

Résistance du carpocapse des pommés et des poires (*Cydia pomoneUla*) au virus de la granuloUe

Plan de surveillance 2013

Résumé :

Afin de mieux cerner la répartition de la résistance du carpocapse des pommés au virus de la granuloUe nous avons augmenté le nombre d'échantillons testés en 2013. En outre, nous avons amélioré notre protocole pour pouvoir génotyper les individus. Cela nous permet de différencier les individus homozygotes des hétérozygotes résistants. Cette analyse de sensibilité a été effectuée à la fois sur l'isolat M (matière active de la Carpovirusine 2000 et du Madex) sur lequel a été décelé la résistance en 2006, et sur l'isolat R (matière active de la Carpovirusine Evo 2 qui vient d'être mis sur le marché).

Nos résultats montrent que la résistance à l'isolat M est très forte au niveau du foyer historique d'apparition de cet évènement mais aussi qu'elle s'est propagée sur toutes les zones testées. Des individus homozygotes résistants ont pu être détectés à plusieurs reprises cela prouve qu'une grande fréquence allélique du gène de résistance est actuellement présente dans la nature.

Seulement 3 cas de résistance à l'isolat R ont pu être détectés, et cela au niveau du foyer de résistance à l'isolat M. Il n'y a donc pas encore problème avec ce nouveau produit mais il convient de veiller à sa bonne utilisation car une évolution rapide est possible.

Mots-clés : carpocapse des pommés, virus de la granuloUe, isolats

Présentation-contexte

Le plan de surveillance, réalisé en 2012 a permis de montrer la forte présence d'individus résistants, dans les populations de carpocapses échantillonnées, essentiellement dans les bassins de production du Sud-Est de la France.

En 2013, afin d'avoir une idée plus précise de la répartition de cette résistance, un échantillonnage plus complet sur le territoire français a été demandé. Nous avons choisi de tester les deux isolats viraux mis sur le marché :

- CpGV-M agent actif de la formulation commerciale de la Carpovirusine® et du Madex® pour lequel la résistance a été initialement détectée en 2006.
- CpGV-R agent actif de la formulation commerciale de la Carpovirusine evo2® spécialement isolé pour être actif sur insectes résistants.

Deux types d'échantillons ont été analysés :

D'une part, les échantillons demandés dans la note de service 2013 (DGAL/SDQPV/N2013-8086) pour ce plan de surveillance qui ont été répartis dans les trois régions suivantes : Centre, Basse-Normandie et Pays de la Loire ; à raison de 4 échantillons par région (12 au total). Nous avons reçu 7 échantillons dont 6 seulement ont pu être analysés.

D'autre part, des échantillons récoltés personnellement dans la région PACA dans des parcelles commerciales localisées à proximité de notre centre de recherche situé à Avignon (84).

I. Echantillonnage

a. Modalités de prélèvement

Pour les échantillons obtenus par l'INRA d'Avignon:

Durant l'été 2012, des bandes-pièges ont été disposées autour du tronc de pommiers des différentes parcelles étudiées. Ces bandes-pièges sont composées de carton ondulé, les larves viennent s'y nicher afin de passer l'hiver sous forme de larve diapausante. En octobre, ces pièges sont relevés, dépouillés et les larves reconditionnées. Des cartons ondulés propres contenant les larves sont ensuite disposés dans des boîtes identifiées en fonction de leurs origines et sont stockées dans l'insectarium extérieur (qui subit les conditions climatiques extérieures, même température, même photopériode) ; ainsi leur émergence n'est pas trop perturbée, ce qui leur permet de continuer leur cycle biologique de manière naturelle.

Pour les échantillons envoyés par les réseaux de surveillance dans le cadre du plan de surveillance :

Les échantillons (obtenus avec la même méthode que celle décrite précédemment) sont reçus par courrier classique à l'INRA d'Avignon. A réception, les bandes cartonnées sont ouvertes, et les larves sont identifiées, comptées et remises dans un carton ondulé propre, conditionné dans une boîte référencée placée à l'insectarium extérieur.

b. Echantillons traités

Tableau 1 : Liste des échantillons réceptionnés

Prélèvement	Ref l'échantillon	Lieu d'échantillonnage	Nbre de larves reçues	Traitements / Pratiques
Réseau SBT	1	Charleval (13)	14	Carpovirusine + Chimique/ Agri conventionelle
	2	Cavaillon (84)	83	Carpovirusine + Chimique/ Agri conventionelle
	3	St Andiol (13)	81	Carpovirusine + spinosad / Agri bio à partir de 2013
	4	St Vite (47)	121	NA / Agri bio
	5	Beausemblant (26)	457	Carpovirusine + spinosad +Bt + pyrèthres / Agri bio
	6	Loriol sur Drôme (26)	131	Beaucoup chimique / Agriculture conventionelle
	7	Le Cheylas (38)	108	Carpovirusine + spinosad + pyrèthres / Agri bio
INRA	8	Les paluds de noves (13)	73	Carpovirusine + Bt + confusion sexuelle / Agri bio
	9	Mollégès (13)	52	Carpovirusine + spinosad / Agri bio
	10	Mollégès (13)	697	spinosad / Agri bio
	11	Mollégès (13)	42	Carpovirusine + spinosad / Agri bio
	12	Mollégès (13)	258	Carpovirusine + spinosad / Agri bio
	13	St Andiol (13)	40	Carpovirusine + spinosad + neem / Agri bio

II. Méthode

a. Tests préliminaires

Nous avons préalablement étalonné la solution virale que nous utilisons pour les biotests sur larves.

Cet étalonnage nous permet de déterminer les concentrations discriminantes des deux isolats testés. Elle correspond à la quantité de virus nécessaire pour tuer 98% des carpocapses sensibles, mais pour laquelle aucun individu résistant n'est affecté. Cette phase précoce de l'expérimentation est effectuée sur la souche de carpocapse de laboratoire sensible (Sv). Nous testons l'effet d'une gamme de concentration croissante de virus sur 24 individus selon le protocole de biotest décrit plus bas. Une analyse probit est alors réalisée sur les résultats.

b. Test réalisé sur les populations sauvages

Les émergences des papillons sauvages sont relevées quotidiennement, chaque individu est isolé, puis placé dans une boîte avec un individu d'élevage du sexe opposé vierge et sensible

au virus. L'intérêt de faire des couples mixtes (individus sauvages x individus sensibles de laboratoire) est double :

- nous permettre de déterminer le génotype de l'individu sauvage grâce à la mortalité de sa descendance
- augmenter le nombre de descendants car les insectes sauvages se reproduisent très mal en captivité

Nous relevons les émergences jusqu'à obtenir au moins 60 femelles et 50 mâles par population. Les boîtes de couple sont couvertes de parafilm, les carpocapses aimant pondre sur ces surfaces. Ces dernières sont renouvelées de façon hebdomadaire, et les pontes ainsi récoltées sont conditionnées dans des boîtes individuelles référencées par couple en attendant leur éclosion. Une fois les œufs éclos, nous effectuons un biotest sur chaque larve néonate.

Pour se faire, une microplaque de 96 puits est remplie au 2/3 avec du milieu artificiel (Heliothis stonefly diet, commercialisé par l'entreprise Ward's sciences, USA). 6µl d'une solution virale contenant le virus à la concentration discriminante sont ensuite déposés dans chaque puits à la surface du milieu artificiel.

Une larve néonate âgée de quelques heures est déposée à l'aide d'un pinceau dans chaque puits sur du milieu traité. Les puits sont refermés avec du parafilm, nous laissons se développer les larves pendant 7 jours à 21 degrés et photopériode longue (16J :8N). La mortalité est alors estimée (les larves sont considérées comme mortes si elles ne répondent pas à un stimulus (pincement)).

c. Interprétation des résultats

Etant donné que la résistance du carpocapse est mono génique dominante et liée au chromosome sexuel Z (Asser-Kaiser et al 2007¹), le taux de survie aux virus de la descendance d'un couple va nous donner des informations sur le génotype de l'individu sauvage du couple (l'individu de laboratoire est sensible donc SS)

Pour que les résultats soient exploitables, c'est-à-dire que nous puissions déterminer le génotype d'un individu (parent), il faut que nous ayons obtenu au minimum 72 larves néonates (enfants du couple mixte) :

- 24 sur des puits témoins (sans traitements)
- 24 sur des puits traités avec l'isolat viral M à la concentration discriminante
- 24 sur des puits traités avec l'isolat viral R, à la concentration discriminante

¹ Asser-Kaiser S, et al., Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* 317:1916-1918 Sep (2007).

Aussi, beaucoup d'individus n'ont pas eu suffisamment de descendants pour que l'intégralité de ces tests puisse être réalisée. Nous avons donc eu, en plus de la mortalité naturelle hivernale des larves diapausantes, une grande réduction des effectifs génotypés liée au mode opératoire utilisé. Cela représente quand même un volume de plus de 60 000 œufs pour 27 750 larves néonates testées à partir de 1 006 couples individuels réalisés.

III. Résultats

a. Résultats des tests préliminaires

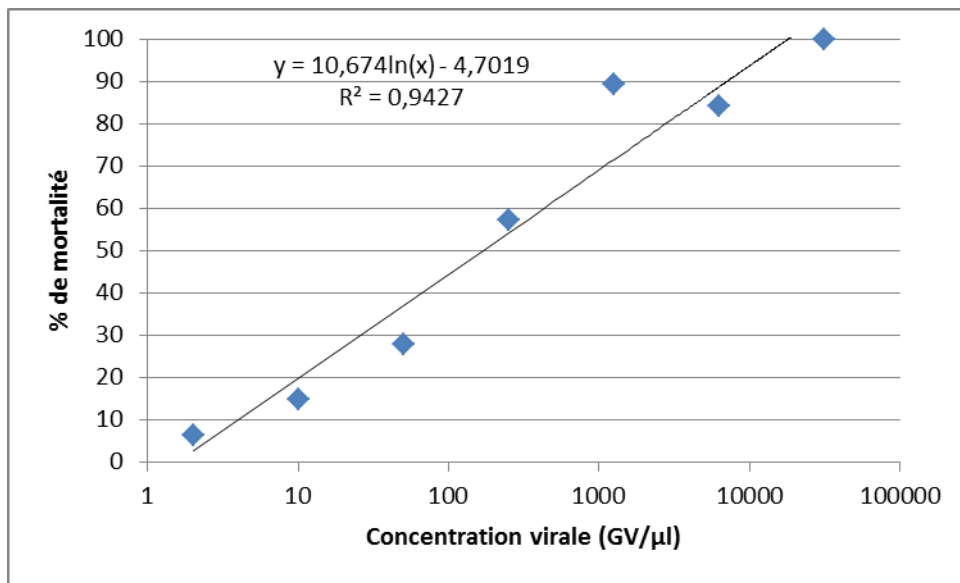


Figure 1 : relation dose – mortalité de notre souche sensible de laboratoire Sv envers l'isolat viral R (carpovirusine Evo 2)

Gamme préliminaire avec R : l'analyse probit donne une DL98 à 12 000 GV/μl = concentration qui sera utilisée dans les biotests

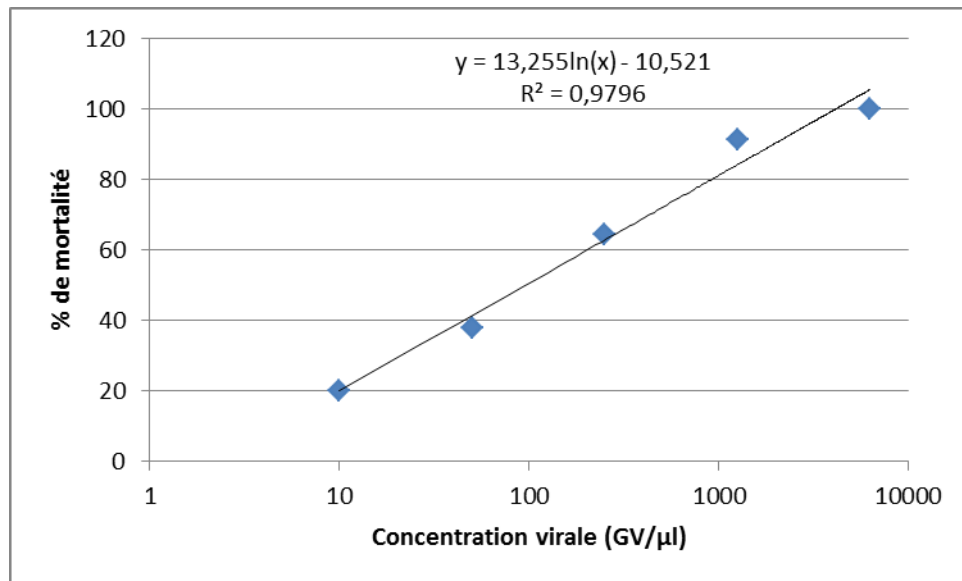


Figure 2 : relation dose – mortalité de notre souche sensible de laboratoire Sv envers l'isolat viral M (Carpovirusine 2000)

Gamme préliminaire avec M : l'analyse probit donne une DL98 à 4 121 GV/μl = concentration qui sera utilisée dans les biotests.

b. Résultats sur populations sauvages

Quant à l'isolat M (Carpovirusine 2000), nous avons détecté de nombreux cas de résistance. Ils sont listés dans le tableau 2. Lors de la lecture des tests, les résultats nous sont clairement apparus. C'est-à-dire que les individus classés sensibles avaient 100% de leur descendance qui mourait avec des symptômes de virose alors que les individus résistants (homozygotes ou hétérozygotes) avaient des profils (100% ou 50 % de survie) assez tranchés. Nous avons eu donc peu d'individus « inclassables » ce qui prouve la fiabilité du mode opératoire choisi (concentration discriminante bien calibrée, résistance bien portée par un seul gène majeur de résistance).

Seuls trois individus ont montré des signes de résistance à l'isolat R (Carpovirusine Evo 2). Ils ont été génotypés comme hétérozygotes résistants (RS). Deux d'entre eux proviennent de la parcelle 145 et un de la parcelle 168. Il s'agit des deux parcelles qui ont la plus grande fréquence d'individus résistants. Nous n'avons pas pu conserver les descendants de ces individus pour faire des tests supplémentaires.

Tableau 2 : Recherche d'individus résistants au virus de la granulose isolat M (Carpovirusine 2000) au sein de 13 populations sauvages de carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*)– Plan d'échantillonnage 2012

Ref l'échantillon	Localité (Département)	Nb d'individus testés	Nb d'individus sensibles (SS)	Nb d'individus Résistants (RS)	Nb d'individus Résistants (RR)
1	Charleval (13)	2	2	0	0
2	Cavaillon (84)	22	18	3	0
3	St Andiol (13)	22	18	4	0
4	St Vite (47)	37	34	3	0
5	Beausemblant (26)	51	48	2	1
6	Loriol sur Drôme (26)	37	30	5	1
7	Le Cheylas (38)	58	40	8	1
8	Les paluds de Noves (13)	23	16	6	1
9	Mollégès (13)	15	6	4	5
10	Mollégès (13)	36	6	16	14
11	Mollégès (13)	8	8	0	0
12	Mollégès (13)	54	12	28	14
13	St Andiol (13)	9	8	1	0

IV. Conclusion-Perspectives

Ce plan de surveillance a permis de détecter de nombreux cas de résistance au virus de la granulose pour l'isolat M (Tableau 2). Nos résultats confirment bien que le foyer de la résistance se situe au niveau de la zone de Mollégès, avec des populations composées de plus de 80% d'individus résistants. Il faut également noter que nous avons trouvé des individus résistants dans toutes les populations qui ont pu être testées (Figure 3). Cette affirmation est vraie même dans les parcelles où le virus de la granulose n'a pas été pulvérisé, ou bien en alternance avec des produits chimiques avec lesquels, a priori, il n'y a pas de résistance croisée. Ce constat est sans doute lié au fait que le coût physiologique de cette résistance est très faible, voire négatif (Undorf-Spahn K, 2012²; et données personnelles non publiées). La dispersion naturelle du carpocapse permet donc à cette résistance de se propager même en l'absence de pression de sélection. Enfin, la présence d'individus homozygotes résistants dans 8 parcelles testées sur 13 confirme que l'allèle de résistance est présent à grande fréquence. En effet, pour qu'un individu homozygote résistant (RR) voie le jour il faut que deux adultes hétérozygotes résistants (RS) puissent se rencontrer et s'accoupler entre eux. La probabilité de cet événement est faible tant que la fréquence des individus hétérozygotes est faible (effet de dilution de la résistance).

Les cas très peu nombreux de résistance au nouvel isolat viral R mis sur le marché en 2012 ne laissent pas présager pour l'instant de problèmes d'efficacité sur le terrain avec le produit carpovirusine Evo2. Cependant, cela montre qu'il faut mettre en place rapidement un système de gestion de ces résistances pour augmenter la durabilité de ces deux solutions de lutte qui peuvent être rapidement contournées sur l'ensemble du territoire. Le fait que les seuls cas de résistance à l'isolat R soient localisés au niveau du foyer de résistance à l'isolat M n'est pas un hasard. En effet, les trois individus hétérozygotes résistants (RS) pour l'isolat R sont homozygotes résistants (RR) pour l'isolat M. Il y aurait donc ici un premier signe de résistance croisée même si le faible nombre de cas observés ne permet pas de tirer de conclusions définitives.

² Undorf-Spahn K, Fritsch E, Huber J, Kienzle J, Zebitz CPW, and Jehle JA, High stability and no fitness costs of the resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M). *J Invertebr Pathol* **111**:136-142 Oct (2012).