

Bilan : Plan de surveillance 2017

Résistance du puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea*) vis-à-vis du flonicamide

Objectif : développement méthode / recherche première résistance

Rédacteurs : Claire Mottet, Elorri Segura, Benoît Barrès

Résumé :

Après les essais d'élevage réalisé en 2016, nous nous sommes attachés cette année à la mise au point d'une méthode de test de résistance du puceron cendré du pommier, *Dysaphis plantaginea*, au flonicamide. Le protocole de test par trempage de feuilles a été développé, il est maintenant opérationnel. Sa mise en œuvre sur 9 clones issus de 6 prélèvements de terrain a permis de détecter 2 clones résistants. Ces premiers résultats devraient permettre de définir une dose discriminante. Une fois la dose discriminante déterminée, celle-ci sera utilisée pour cribler les clones potentiellement résistants à partir de populations.

Contexte

Dysaphis plantaginea (Passerini, 1860), le puceron cendré du pommier, a pour hôte primaire le pommier (*Malus communis*), et pour hôte secondaire le plantain (*Plantago lanceolata*). Il est le plus nuisible des pucerons des pommiers car il est très fécond (reproduction par parthénogénèse) et très nuisible tôt au printemps. Il provoque, par ses piqûres, de graves déformations des organes végétaux. Les feuilles se recroquevillent et peuvent tomber, les rameaux sont déformés, la chute physiologique est contrariée, les fruits restent nombreux, petits et bosselés. La lutte contre ce ravageur est principalement chimique (malgré l'existence de quelques variétés résistantes).

Pour cette première année de tests, l'objectif était double : finaliser la mise au point de la méthode de tests, et obtenir de premiers résultats sur quelques clones, afin de définir la ligne de base avec cette méthode pour un clone de référence sensible, et, si possible, de déterminer une dose discriminante.

Matériels et Méthodes

1) Prélèvements

Le plan de surveillance 2017 prévoyait 5 prélèvements sur des parcelles issues de 5 régions différentes (un pour chaque région : Aquitaine, Centre, Occitanie, PACA, AURA, annexe 3 de la note de service DGAL/SDQSPV/2016-992 du 20/12/2016, Figure 1), si possible réalisés dans des parcelles où il existait une pression de sélection au flonicamide. Chaque prélèvement devait être constitué de 30 pousses provenant de 30 arbres différents répartis sur la parcelle (voir fiche de prélèvement en annexe). Au total, 6 prélèvements ont été reçus (Figure 1).

En parallèle de ces prélèvements, un clone de référence sensible a été testé : 16-0042-0001. Ce clone, issu de pommier isolé non traité, est élevé en laboratoire depuis 2016, sa sensibilité au flonicamide a été évaluée par des tests en gamme de doses, et comparée à celle d'autres clones. On considère que ce clone a une DL50 basse.

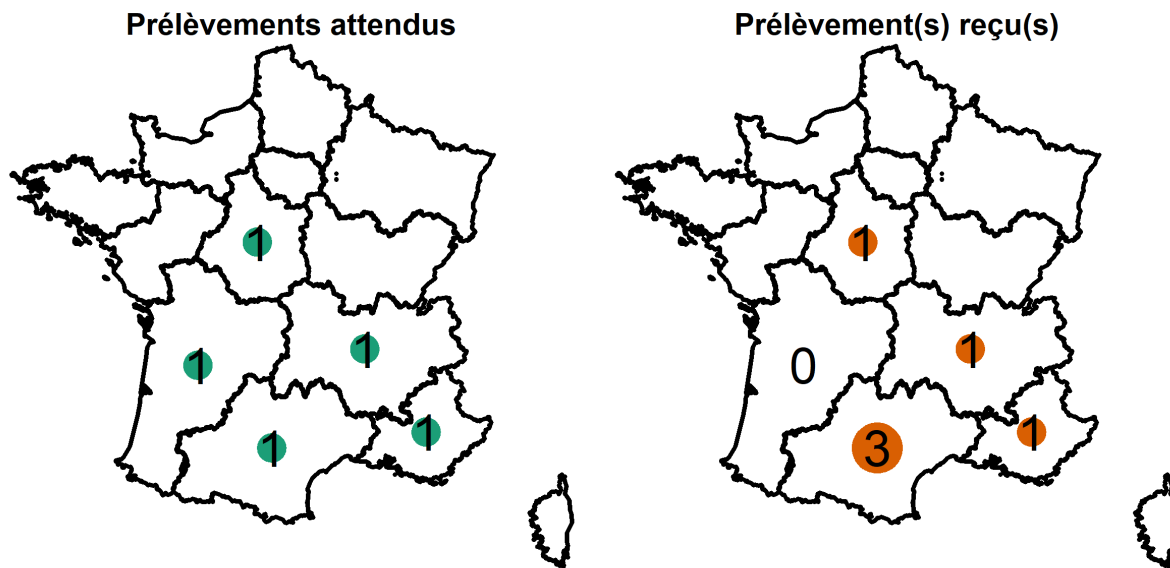


Figure 1 : Répartition des prélèvements prévus et reçus en fonction des régions.

2) Produits phytosanitaires

Le flonicamide est un produit de la famille des Pyridine-carboxamide, il est systémique et agit par inhibition de la prise alimentaire, par contact et ingestion.

Pour ce test biologique par trempage de feuilles, c'est le produit formulé qui est utilisé, nous avons employé le Teppeki (formulé à 50% de flonicamide, Belchim Crop Protection France S.A).

3) Mise en place du protocole

L'objectif, lors du développement de la méthode de test, était de disposer d'un test simple, qui ne requiert pas trop de temps de manière à pouvoir tester les pucerons dès le stade visé atteint, miniaturisé pour utiliser le support feuilles de plantain. Il a d'abord fallu s'assurer que le trempage de feuille (qui agit par contact tarsal surtout, et par ingestion) était approprié pour le flonicamide. Les premiers tests ont permis de le vérifier : nous avons bien obtenu des courbes dose-réponses qui suivent la sigmoïde attendue.

Nous avons systématisé la conduite de l'élevage et synchronisé les pucerons pour disposer de suffisamment d'adultes le jour de la mise en test (environ 75 adultes pour un test en gamme de doses), et apporté quelques ajustements de manière à limiter la mortalité dans le témoin (pour un maximum de 10% de mort dans le témoin).

Résultats et Interprétations

1) Protocole de test

Dans le contexte de la mise au point de la méthode, le premier résultat consiste en l'établissement du protocole de test.

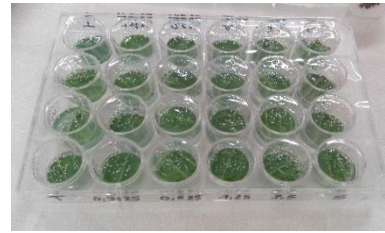
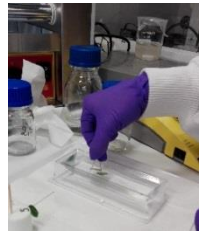
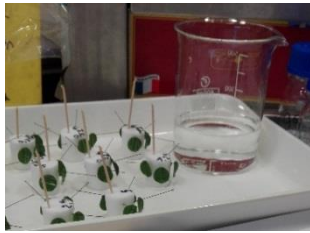
Le test par trempage de feuilles a été développé à partir de la méthode IRAC 019.v3.2. (2018) recommandée pour les tests de résistance sur pucerons. Il consiste à exposer des larves de premier stade à des feuilles de plantain traitées avec une gamme de dose de flonicamide, en laissant pondre des adultes pendant 24h directement sur les feuilles traitées, et en évaluant la mortalité après 120h d'exposition. Chaque test est constitué de 5 doses + un témoin non traité, avec dix à douze répétitions par dose.

Pour cette première année de tests, nous avons travaillé sur des clones, issus des prélèvements de terrain et multipliés sur plantain, clone par clone.

Le protocole de test est le suivant :

- Multiplication et synchronisation des pucerons jusqu'à obtenir environ 75 adultes par clone simultanément.
- Détermination et préparation d'une gamme de doses en solution aqueuse, ajustée à chaque clone par tâtonnements successifs jusqu'à encadrer la DL50 et couvrir au mieux la gamme de mortalité du clone (si possible de 0 à 100 % de mortalité).
- Préparation des plaques 24 puits : des feuilles de plantain d'un clone unique sont récoltées, lavées et découpées à l'emporte-pièce de manière à obtenir des disques de feuilles de la taille des puits des plaques. Les disques de feuilles sont piqués sur de fines épingles et trempés dans les solutions aux différentes concentrations pendant dix secondes exactement, puis mis à sécher en piquant les épingles dans des bouchons, de manière à ce que les disques ne soient pas en contact ni entre eux ni avec quoi que ce soit. Ils sont ensuite déposés dans des puits de microplaques à 24 puits sur de l'agar en fusion tiède.
- Dépôt d'un adulte par puits à l'aide d'un pinceau, et thermo-scellage des plaques. Une aération est rendue possible par la réalisation de dizaines de trous par puits dans le film de thermo-scellage à l'aide d'épingles.
- Retrait des adultes après 24h, et comptage des larves pondues dans chaque puits pour faciliter la lecture.
- Evaluation de la mortalité après 120h par dénombrement des vivants, des moribonds et des morts (sont considérés moribonds les pucerons qui, retournés sur le dos à l'aide d'un pinceau, sont incapables de se retourner et d'avancer dans les 15 secondes suivantes).
- Analyse des résultats et détermination de la DL50 avec le package 'drc' (Ritz et al, 2015) dans le logiciel R (R Core team, 2018). Une comparaison avec les résultats obtenus sur le clone sensible qui sert de référence (16-0042-0001) est réalisée en calculant le facteur de résistance ($FR = \frac{DL50_{\text{échantillon}}}{DL50_{\text{référence sensible}}}$). Pour être valable, une

répétition de test doit comporter au moins vingt individus en moyenne par dose, et la mortalité enregistrée dans le témoin non traité doit être inférieure à 10%.



2) Résultats du plan

A partir des prélèvements, 9 clones provenant de seulement de 4 des 6 prélèvements reçus ont pu être maintenus en élevage durablement, et être testés (Tableau 2).

Tableau 2 : liste des clones testés

Clone	Prélèvement d'origine	Référence expéditeur
16-0042-0001	référence sensible	-
17-0036-0001	17-0036	17-82-006
17-0036-0002	17-0036	17-82-006
17-0041-0002	17-0041	17-82-005
17-0041-0003	17-0041	17-82-005
17-0041-0004	17-0041	17-82-005
17-0041-0007	17-0041	17-82-005
17-0046-0002	17-0046	17-82-007
17-0046-0006	17-0046	17-82-007
17-0053-0004	17-0053	17-CE-37-03

Les clones ont été soumis à une gamme ajustée en fonction des premiers résultats obtenus, pour chaque clone, 5 doses ont été choisies parmi les doses suivantes (en plus du témoin non traité, systématiquement inclus) :

0,1 – 0,5 – 1 – 2,5 – 12,5 – 62,5 – 312,5 – 1562,5 mg/L de flonicamide.

Les DL50 obtenues pour chaque clone, servant de base de comparaison avec la DL50 de la référence sensible, sont présentées ci-dessous (Tableau 3, Figure 2). Les facteurs de résistance ont été calculés par rapport à la référence sensible.

Tableau 3 : résultats des tests biologiques vis-à-vis du flonicamide

Clone	Nombre moyen d'individus/dose	Taux de mortalité du témoin	DL50 (mg/L)	FR
16-0042-0001	250	10%	0,42	-
17-0036-0001	112	1%	0,57	1
17-0036-0002	122	6%	0,55	1
17-0041-0002	147	5%	1,25	3
17-0041-0003	245	8%	4,21	10
17-0041-0004	70	5%	4,67	11
17-0041-0007	185	4%	1,40	3
17-0046-0002	38	2%	1,07	3
17-0046-0006	44	5%	0,31	1
17-0053-0004	35	9%	0,74	2

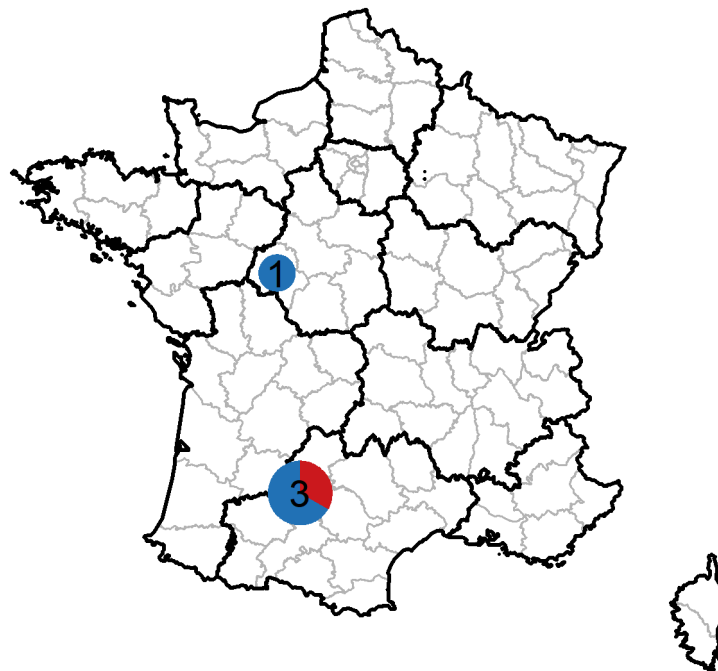


Figure 2 : Cartes des résultats de la recherche de clones résistants dans des populations de *D. plantaginea*. La couleur bleue représente les prélèvements dans lesquels aucune résistance n'a été détectée. La couleur rouge représente les prélèvements dans lesquels une résistance a été détectée selon le protocole utilisé. Il suffit qu'un seul clone au sein de la population soit identifié comme résistant pour que le prélèvement soit déclaré résistant. Le chiffre à l'intérieur des camemberts représente l'effectif pour lesquels un résultat a été obtenu.

3) Interprétation

Dans un contexte de mise au point de méthode, il n'était pas possible d'analyser les prélèvements sous forme de population. Il est en effet impossible de maintenir en élevage une population de clones en étant sûr que la représentativité des différents clones au sein de l'élevage ne varie pas. C'est pourquoi cette année les prélèvements dès leur arrivée ont été élevés en lignées clonales. Ce sont donc un faible nombre de clones qui ont été testés, et non pas des populations. Les résultats présentés ici ne sont donc pas très représentatif de la fréquence des individus résistants au sein des prélèvements étudiés.

Parmi les 9 clones issus des prélèvements de terrain testés, 4 sont franchement sensibles au flonicamide (facteur de résistance proche de 1), 3 présentent une dérive de sensibilité (facteur de résistance de 2-3), et 2 sont résistants au flonicamide, avec un facteur de résistance autour de 10. A noter que les deux clones résistants proviennent de la même parcelle (située en Occitanie). L'un de ces clones (17-0041-0003) est conservé en élevage au laboratoire pour servir de référence résistante. Bien qu'il soit impossible de statuer sur l'occurrence ou la fréquence de la résistance au flonicamide de *D. plantaginea*, des cas de résistance à cette substance active ont bel et bien été détectés.

Conclusions

Le protocole de test de la résistance au flonicamide de *D. plantaginea* par trempage de feuilles est aujourd'hui fonctionnel pour tester des lignées clonales. Nous avons ainsi pu détecter des individus résistants. Deux clones de *D. plantaginea* issus d'une même parcelle (Occitanie) présentent une résistance d'un niveau non négligeable (facteur de résistance de 10). L'identification de ces individus résistants devrait permettre de définir une dose discriminante, qui pourra être utilisée sur les prélèvements de terrain (potentiellement composés de génotypes divers). Cela évitera une phase de multiplication en clone longue et lourde qui limite très fortement le nombre de prélèvement pouvant être analysé.

Partenaires

Expert référent Résistances de la DGAL

M. Jacques Grosman – DRAAF-SRAL Rhône Alpes – 165 rue Garibaldi – BP 3202 – 69401 Lyon cedex 03 – France.

Expert référent Arboriculture DGAL

M. Bertrand Bourgoïn – DRAAF-SRAL Midi-Pyrénées – Cité administrative – Boulevard Armand Duportal – 31074 Toulouse Cedex – France.

Réseau des DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles de la Surveillance Biologique du Territoire pour la participation aux prélèvements.

Références citées

IRAC Susceptibility Test Methods Series Method No: 019, Version: 3. <https://www.irc-online.org/methods/aphids-adulnymphs/>

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015) Dose-Response Analysis Using R PLOS ONE, 10(12), e0146021

Date de validation / dernière édition : 05/03/2019

Annexe(s)

Annexe 1

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

***Dysaphis plantaginea* / Pommier / flonicamide et néonicotinoïdes**

Objet : Identifier, chez le puceron cendré, des phénomènes de résistances au flonicamide par des méthodes de tests biologiques et/ou aux néonicotinoïdes (acétamipride, thiaclopride, ...) par des méthodes de tests biomoléculaires.

Choix des parcelles : Les prélèvements sont à réaliser dans des parcelles où il existe une pression de sélection aux substances actives flonicamide et/ou de la famille des néonicotinoïdes (acétamipride, thiaclopride, ...). Le nombre de prélèvements par région est précisé dans l'annexe 3 de la Note de Service DGAL/SDQSPV/2016-992.

Période(s) de prélèvement : d'avril à juin

Collecte : un prélèvement est constitué comme suit

- 30 pousses provenant de 30 arbres différents répartis sur la parcelle
- Ne pas prélever de feuilles humides

Conditionnement :

- Enrouler chacune des pousses dans du papier absorbant puis la placer dans un sachet plastique fermé bien hermétiquement (type zip)
- Regrouper ensemble les sachets contenant les pousses d'une même parcelle dans un carton rigide
- Conserver les sachets dans une glacière puis au réfrigérateur jusqu'à l'envoi

Expédition :

- compléter la fiche pour chaque prélèvement de manière exhaustive
- joindre cette fiche au prélèvement
- envoyer par Chronopost les échantillons le plus rapidement possible après le prélèvement, **en début de semaine** (du lundi au mercredi)
- prévenir le laboratoire par courriel juste avant l'envoi (severine.fontaine@anses.fr; laetitia.caddoux@anses.fr et claire.mottet@anses.fr)

ANSES LYON- Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires

Secteurs Entomologie / Biologie Moléculaire

31 avenue Tony Garnier – 69364 LYON Cedex 07

Tél : 04.78.72.65.43 (standard) – 04.78.69.68.37 ou 04.81.92.19.06 (directs)

Fax : 04.78.61.91.45

Annexe 2

Réception des prélèvements prévus au plan de surveillance 2017

Régions	Prélèvements prévus	Prélèvements reçus	Prélèvements maintenus en élevage
Aquitaine	1	0	0
Centre	1	1	1
Occitanie (MP – LR)	1	3	3
PACA	1	1	0
AURA (Rhône-Alpes)	1	1	1
Total	5	6	5