encore une fois, un suivi régulier serait requis.

Finalement, notre étude confirme que la sensibilité des populations de tavelure envers le Captan est telle que les risques de résistance pratique demeurent faibles.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE

Ces résultats confirment que le myclobutanil (NOVA) ne devrait plus être recommandé pour réprimer la tavelure sans une évaluation de la tolérance du champignon à ce produit. De plus, le niveau de tolérance du champignon pour le Scala et le Vanguard risquent à court terme de dépasser les seuils de résistance pratique. Par ailleurs, la variation observée entre les vergers pour la tolérance aux produits issus du groupe 7 (SDHI) homologués récemment laisse présager que les seuils de résistance pourraient être atteints rapidement. Comme il n'y a actuellement pas de cas répertoriés de résistance pratique pour les SDHI, il serait utile d'échantillonner périodiquement les vergers où ces produits sont en usage pour déterminer si les populations deviennent plus tolérantes et à quel rythme. Finalement, les variations observées entre vergers pour la tolérance au Captan confirment que ce produit peut être recommandé sans risque de résistance.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Vincent Phillion
Téléphone : 450 653-7368 #350
Courriel : vincent.phillion@irda.qc.ca

AUTRES TRAVAUX OU RÉFÉRENCES SUR LE MÊME SUJET

Un article plus complet est en cours de rédaction.

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

L'équipe de réalisation du projet tient à remercier le programme Prime-Vert, sous-volet 11.1 — Appui à la Stratégie phytosanitaire québécoise en agriculture pour son soutien financier, sans lequel le projet n'aurait pu se concrétiser.

ANNEXE

Méthodologie

Au cours de l'été 2011 et 2012, des échantillons de feuilles tavelées ont été ramassés dans 100 vergers canadiens (au total) choisis au hasard à partir des listes de producteurs de chaque province. Tous les échantillons ont été envoyés au laboratoire de diagnostic de l'université de Guelph où des tests de résistance aux fongicides ont été effectués à partir de conidies récoltées sur des disques de feuilles prélevés sur chaque échantillon. Par la suite, les échantillons ont été acheminés au laboratoire de l'IRDA. Sur réception, les échantillons de feuilles ont été, soit congelés temporairement, ou le plus souvent, placés directement à l'obscurité, face abaxiale vers le haut, dans des incubateurs à 4 °C pendant 12 à 16 semaines pour favoriser la production de pseudothèces. Pendant la période d'incubation, un système de gicleurs intermittents (5 min par heure) a été utilisé en continu pour maintenir les feuilles humectées. Chaque échantillon a ensuite été observé et tous les échantillons avec assez d'ascospores à maturité ont été congelés jusqu'au début des tests de résistance. Les échantillons avec des pseudothèces encore immatures ont été incubés davantage selon leur état d'avancement. Jusqu'à 23 semaines de maturation étaient nécessaires pour certains échantillons. Les échantillons avec une densité de pseudothèces très faible ont été éliminés. En octobre 2013, les feuilles de chaque échantillon avec des pseudothèces à maturité ont été sorties du congélateur et ont été placées dans des grillages adaptés pour des pièges d'éjection conçus pour la collecte à sec dans une fiole de type Eppendorf d'un culot d'ascospores. Au moment des tests, les échantillons ont été remouillés à chaque 20 min pendant 2 heures pour favoriser l'éjection des spores à maturité. Après chaque éjection, les échantillons ont été conservés au sec à 18 °C à la noirceur pour favoriser la maturation, mais inhiber l'éjection. Les échantillons étaient éjectés 2 fois par semaine ou au minimum remouillés quand des tests n'étaient pas réalisés. Pour expérience (Run), des ascospores fraîchement éjectées ont été utilisées. Les ascospores ont été resuspendues en plaques de 96 puits contenant en concentration finale avant incubation : PDB (potato dextrose broth, 24g/L), 50 ppm de chacun de trois antibiotiques (tétracycline, chloramphénicol, streptomycine), 1 % de méthanol et 0,1 % d'acétone. Les spores ont été exposées à 6 doses de chaque produit (un puits par dose par expérience) en parallèle à 4 puits sans fongicide. Les molécules de grade technique ont été utilisées pour chaque produit testé. La gamme de concentration testée a été ajustée par produit à partir d'expériences préliminaires de sorte que la croissance soit approximativement maximale à la dose la plus faible et presque nulle à la dose la plus élevée. Le nombre de produits testés par expérience et le nombre d'ascospores par puits (de 170 à 400, en moyenne 300) ont été ajustés selon la quantité de spores éjectées pour chaque échantillon, mais en conservant un nombre égal de spores pour tous les puits pour chaque expérience. Les plaques ont été incubées à température pièce, d'abord sans agitation pendant 16 heures pour favoriser la formation et l'adhésion d'appressoria, et par la suite agitées jusqu'au moment de l'observation, soit 48 heures après inoculation. La méthode du recouvrement linéaire a été utilisée pour évaluer au microscope (200 fois) la densité mycéliale par rapport à une grille standardisée fixée à l'oculaire. La comparaison des inhibitions de croissance par rapport au témoin a été utilisée comme critère d'efficacité du fongicide.

Analyses

Comme la croissance mycéliale a été estimée par la densité des intercepts sur une grille, la variable réponse était un nombre entier assez petit dont la distribution ne suivait pas la loi normale. De plus, la variable réponse ne suivait pas non plus une distribution de Poisson puisque nous avons observé une surdispersion par rapport aux valeurs attendues par cette distribution. Par ailleurs, comme la productivité en ascospores des échantillons n'était pas

égale, le nombre de matières actives testées pour chaque expérience (Run) n'était pas constant et nous avons aussi dû faire varier le nombre de spores par puits pour chaque « Run ». Conséquemment, le dispositif expérimental n'était pas parfaitement équilibré.

La mesure de la croissance par le nombre d'intercepts est conceptuellement très proche des indices de reproduction basés sur le nombre de descendants produits dans un temps fixe. Nous avons donc adopté la procédure de Delignette-Muller (2014)¹ qui décrit des données similaires. Brièvement, l'erreur associée à la nature des données (modèle stochastique) a été modélisée séparément de la relation dose-réponse, qui a été modélisée avec des relations non linéaires.

La partie stochastique du modèle qui englobe l'erreur associée à la variable de comptage et la variation entre les répliques (Run) a été modélisée avec une distribution binomiale négative où θ est utilisée pour modéliser la surdispersion liée à l'autocorrélation de la croissance au sein de chaque puits.

Ce type d'analyse s'éloigne des méthodes traditionnelles des moindres carrés et de l'anova,⁴ mais peut être réalisé, soit avec des modèles mixtes linéaires généralisés qui maximisent la vraisemblance (ML) par une technique de quadrature de Gauss-Hermite, soit par inférence bayésienne. Puisque la relation dose réponse est non linéaire et que modéliser ce genre d'effets fixes avec des données issues d'une distribution discrète est plus compliqué avec le ML, que l'approche bayésienne est plus appropriée que les méthodes classiques quand le nombre d'observations par groupe est restreint et que le nombre de groupes est limité^{5, 6} et que les comparaisons multiples sont simplifiées⁷, l'approche bayésienne a été retenue.

La technique MCMC (Monte Carlo Markov-Chain) a été utilisée pour estimer la distribution postérieure de chaque paramètre d'intérêt (ex. EC50) pour chaque produit dans chaque verger avec les différents modèles de dose-réponse. Les calculs ont été réalisés avec une adaptation du script fourni par Delignette-Muller (2014)¹ écrit pour rjags⁸ (JAGS 3.4.0) sous R⁹. En outre, nous avons adapté le script pour tenir compte de la variation aléatoire (échangeabilité) entre chaque expérience (Run) (hyperprior¹⁰) répétée sous l'hypothèse d'effets mixtes avec constante aléatoire pour la croissance du témoin. De plus, comme la dispersion permise par la fonction « dnegbin » est discrète (non continue), nous avons adopté la paramétrisation des études écologiques pour la binomiale négative, soit une distribution Poisson-Gamma (distribution Polya)^{11,12} avec $\theta \sim \text{Gamma}(\alpha, 1/\alpha)$ avec du code adapté de Aregay¹³. Les valeurs « a priori » du paramètre EC50 utilisées comme point de départ pour la modélisation reposent sur l'hypothèse que l'expérience a été conçue de sorte que 95 % du temps, la valeur de EC50 était effectivement comprise dans la gamme des concentrations testées. Pour d, b, e selon le modèle et θ pour la surdispersion, des valeurs a priori non informatives ont été utilisées.

Trois chaînes MCMC ont été lancées en parallèle pour tous les calculs avec un minimum de 5000 itérations chacune dont les 1000 premières ont été éliminées. La convergence des chaînes a été évaluée graphiquement par leur trace et avec la statistique Brooks-Gelman-Rubin (Rhat). Des itérations additionnelles ont été utilisées chaque fois que nécessaire, jusqu'à ce que la valeur de Rhat soit inférieure à 1.2 pour tous les paramètres. Dans tous les cas, le nombre d'itérations était suffisant pour éliminer l'autocorrélation et le nombre d'échantillons équivalent sans autocorrélation (n.eff ou effectiveSize)¹⁴ dépassait 10 000¹⁵. Au moins 1000 échantillons de la distribution postérieure ont été utilisés pour l'inférence.

Puisque les fongicides testés étaient très différents et que différentes équations existent pour modéliser la relation dose réponse², une analyse préliminaire a été faite pour choisir le

modèle approprié. Comme les analyses bayésiennes sont lourdes, ce choix initial a été fait à partir d'un échantillon aléatoire comprenant toutes les données de 12 vergers. Nous avons comparé les fonctions sigmoïdales les plus usuelles pour chaque fongicide. Comme le nombre de doses évaluées était limité, nous avons considéré seulement les modèles à 3 paramètres avec une relation monotone. Conséquemment, les modèles empiriques plus complexes comme la courbe de Richards³ ont été écartés. Il s'en suit que les cas où la croissance en présence d'une faible dose de fongicide aurait pu être significativement supérieure à celle du témoin (hormésis) ont été absorbés dans l'erreur des modèles. Finalement, la paramétrisation a été faite de sorte que la croissance soit maximale à la dose « 0 » (témoin) et modélisée avec le paramètre « d » de chaque modèle. Nous avons également initialement fixé une asymptote à « 0 ». Soit une hypothèse de croissance nulle pour la dose la plus élevée.

Les équations utilisées pour modéliser la croissance observée (Y_i) pour chaque concentration de matière active (X_i) étaient :

1) Log-logistique à trois paramètres (ou fonction de Hill) : $Y_i = d / (1 + [X_i/e]^b)$ où « e » = La concentration de matière active requise pour inhiber 50 % de la croissance (EC50), alors que la pente de la relation dose-réponse = « b ». La courbe est symétrique et le point d'inflexion est donc égal à la dose EC50.

2) Weibull 1 : $Y_i = d * \exp(-\exp[b * (\log(X_i) - \log(e))])$. Une courbe asymétrique avec descente initiale lente. La dose au point d'inflexion = « e ».
La dose EC50 = $\exp(\log(2)/b) * e$

3) Weibull 2 : $Y_i = d * (1 - \exp[-\exp(-b_2 * (\log(X_i) - \log(e_2)))])$. Une courbe asymétrique avec descente initiale rapide. La dose au point d'inflexion = « e₂ ».
La dose EC50 = $\exp(-\log(2)/b_2) * e_2$

Des variations du modèle de Hill ont également été testées, mais les résultats ne présentaient pas d'avantages par rapport aux modèles retenus. Puisque le DIC est inapproprié pour comparer ce type de modèles¹⁶ et que le nombre de paramètres calculés était identique pour tous les modèles considérés, la sélection du modèle final pour chaque fongicide a été faite sur la base de la déviance et des résidus¹⁷.

Les modèles testés ont donné des résultats comparables pour la plupart des fongicides. Cependant, la différence d'intervalle crédible des résidus de Pearson a été jugée assez importante pour justifier un choix de modèle différent par produit (tableau 1 et figure 1). Nous avons constaté que le modèle retenu n'était pas nécessairement lié au type de produit. La relation dose-réponse choisie pour le myclobutanil (Weibull 2) était différente de celle du difénoconazole, alors que ces deux produits sont dans le même groupe. Il est possible que cette différence soit en lien avec l'échantillon de verger choisi. La croissance en présence des fongicides de type anilinopyrimidine (AP) (pyrimethanil, cyprodinil) était mieux modélisée par la fonction Weibull 2, alors que pour les SDHI, la courbe Weibull 1 semblait plus appropriée. Toutes choses étant égales par ailleurs, il est possible que cette observation se traduise sur le terrain par une inhibition partielle de la croissance à des doses très faibles de SDHI alors que les AP n'auraient pas d'effet à faible dose. À l'inverse, cette observation impliquerait qu'en présence de doses élevées, toute augmentation additionnelle de la dose de AP serait plus efficace que pour les SDHI. Cette hypothèse expliquerait la faible efficacité observée avec les AP en verger avec les traitements en dilué (application au fusil) en comparaison à l'efficacité observée avec ces produits en concentré (application conventionnelle). Cette différence dans la réponse à basse concentration pourrait aussi

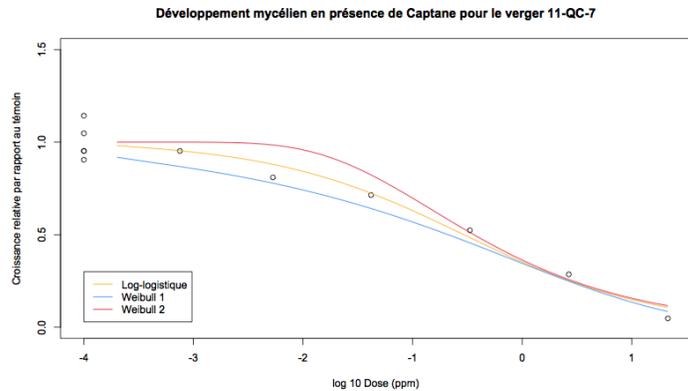
expliquer une partie de la faible efficacité des produits de type AP sur fruits puisqu'ils sont moins absorbés par la cuticule des fruits. Une caractéristique partagée avec le myclobutanil dont la relation dose-réponse était également mieux modélisée par une fonction Weibull 2. Pour le thiophanate-méthyl, le nombre de vergers testés était restreint et la résistance dans ces populations était fréquente, ce qui a pu favoriser le choix du modèle avec la plus faible réponse à faible dose. Les données pour le Captan et le difénoconazole étaient mieux représentées par une relation dose-réponse symétrique log-logistique classique avec une asymptote nulle. Finalement, pour la dodine, le fluazinam et le, nous avons modélisé avec une asymptote non nulle, notamment à cause de la croissance à dose élevée dans les vergers avec résistance.

Tableau 1. Médiane et intervalle de confiance (95 %) des résidus de Pearson des modèles pour les différents fongicides pour un échantillon de 12 vergers aléatoires

Fongicide	Log-logistique	Weibull 1	Weibull 2
Captan	161 [130-200]*	161 [128-200]	165 [133-206]
Cyprodinil	187 [153-228]	185 [151-222]	184 [153-224]*
Difénoconazole	175 [143-213]*	182 [149-221]	177 [146-214]
Dodine	176 [141-214] (U)*	177 [141-218]	178 [143-224]
Fluazinam	194 [159-237] (U)*	194 [159-237]	194 [158-237]
Fluopyram	155 [123-199]	149 [117-188]*	151 [119-195]
Myclobutanil	190 [155-230]	195 [159-239]	185 [154-225]*
Penthiopyrad	189 [154-234]	183 [149-228]*	193 [158-241]
Pyrimethanil	180 [146-218]	176 [144-216]	173 [143-211]*
Thiophanate méthyl	161 [130-201]	159 [128-199]	157 [127-195]*
Trifloxystrobin	202 [165-244]* (U)	202 [165-247]	203 [166-249]

* Indique le modèle choisi pour chaque fongicide dans l'analyse finale.
 U Indique qu'un modèle avec une croissance non nulle pour les doses élevées a été choisi. Lorsque les résidus de Pearson étaient similaires, le modèle avec la convergence la plus rapide (n.eff le plus élevé) a été choisi.

Figure 1. Exemple de relation dose-réponse. Pour le verger 11-Qc-7, on peut voir que le modèle le plus proche des données pour la matière active Captane était le Log-Logistique. La croissance dans le témoin a été représentée à la dose 0,0001 ppm.



La détermination du EC50 pour chaque matière

active pour la population de chaque verger a été réalisée avec la même technique en prenant l'ensemble des données, mais en appliquant le modèle choisi pour chaque fongicide. La médiane de la distribution marginale postérieure du EC50 a été rapportée, ainsi que l'intervalle de crédibilité (CRI) ⁶ à 95 %. Sur les 49 vergers et les 11 produits (539 combinaisons), nous avons testé 412 relations dose-réponse.

Pour chacune des combinaisons, les résultats sont illustrés par un diagramme en chenille (caterpillar plot). Le EC50 médian est représenté par un point alors que la ligne représente l'intervalle de crédibilité pour le EC50 de la population du verger pour la molécule désignée en tête de colonne. L'absence chenille indique que la combinaison n'a pas été testée. Les valeurs de EC50 et l'intervalle de crédibilité ont été tronqués au besoin à la concentration maximale testée pour les fins du graphique et pour l'inférence sur les données.

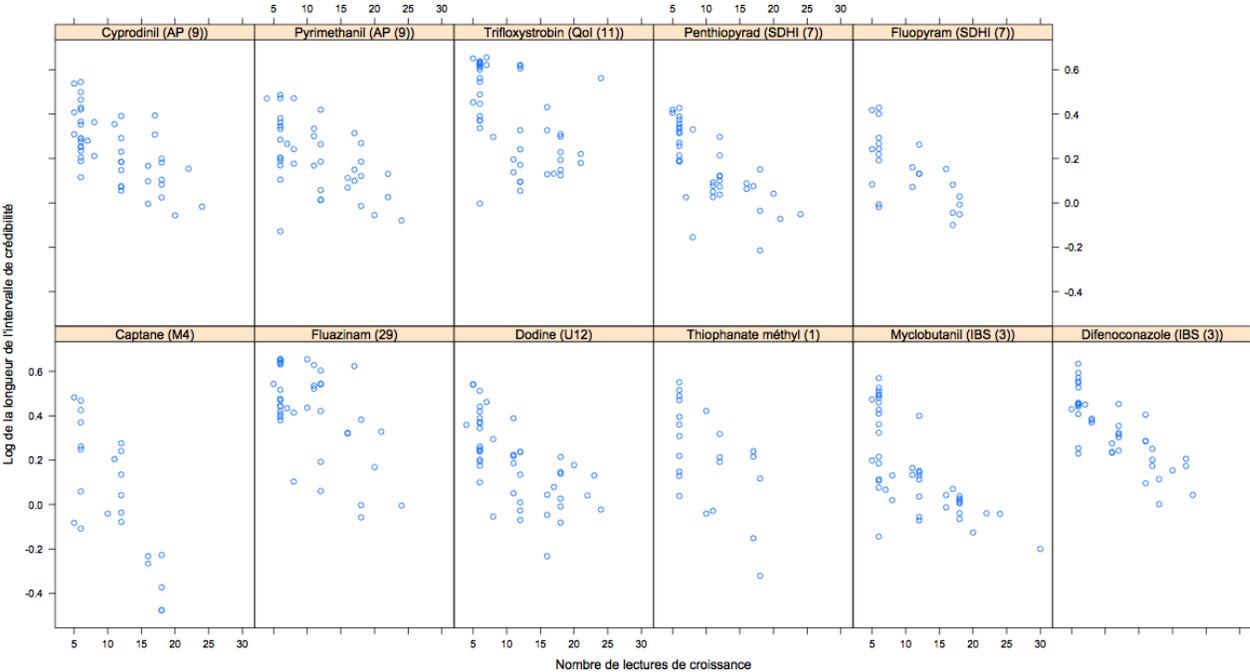
Intervalle de crédibilité pour la EC50

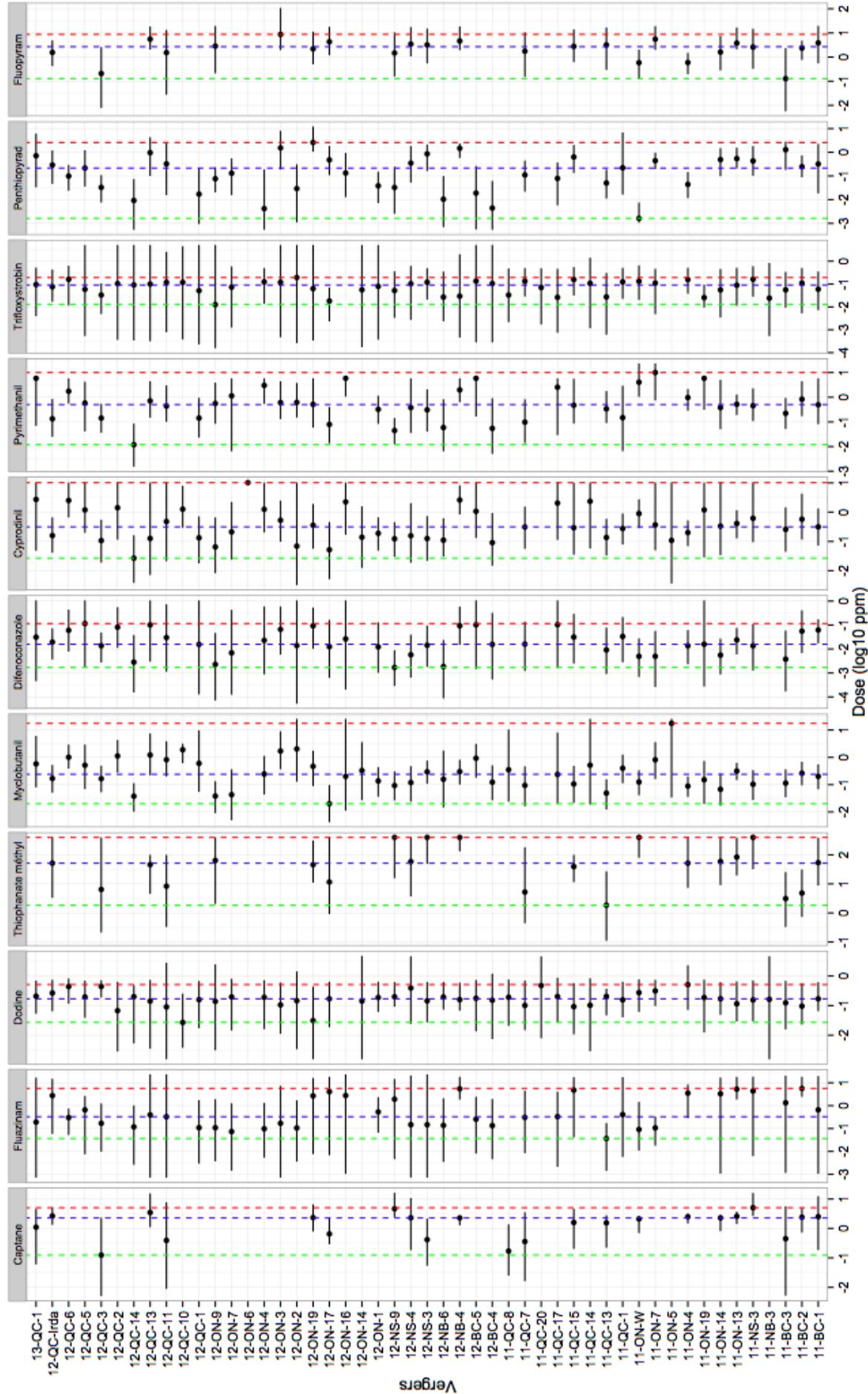
La longueur de l'intervalle de crédibilité était fortement liée au nombre de points testés (lectures de croissance) et au type de produit. En général, plus le nombre de points était grand, meilleure était l'estimation de la EC50 (voir figure). Donc, il pourrait être souhaitable d'ajuster le nombre de points de lectures (réplications) pour chaque produit testé si d'autres tests sont réalisés. Nous avons calculé le nombre de lectures requises pour obtenir une précision (longueur) moyenne de 1 log pour le Nova :

$\text{Log}_{10}(\text{intervalle}) = 0,46 - 0,027 * (\text{points observés})$. Soit $0,46 / 0,027 = 18$ points de lecture requis, soit l'équivalent de 6 doses * 3 réplications.

Dans le cadre de ce projet, il n'était pas possible d'effectuer 18 lectures pour chaque produit * verger. La médiane du nombre de tests réalisés = 12. Avec les tests réalisés, nous avons observé que dans plus de la moitié des sites, la longueur de l'intervalle de confiance pour le difenoconazole, le trifloxystrobine, le fluazinam et le thiophanate-methyl dépassait 2 unités. Les intervalles de confiance sont donc assez élevés et limitent les possibilités d'inférence pour détecter de faibles variations entre les sites.

Figure 2. Relation entre l'intervalle de crédibilité et le nombre d'observations pour les différents fongicides testés





À partir des EC50 pour chaque produit, nous avons calculé le facteur de résistance, soit le rapport entre la EC50 du verger avec la population la plus résistante et la plus sensible et qui correspond graphiquement sur l'échelle \log_{10} à la distance entre la ligne rouge et la ligne verte respectivement. La ligne bleue correspond à la médiane de la dose EC50 pour l'ensemble des vergers testés.

Efficacité relative des fongicides

À partir du facteur de résistance, nous avons voulu estimer grossièrement l'impact sur l'efficacité attendue d'un produit entre les vergers où la population était la plus sensible et la moins sensible. Ce genre d'extrapolation est difficile parce que le EC50 n'est utile que pour comparer différents vergers pour une même molécule et une même technique, mais cette valeur n'est pas directement transposable pour déterminer des valeurs efficaces de dose en conditions pratiques. Par exemple, une réduction de 50 % de la croissance en laboratoire n'implique pas une réduction de 50 % de la tavelure en verger. Un indice d'efficacité relative a néanmoins été calculé, soit la quantité de matière active appliquée/concentration de matière active requise pour inhiber la croissance du champignon. L'indice a été calculé à la dose maximale homologuée. Pour refléter les doses d'usage réel, l'indice doit être ajusté à la baisse selon la dose utilisée sur le terrain. Par exemple, si la captane est utilisée sous forme de Maestro à 2kg/ha, les valeurs des indices d'efficacité dans le tableau seraient plus faibles par un facteur de 0,53 fois. Cet indice ne tient pas compte du mode d'action des produits, et donc, il n'est pas nécessairement possible de comparer l'indice pour un fongicide de contact et un fongicide absorbé. Néanmoins, l'indice peut avoir une valeur relative pour les comparaisons de molécules d'une même famille et ajoute au concept du facteur de résistance. Les indices ont été calculés avec les données de tous les vergers. Les valeurs de EC50 à l'extérieur de la gamme des concentrations testées ont été tronquées à la plus haute ou à la plus basse valeur testée selon le cas. Conséquemment, le facteur de résistance réel est probablement plus élevé et donc les indices sont également approximatifs.

Tableau 2. Ratio de la dose homologuée de matière active sur la dose d'inhibition de 50 % de la croissance (EC50) et le facteur de résistance pour chaque produit

Matière active	Kg/ha (ai)	Indice d'efficacité relative			Facteur de résistance $\log_{10}(EC50_{max}) - \log_{10}(EC50_{min})$
		maximal	médian	minimal	
Captane (M4)	3	24	1,3	0,60	1,6
Fluazinam (29)	0,5	14	1,5	0,09	2,2
Dodine (U12)	2,11	78	12,5	4,14	1,3
Thiophanate méthyl (1)	0,44	0,24	<0,01	<0,01	2,3
Myclobutanil (IBS (3))	0,14	7	0,6	<0,01	2,9
Difenoconazole (IBS (3))	0,07	43	4,6	0,63	1,8
Cyprodinil (AP (9))	0,28	10	0,9	0,03	2,6
Pyrimethanil (AP (9))	0,8	67	1,6	0,08	2,9
Trifloxystrobin (QoI [11])	0,1	8	1,2	0,55	1,2
Penthiopyrad (SDHI (7))	0,3	186	1,4	0,12	3,2
Fluopyram (SDHI (7))	0,1	0,75	0,04	0,01	1,8

Empiriquement, il est possible de déduire, à partir des valeurs du tableau, que lorsque la valeur de l'indice est très supérieure à 1, la sensibilité de la population à ce fongicide ne pose pas de problème alors que les valeurs très inférieures à 0,1 indiquent une tolérance du champignon qui laisse présager des échecs de traitement. Comme le lien entre la résistance au laboratoire et les échecs de traitement n'est pas toujours évident, les valeurs d'indice entre 1 et 0,1 sont difficilement interprétables.

Pour le produit de contact Captane (ex. Maestro), les indices dans tous les vergers ne présentent pas de risque, même à dose réduite. Le Fluazinam (Allegro) serait efficace dans la majorité des vergers, mais pas nécessairement dans les vergers où les populations sont plus tolérantes (ex. 11— QC -15). Pour la dodine (Equal), l'indice tel que calculé impliquerait que la tolérance du champignon ne pose pas de problème. Or, comme la résistance à ce produit a été bien documentée, il est possible que l'indice soit inapplicable, ou qu'en l'absence de traitement avec ce produit, la population résistante ait été diluée au cours des années. Dans les régions où la résistance à la dodine a été documentée, plusieurs rapports suggèrent que la dodine reste efficace dans une majorité de vergers. Des tests d'efficacité sur le terrain seraient nécessaires pour mieux baliser la situation actuelle. Pour le thiophanate-méthyl (Senator), les populations seraient presque toutes résistantes. Pour les inhibiteurs de stérols (IBS), l'indice reflète assez bien l'hypothèse selon laquelle l'efficacité du Myclobutanil (Nova) s'est érodée et que le produit n'est plus efficace dans les vergers où les populations sont les plus tolérantes (ex. 12-QC-2, 12— QC -10, 12 — QC -13), mais serait encore très efficace dans les vergers avec des populations sensibles (ex. 11— QC -13, 12 — QC -14). L'indice suggère également que le Difenoconazole (composante du mélange Inspire Super) serait efficace dans la plupart des vergers testés. Dans le cas des anilinopyrimidines (AP), l'indice suggère une situation quasi identique pour le Cyprodinil (Vangard) et le Pyrimethanil (Scala). Les deux produits seraient efficaces dans une majorité de vergers, mais seraient inefficaces dans les vergers avec la tolérance la plus élevée. Ce seuil n'a pas été atteint dans les échantillons du Québec, mais la population 13-QC-1 s'en

approche. Pour la Trifloxystrobine (Flint), l'indice calculé ne permet pas de détecter de sites où le seuil empirique d'inefficacité soit dépassé. Il est possible que les intervalles de confiance très longs pour cette molécule masquent la situation réelle de certains vergers. Pour plusieurs sites avec un intervalle de crédibilité élevé, une imprécision pour la EC50 d'une unité sur l'échelle log10 ferait passer l'indice sous le seuil empirique de 0,1, ce qui n'a pas été observé pour les autres molécules. Finalement, l'indice calculé pour les SDHI reflète l'hypothèse selon laquelle l'efficacité intrinsèque du Penthiopyrad (Fontelis) est supérieure à la dose homologuée du Fluopyram vendu en mélange dans les formulations de Luna. Selon l'indice, le Fontelis était efficace dans tous les vergers testés, mais un verger s'approchait du seuil empirique de perte d'efficacité. Ce n'était pas le cas au Québec. Pour le Fluopyram, la majorité des vergers testés avait un indice sous le seuil d'efficacité. C'est probablement pourquoi ce produit n'est vendu qu'en mélange.

Corrélation entre les EC50 de différents produits

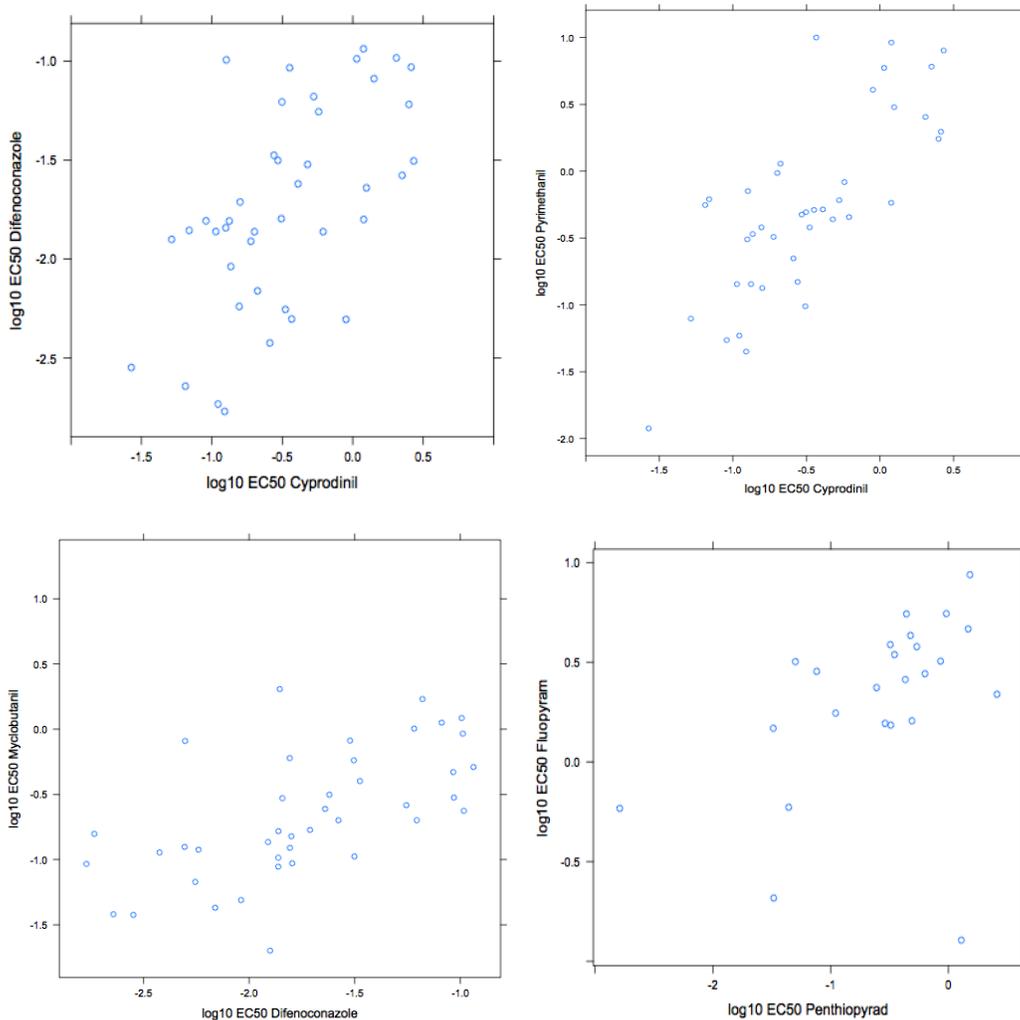
Nous avons comparé les données de EC50 entre les différentes molécules, et certaines associations ont été observées. Par exemple, une corrélation positive et significative a été observée entre le EC50 des inhibiteurs de stérols et les anilinopyrimidines :

indice de corrélation de Pearson :

	Cyprodinil	Pyrimethanil
Myclobutanil	0,32 (t = 2.2, df = 43, p = 0.03)	0,40 (t = 2,7, df = 38, p = 0.01)
Difenoconazole	0,59 (t = 4.5, df = 39, p < 0,001)	0,39 (t = 2,6, df = 38, p = 0.01)

Dans tous les cas, la corrélation était significative. Ce genre de corrélation n'implique pas nécessairement que l'acquisition de la résistance au Nova ou au Inspire soit la cause ou la conséquence de la résistance au Scala ou Vanguard. L'association pourrait simplement refléter que l'usage du Scala a remplacé le Nova chez les producteurs. Il pourrait néanmoins être intéressant de comparer l'usage de ces produits dans les vergers testés et d'établir si la résistance est croisée pour les deux catégories de produits ou seulement en lien avec un usage répété des deux produits. Nous n'avons pas observé d'autre association entre des molécules non apparentées.

Figure 4. Corrélation entre les EC50 de différents fongicides



Nos observations confirment que les EC50 des molécules issues d'une même famille chimique sont corrélés et partagent au moins partiellement les mêmes mécanismes de résistance. C'est le cas pour les AP (cyprodinil et pyrimethanil) avec une corrélation de 0,77 ($t = 7.4$, $df = 38$, $p < 0.001$). La résistance pour le Scala est donc probablement parfaitement liée à celle du Vanguard. Par ailleurs, la relation entre le EC50 du difenoconazole et le myclobutanil aussi était significative ($t=4.8$, $df=39$, $p<0.001$), mais moins forte (0,61). Certaines populations avec une EC50 élevée pour le myclobutanil avaient une EC50 relativement faible pour le difenoconazole. Le difenoconazole (Inspire Super) pourrait donc être plus efficace que prévu dans les vergers avec une résistance au Nova, mais la tendance entre les deux molécules reste incontournable. Finalement, la corrélation entre les deux SDHI testés (penthiopyrad et fluopyram) était plus faible (0,42), mais néanmoins significative ($t = 2.2$, $df = 22$, $p = 0.04$). Comme les échantillons ont été collectés (2011 & 2012) seulement en partie avant l'homologation du premier fongicide de cette catégorie (Fontelis, 2012), il est possible que l'utilisation du produit en 2012 ait pu déjà faire varier le EC50. Par exemple, les échantillons 12-ON-3 et 12— QC -13 (collectés à l'été 2012) présentaient des

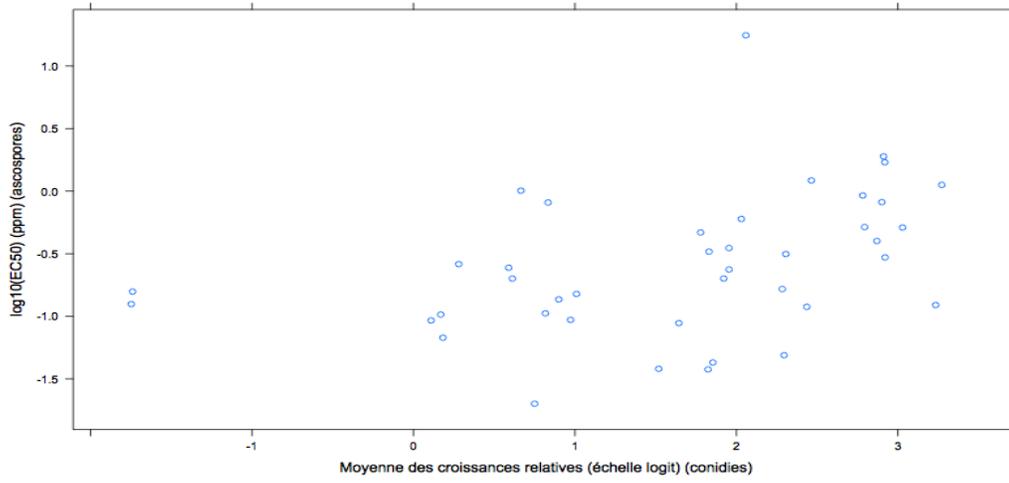
EC50 élevés pour les deux molécules. Il n'est pas possible de prédire si cette évolution rapide du EC50 va continuer à la même vitesse, ni à quelle moment la chute d'efficacité sera significative.

Comparaison entre études

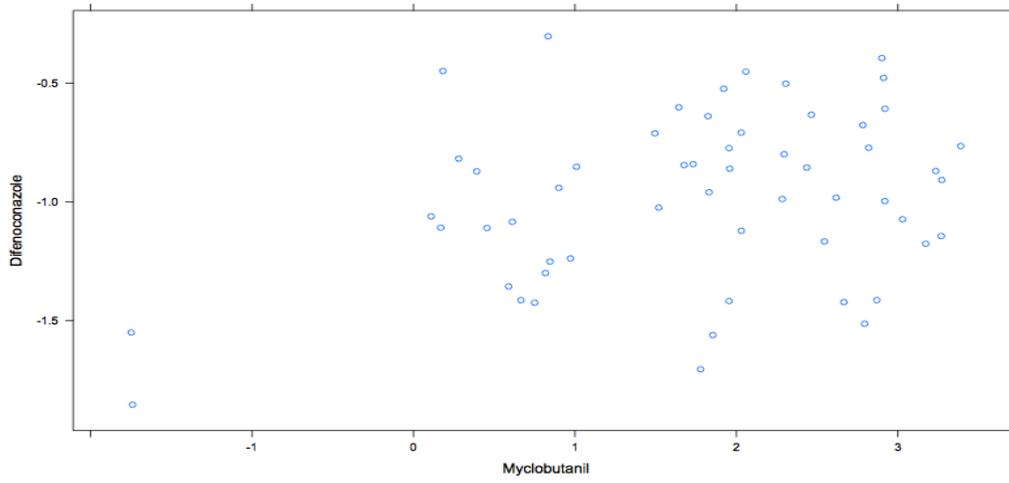
Finalement, nous avons comparé les résultats de dose EC50 pour inhiber les ascospores à ceux issus du projet canadien pour les mêmes vergers qui visait à mesurer la croissance relative des conidies exposées à une seule concentration de fongicide par rapport au témoin. Il n'y a pas de lien direct entre la croissance relative à une dose discriminante et la dose EC50. D'une part, les deux types de spores peuvent avoir une tolérance différente par rapport au fongicide testé. De plus, la méthode expérimentale a aussi un effet sur le paramètre mesuré. Par exemple, le temps d'exposition a un impact majeur sur le EC50. Plus le temps d'exposition est long, plus la EC50 est basse. Les tests d'exposition de 48 heures réalisés en milieu liquide pour les ascospores ne sont donc pas équivalents aux expositions de deux semaines sur milieu solide effectué pour les conidies.

La comparaison a été faite par des corrélations entre les valeurs obtenues pour les mêmes vergers et les mêmes produits par les deux techniques. La valeur par verger pour l'étude avec les conidies a été obtenue en calculant la moyenne des croissances relatives sur l'échelle logit pour toutes les souches individuelles. Nous avons utilisé une transformation logit pour mieux accentuer les différences de croissance lorsque la croissance était proche de 1 ou 0. L'étude ontarienne a été faite pour le Myclobutanil, le Difénoconazole, le Trifloxystrobine et la Dodine. Pour le Myclobutanil, nous avons observé une corrélation positive (0,38) et significative ($t = 2.6$, $df = 39$, $p = 0.014$). Par contre, nous n'avons observé aucune relation entre les deux techniques pour le Difénoconazole ($t=0$, $df=37$, $p=0,97$). Par ailleurs, la corrélation entre les résultats obtenus pour le Myclobutanil et le Difénoconazole dans l'étude ontarienne (0,32) était significative ($t=2,5$, $df=54$, $p=0,02$), mais beaucoup moins forte que celle obtenue dans le cadre de notre projet avec les ascospores. Nonobstant les différences de méthodologie, il est possible que le faible échantillonnage adopté par l'étude ontarienne ait pu masquer la corrélation entre ces deux produits.

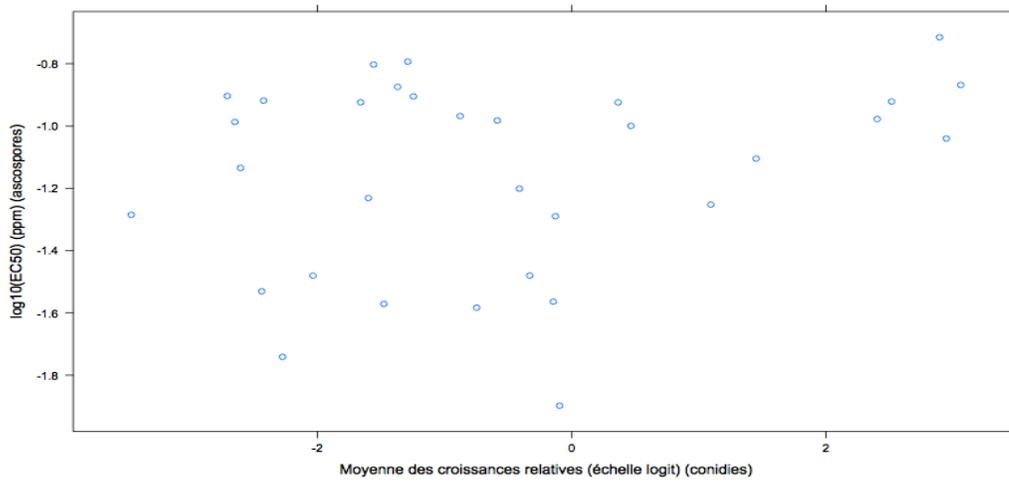
Comparaison des résultats du Québec et de l'Ontario pour le Myclobutanil



Comparaison des moyennes des croissances relatives (échelle logit)



Comparaison des résultats du Québec et de l'Ontario pour le Trifloxystrobine



Pour le Trifloxystrobine, la corrélation entre les résultats pour les conidies et les ascospores (0,24) n'était pas significative ($t=1,4$, $df=30$, $p=0,18$). Les sites pour lesquels on observait une faible croissance des conidies avaient des populations d'ascospores de tolérance variable. Comme les intervalles de crédibilité obtenus dans notre étude étaient importants, les résultats confirment que le nombre de lectures de croissance avec les ascospores n'était pas suffisant. Finalement, pour la dodine, nous n'avons pas observé de corrélation entre les résultats des deux techniques ($t=-0,3$, $df=9$, $p=0,7$), mais le nombre de points en commun aux deux études était limité.

En conclusion, cette étude a permis un tour d'horizon assez complet de la résistance de la tavelure face aux fongicides utilisés pour réprimer cette maladie. Notre étude a permis de confirmer la perte d'efficacité des inhibiteurs des stéroïdes, mais pas celle présumée pour la Dodine ou la Trifloxystrobine. Par ailleurs, cette étude souligne que l'efficacité des anilinopyrimidines achève. Finalement, nous avons observé de grandes différences de sensibilité entre les populations des vergers envers la dernière famille de fongicide homologuée (SDHI) et avons remarqué que les échecs de traitement avec ces produits pourraient survenir rapidement si la tolérance du champignon s'accroît.

Références

1. Delignette-Muller, M. L., Lopes, C., Veber, P. & Charles, S. Statistical handling of reproduction data for exposure-response modelling. *Environ. Sci. Technol.* (2014). at <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es502009r>>
2. Ritz, C. & Streibig, J. C. Bioassay analysis using R. *J. Stat. Softw.* **12**, 1–22 (2005).
3. Bindslev, N. in *Drug-Accept. Interact.* 257–282 (Co-Action Publishing, 2008). at <<http://journals.sfu.ca/coactionbks/index.php/Bindslev/article/viewArticle/14/75>>
4. Bolker, B. M. *et al.* Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 127–135 (2009).
5. Congdon, P. Multilevel and Panel Data Models. *Bayesian Stat. Model. Second Ed.* 367–424 at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470035948.ch11/summary>>
6. Kéry, M. *Introduction to WinBUGS for ecologists: Bayesian approach to regression, ANOVA, mixed models and related analyses.* (Academic Press, 2010). at <<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=41CeuywiQFEC&oi=fnd&pg=PP2&dq=%22introduction+to+WinBUGS+for+Ecologists%22&ots=DAnvxDGcLW&sig=64G-4Aq4XdQBHljkxJdv5pil4rQ>>
7. Gelman, A., Hill, J. & Yajima, M. Why we (usually) don't have to worry about multiple comparisons. *J. Res. Educ. Eff.* **5**, 189–211 (2012).
8. Plummer, M. *rjags: Bayesian graphical models using MCMC.* (2014). at <<http://CRAN.R-project.org/package=rjags>>
9. R Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing.* (R Foundation for Statistical Computing, 2014). at <<http://www.R-project.org/>>
10. Ntzoufras, I. Bayesian Hierarchical Models. *Bayesian Model. Using WinBUGS* 305–340 at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470434567.ch9/summary>>
11. Bolker, B. M. *Ecological models and data in R.* (Princeton University Press, 2008). at <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=7ZdtfhGHoz8C&oi=fnd&pg=PP2&dq=Ecological+Models+and+Data+in+R&ots=a_sw1sjksB&sig=f2kn_Q-CEhmOkpgZTX9QJAp70vA>
12. Hilbe, J. M. *Negative Binomial Regression.* (Cambridge University Press, 2011).
13. Aregay, M. Flexible Statistical Modeling Approaches for Hierarchical and Overdispersed Data. (2013). at <<https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/412828>>
14. Plummer, M., Best, N., Cowles, K. & Vines, K. CODA : Convergence Diagnosis and

- Output Analysis for MCMC. *R News* **6**, 7–11 (2006).
15. Bolker, B., Brooks, M., Gardner, B., Lennert, C. & Minami, M. *Owls example : a zero-inflated, generalized linear mixed model for count data*. (2012). at <https://groups.nceas.ucsb.edu/non-linear-modeling/projects/owls/WRITEUP/owls.pdf>
 16. Hooten, M. B. & Hobbs, N. T. *A Guide to Bayesian Model Selection for Ecologists. Ecol. Monogr.* (2014). at <http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/14-0661.1>
 17. Lunn, D., Jackson, C., Best, N., Thomas, A. & Spiegelhalter, D. in *BUGS Book Pract. Introd. Bayesian Anal.* 129–172 (CRC Press, 2012). at http://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=Cthz3XMa_VQC&oi=fnd&pg=PP1&dq=%22Model+checking+and+comparison%22+chapter+8+bugs+book&ots=3sCIVnY7J7&sig=0f79H8WcBQVlaHLLKgUs1I-i