

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES CULTURES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**DEVELOPPEMENT D'UNE METHODOLOGIE D'EXPERIMENTATION DES STIMULATEURS
DES DEFENSES DES PLANTES, UTILISABLE EN PARTICULIER,
DANS LA CONSTITUTION DES DOSSIERS D'AMM**

L. THIBAUT ^{(1) (2)}

(1) ANSES-DPR, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94 701 Maisons-Alfort cedex FRANCE

(2) CEB – AFPP, 42 rue Raymond Jaclard, 94 140 Alfortville

laurent.thibault@anses.fr

RÉSUMÉ

Les Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP) sont des produits de protection des cultures dont l'utilisation tend à s'accroître, dans le cadre du développement des solutions de biocontrôle, lié à la mise en place du plan Ecophyto. La particularité du mode d'action de ces produits et leur efficacité, souvent faible sur le terrain quand ils sont utilisés seuls, posent la question de leur intérêt réel et de notre capacité à démontrer ce mode d'action. Se pose donc également la question de la disponibilité de méthodes d'expérimentation adaptées et tout particulièrement dans le cadre de demandes d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). La Commission des Essais Biologique (CEB) de l'AFPP a donc rédigé une méthode spécifique d'expérimentation des SDP. Ce travail s'est fait en collaboration avec le RMT ELICITRA, et le réseau INDRES. La démarche, le contexte de rédaction de cette méthode et ses principales caractéristiques sont développés dans cet article.

Mots-clés : Stimulation des Défenses des Plantes (SDP), Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), Commission des Essais Biologiques (CEB), méthodologie, efficacité.

ABSTRACT

The Plant defense elicitors are Plant Protection Products (PPP). Their use tends to increase through the development of biocontrol solutions related to "Ecophyto", the pesticide use reduction French plan. The specificity of the mode of action of these products and their low intrinsic efficacy, raise the question of the demonstration of their interest and thus the availability of suitable test methods, especially in the context of Authorisations of Plant Protection Products. The French Committee on Biological Trials (CEB) of AFPP has drafted a specific method of experimentation of Plant defense elicitors. This work was done in collaboration with the Official French network on elicitors, called ELICITRA, and the public research network on elicitors, called INDRES (2 networks of French scientists, experts on elicitors). The approach, the context of writing of this method and its main features are developed in this article.

Keywords: Plant defense stimulators, Authorizations of Plant Protection Products, French Committee on Biological Trials (CEB), Methodology, Efficacy.

CONTEXTE

L'utilisation de Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP) est recensée comme étant une méthode de protection des plantes, alternative à la lutte chimique « conventionnelle ».

En 2011, à l'initiative de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI), a été créé un groupe de travail «Intrants *alternatifs* ou complémentaires à la protection chimique » chargé de mener une réflexion générale sur les méthodes alternatives de lutte en protection des plantes, en vue de clarifier le périmètre des produits concernés , certaines définitions et les procédures de mise sur le marché de ces produits . Cette initiative s'inscrivait dans le cadre de la mise en place du plan ECOPHYTO et faisait suite à la parution du rapport d'Antoine Herth relatif au biocontrôle et de ses 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes.

En avril 2012, il est décidé de transformer ce groupe de travail en 4 sous-groupes, « Médiateurs chimiques », « Micro-organismes », « Stimulateurs de défense des plantes et stimulateurs de la vitalité », « Substances de base et substances à faible risque » (recroisant en partie les catégories du biocontrôle), dont la mission est recentrée autour des possibilités de simplifier les procédures de demandes de mise sur le marché de ce type d'intrants. Cette mission découle directement d'une des actions du plan ECOPHYTO : « faciliter la mise sur le marché des produits alternatifs, notamment de biocontrôle ».

En octobre 2012, le sous-groupe « Stimulateurs de défense des plantes et stimulateurs de la vitalité » rend ses conclusions à la DGAI sous forme d'une note de synthèse préconisant deux actions pouvant faciliter la mise sur le marché des SDP :

- D'une part, requalifier, recalibrer, de manière adaptée, les usages auxquels peuvent prétendre les produits de type SDP.
- D'autre part, développer une méthodologie spécifique pour la mise en évidence de l'efficacité des SDP en insistant plus particulièrement sur la démonstration des activités stimulatrices, en vue d'une utilisation dans le processus de constitution des dossiers de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Le présent article a donc pour objet de faire le point sur les suites données à cette 2^{ème} proposition de développement d'une méthodologie spécifique.

REDACTION D'UNE METHODE EN PARTENARIAT

Les molécules stimulatrices des défenses des plantes font l'objet de nombreuses recherches aussi bien d'un point de vue fondamental que d'un point de vue appliqué. Il existe ainsi en France depuis quelques années, différentes structures, réseaux, forums d'échange, regroupant des chercheurs de différents horizons, travaillant sur le sujet, tels que le Réseau Mixte Technologique (RMT) Elicitra et le réseau INDuction De RESistance (INDRES).

Le RMT Elicitra a ainsi produit fin 2013 un « guide méthodologique d'évaluation de l'efficacité des stimulateurs des défenses des plantes » à destination des expérimentateurs de terrain et des chercheurs en laboratoire. Ce guide très complet, s'apparente à une synthèse entre méthode d'expérimentation et état de l'art sur les connaissances des SDP. Le chapitre « Essais d'efficacité au champ » renvoie en partie à un document de la Commission des Essais biologiques (CEB) de l'Association Française de Protection des Plantes (AFPP), le document technique N° 18 « Expérimentation des préparations naturelles à activité directe ou indirecte contre les champignons phytopathogènes ou les insectes ravageurs ».

Aux vues des conclusions du sous-groupe de travail « Stimulateurs de défense des plantes et stimulateurs de la vitalité », et après des contacts entre le RMT Elicitra et la CEB portant sur la possibilité d'utiliser un chapitre d'une méthode CEB dans le « guide méthodologique Elicitra », la CEB a proposé en 2014, de développer une méthode spécifique d'expérimentation des SDP. Ce travail est réalisé en partenariat avec le RMT Elicitra et a pour objectif de mettre au point une méthode

d'expérimentation de l'efficacité des SDP, utilisable par les expérimentateurs de terrain, en visant tout particulièrement, en conformité avec les « standards » de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne de Protection des Plantes (OEPP), la constitution de dossiers biologiques dans le cadre des demandes d'AMM.

Un groupe de travail piloté par la CEB, a ainsi été constitué et s'est réuni le 12 juin 2014 pour établir les bases d'un 1^{er} projet de document, à partir des documents existants, de la CEB et du RMT Elicitra. Ce groupe comprend des personnes provenant principalement des groupes ou structures précédemment citées, RMT Elicitra, INDRES, sous-groupes de réflexion sur les méthodes alternatives et CEB. La présence dans ce groupe de personnes spécialisées dans le sujet des SDP, et appartenant à la fois à deux ou trois des structures précitées, facilite grandement la compréhension et les discussions fructueuses et constructives, permettant d'établir un document méthodologique consensuel.

RMT ELICITRA

Le Réseau Elicitra, créé en 2007, a été officialisé en Réseau Mixte Technologique fin 2010. Il est actuellement co-animé par ARVALIS-Institut du végétal, Vegenov et l'INRA et rassemble 30 partenaires publics et privés (instituts et organismes techniques, chambres d'agriculture, organismes professionnels agricoles, recherche, enseignement supérieur, enseignement agricole, pôles de compétitivité). L'objectif de ce RMT est de mieux comprendre, développer, promouvoir les stratégies basées sur le traitement des plantes avec des éliciteurs, ou Stimulateurs des Défenses des Plantes, et d'accélérer le développement de ce moyen de protection des plantes.

INDRES

Le réseau INDuction De RESistance est un réseau de laboratoires de recherche publique constitué en 2010 à l'initiative du département Santé des Plantes et Environnement de l'INRA. Il rassemble des laboratoires de l'INRA, du CNRS et de plusieurs Universités. L'objectif de ce réseau est de structurer les travaux de recherche dans le domaine de la stimulation des défenses des plantes en favorisant la réflexion collective, la coordination de projets et la communication sur ce thème.

CEB

La Commission des Essais Biologique est une commission de l'AFPP dont les membres ont une activité professionnelle s'exerçant ou s'étant exercée dans le domaine de la protection des plantes et dont la compétence est reconnue. Ces membres appartiennent, s'ils sont en activité, à une structure réalisant des essais officiels ou officiellement reconnus, à une structure officielle ou d'évaluation ou à un organisme professionnel concerné par l'expérimentation phytosanitaire (règlement intérieur de la CEB).

Cette commission est chargée de mettre principalement au point des méthodes d'expérimentation pour déterminer l'efficacité pratique en plein champ des préparations destinées à protéger les plantes et les produits végétaux contre les ennemis des cultures. Ces méthodes sont recommandées en vue d'uniformiser la conduite des essais pour étudier les propriétés d'une préparation. Elles sont établies en tenant compte des lignes directrices de l'OEPP lorsqu'elles existent et sont conformes à celles-ci. Elles satisfont ainsi aux exigences minimales des normes ou « standards » de l'OEPP comme requis par le règlement (CE) n° 1107/2009 et permettent donc l'acquisition de données biologiques pour la constitution des dossiers d'AMM des produits phytopharmaceutiques.

PRESENTATION DE LA METHODE

Au moment de la rédaction de cet article (novembre 2014), le propre travail de rédaction de la méthode d'expérimentation CEB dont il est question, est en cours.

Le format de cette méthode est de type « méthode générale » puisque qu'elle ne traite pas d'usage spécifique (culture/bioagresseur), mais d'éléments généraux pouvant être mis en œuvre, dans le cas d'un produit SDP, sur différentes cultures, contre différents bioagresseurs.

Un titre provisoire a été proposé : **MG 14 Principes généraux d'expérimentation des Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP).**

Deux documents ont servi de base à la réflexion et au travail de rédaction :

- Guide méthodologique d'évaluation de l'efficacité des Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP) - RMT ELICITRA (2013).
- DT 18 CEB : « Expérimentation des préparations naturelles à activité directe ou indirecte contre les champignons phytopathogènes ou les insectes ravageurs » (septembre 2009).

L'objet de la suite de cet article est donc d'évoquer les éléments les plus caractéristiques de cette méthode.

DEFINITION

Cette définition est reprise du guide méthodologique du RMT Elicitra.

« On définit par le terme « SDP » toute substance ou tout micro-organisme vivant non pathogène qui, appliqué sur une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée face à des stress biotiques voire abiotiques. Un SDP n'agit généralement pas directement sur les bioagresseurs, il est perçu par la plante comme un message d'alerte. Celle-ci va réagir en préparant ou en mettant en place différents mécanismes de défense, ce qui va concourir à la rendre plus résistante aux attaques de bioagresseurs. On peut ainsi considérer comme SDP un produit efficace sur un couple plante-bioagresseur ne présentant pas d'effet direct notable sur le bioagresseur à la dose efficace sur plante, et capable d'induire dans ces conditions des marqueurs de défense connus (protéines PR, lipoxigénase, phénylalanine ammonia-lyase, ...). »

Il sera sans doute nécessaire de prévoir une phrase permettant de préciser les notions de stress biotiques et abiotiques et leur implication dans la définition de produits SDP ou biostimulants, sachant qu'en parallèle, la CEB développe également une méthode sur les biostimulants, et sachant par ailleurs que la frontière scientifique séparant ces deux notions est bien moins nette que la frontière « administrative » séparant ces deux catégories de produits.

DEMARCHE D'EXPERIMENTATION

La méthode développe une démarche d'expérimentation en quatre points successifs :

- Caractérisation de l'activité stimulatrice des défenses des plantes pour le produit testé,
- Quantification du niveau d'efficacité d'un effet direct éventuel du produit testé,
- Mise en évidence du niveau d'efficacité intrinsèque, quel qu'il soit, du produit testé,
- Mise en évidence de l'intérêt du produit testé, dans une pratique de protection des cultures correspondant à une utilisation réelle.

CARACTERISATION DE L'ACTIVITE SDP

Un produit SDP ne se définit pas tant par le bioagresseur sur lequel il agit que par sa manière indirecte d'agir sur ce bioagresseur. Pour pouvoir prétendre identifier un produit de protection des plantes comme SDP, il est nécessaire de mettre en évidence une fonction stimulatrice des défenses des plantes pour ce produit.

Ces analyses sont réalisées en conditions contrôlée. Le travail pourrait être effectué sur un support qui n'est pas obligatoirement un usage, couple plante/bioagresseur, pour lequel on recherche une efficacité, mais qui peut être une plante modèle. En effet, à cette étape, ce qui est recherché n'est pas la démonstration d'une efficacité, mais la mise en évidence d'une capacité à pouvoir stimuler les défenses d'une plante.

Il existe de nombreuses méthodes pour suivre la mise en place des défenses d'une plante, comme par exemple, sans être obligatoirement exhaustif :

- Les approches par étude de la transcription de gènes consistant à mesurer la régulation de gènes impliqués dans la défense (ex : technique brevetée qPFD)
- Les approches protéomiques concernant les protéines en tant que produits des gènes
- Les approches métabolomiques qui ciblent essentiellement les métabolites secondaires
- Les techniques d'histochimie qui permettent de visualiser des changements à l'échelle cellulaire
- Les techniques de quantification d'hormones jouant un rôle important sur les défenses de la plante, acide salicylique, acide jasmonique, éthylène, acide abscissique, brassinostéroïdes ...

EVALUATION DU NIVEAU D'EFFICACITE D'UN EFFET DIRECT EVENTUEL

La revendication du caractère SDP d'un produit phytopharmaceutique, plus particulièrement dans le cadre d'une AMM, n'a vraiment de sens que si son efficacité est essentiellement due à ce type d'activité. Il semble donc nécessaire de pouvoir mettre en évidence l'absence ou le peu d'efficacité directe du produit étudié sur le bio-agresseur revendiqué, en quantifiant son niveau d'efficacité sur ce dernier.

Il est nécessaire alors de tester l'effet direct du produit avec une gamme de doses du produit à évaluer. Si le bioagresseur est non obligatoire, des tests seront réalisés *in vitro*, tels que par exemple des tests de germination de spores, de croissance mycélienne, bactérienne, de sporulation ... Si le bioagresseur est obligatoire, il faudra se référer à des méthodologies adaptées mises au point par les laboratoires de recherche.

EVALUATION DU NIVEAU D'EFFICACITE INTRINSEQUE

Les produits de type SDP, sans activité directe, ont assez souvent une efficacité faible ou partielle, quand ils doivent assurer seuls la protection d'une culture contre un bioagresseur au champ (utilisation non représentative d'une pratique réelle). Il est cependant important de pouvoir quantifier cette efficacité quelle que soit son niveau, afin de pouvoir situer ce produit dans le « paysage » de protection des cultures pour l'usage concerné. Cette quantification de l'efficacité intrinsèque pourrait se faire sur les usages revendiqués les plus représentatifs, à partir d'essais mis en place selon des méthodes spécifiques telles que celles publiées par la CEB.

Cette évaluation doit enfin être suivie d'une évaluation de l'efficacité du produit dans des conditions pratiques réelles d'utilisation.

EVALUATION DU NIVEAU D'EFFICACITE CORRESPONDANT A LA PRATIQUE D'UTILISATION

Comme vu ci-dessus, les SDP ne couvrent que rarement à eux seuls la protection d'une culture contre un bioagresseur. Dans la pratique, l'utilisation d'un tel produit s'intègre à une stratégie de protection pouvant faire intervenir d'autres produits phytosanitaires ou plus généralement d'autres méthodes de protection des plantes. L'intérêt de l'utilisation du produit dans un processus de protection clairement identifié peut être montré à partir d'essais de valeur pratique, menés sur la totalité des usages revendiqués. Ce type d'essais est déjà décrit dans le document DT18 CEB, repris dans le guide méthodologique du RMT Elicitra et enfin intégré à cette méthode générale.

Ces essais de valeur pratique peuvent mettre en évidence, par exemple :

- La complémentarité d'efficacité du produit testé en mélange, permettant une réduction de la dose de l'autre produit,
- La complémentarité d'efficacité du produit testé en programme, permettant de substituer certains traitements avec d'autres produits,
- L'intérêt de l'utilisation d'un tel produit dans une stratégie anti-résistance.

Un niveau d'efficacité peut ainsi être défini au sein d'une stratégie globale de protection des cultures.

CONCLUSION

Au moment de finaliser cet article (novembre 2014), la rédaction de la méthode générale dont il fait l'objet n'était pas encore achevée et les réflexions du groupe de la CEB en charge de ce travail étaient encore en cours. Cependant, l'avancée de l'élaboration de cette méthode permet d'ores et déjà, à travers cet article, de faire le point sur différents aspects de ce document, en particulier concernant la démarche et le contexte de rédaction mais aussi en décrivant ses principales caractéristiques.

La finalisation de cette méthode, prévue pour mars 2015, devrait permettre une publication par l'AFPP d'ici la fin de l'année 2015. Elle devrait donc être disponible assez rapidement et devrait faciliter le travail des expérimentateurs de produits SDP et faciliter plus particulièrement la mise sur le marché de ce type de produits. L'aboutissement de cette démarche correspond à l'une des actions préconisées par le plan ECOPHYTO concernant les produits de biocontrôle, et répond en partie aux conclusions émises, fin 2012, par le sous-groupe de travail « Stimulateurs de défense des plantes et stimulateurs de vitalité ».

Une dernière étape est à envisager le plus rapidement possible. Il s'agit de valoriser ce travail au niveau européen en proposant cette méthode sous forme de « standard » OEPP, afin qu'elle puisse être utilisée encore plus facilement par les différents acteurs européens, pour la constitution de dossiers biologiques « zonaux » dans le cadre des Autorisation de Mise sur le Marché selon le règlement (CE) n° 1107/2009.

BIBLIOGRAPHIE

Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil. JOCE L 309 du 24/11/2009, 01-50.

Directive 2009/128/CE, instaurant un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable.

Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008 - Plan Ecophyto 2018 de réduction des usages de pesticides 2008-2018.

RMT Elicitra, 2013 - Guide méthodologique d'évaluation de l'efficacité des Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP).

AFPP, 2009 - DT 18 Expérimentation des préparations naturelles à activité directe ou indirecte contre les champignons phytopathogènes ou les insectes ravageurs.

AFPP, 2015 en cours de publication – MG 14 Principes généraux d'expérimentation des Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP) [titre provisoire]