

# Test d'évaluation des résistances de populations sauvages de carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) aux insecticides

Sandrine Maugin<sup>1</sup>, Myriam Siegwart<sup>1</sup>

**Résumé.** De nombreuses méthodes ont été utilisées pour estimer le niveau de résistance aux insecticides de populations sauvages de carpocapses de la pomme, *Cydia pomonella*, mais un besoin de standardisation et de travail sur le stade cible s'est vite avéré essentiel. Cet article présente la méthode mise au point pour cette standardisation : la reproduction d'individus sauvages dans un premier temps, le biotest en microplaque dans un deuxième temps et enfin quelques exemples de résultats et leur interprétation.

**Mots clés :** *Cydia pomonella*, carpocapse de la pomme, biotest, résistance insecticide

## Introduction

Le carpocapse, *Cydia pomonella*, est un insecte ravageur majeur en verger de pommiers. L'utilisation massive d'insecticides pour lutter contre ce ravageur a entraîné l'apparition d'individus résistants. De nombreuses méthodes ont été utilisées pour évaluer cette résistance mais la plupart étaient réalisées sur des stades non-cibles des insecticides : larves à différents stades, adultes ou larves diapausantes. Cependant il existe des différences d'expression des mécanismes de résistance selon les stades de développement (Sauphanor et al., 1998, Bouvier et al., 2002). Une méthode de standardisation des analyses a donc été mise en place (Reyes et Sauphanor, 2008), avec des biotests effectués sur le stade cible des insecticides : la larve néonate qui présente des résultats bien plus homogènes.

La méthode proposée dans cet article est un test en laboratoire réalisé sur larves néonates, permettant d'évaluer les résistances à différents insecticides chimiques ou biologiques, d'un grand nombre d'individus sauvages, c'est-à-dire piégés dans les vergers. Ce test va de la reproduction des individus sauvages à l'estimation de la mortalité de leurs descendants.

Dans un premier temps sera présenté le travail fait en amont afin d'obtenir des néonates nécessaires à notre test, dans un deuxième temps le test en lui-même et dans un troisième temps quelques résultats obtenus ainsi que leur interprétation.

## Matériel et méthodes

### Matériel biologique

Tout d'abord, une souche de laboratoire est testée afin de déterminer une ligne de base, courbes dose/réponse s'étalant de 0 à 100 % de mortalité de façon progressive, pour les divers insecticides testés, que nous passons ensuite sur des populations sauvages collectées sur le terrain.

La souche de laboratoire utilisée pour établir cette ligne de base provient d'un élevage de masse de *Cydia pomonella* conduit sur milieu artificiel. Elle est issue d'une population en provenance de la région d'Avignon, où elle est maintenue en élevage depuis plus de 20 ans sans aucune pression de sélection.

Les populations sauvages sont récoltées à l'automne dans les vergers de pommiers et conservées tout l'hiver soit en conditions naturelles, soit dans une chambre froide à 4 °C afin qu'elles y effectuent leur diapause.

<sup>1</sup> Plantes et Systèmes de culture horticoles, INRA, 84000 Avignon, France  
sandrine.maugin@inra.fr

## Reproduction de la population sauvage de carpocapse

Cette étape, cruciale pour le déroulement du reste de l'expérimentation, est la plus délicate. En effet, les carpocapses directement issus des vergers s'accouplent mal, voire pas, en milieu confiné. Il convient donc de les placer dans un environnement le plus proche possible de leur milieu naturel.

Cette étape se fait en conditions contrôlées pour nous affranchir des variations climatiques et des traitements insecticides opérés sur le terrain. Pour ce faire entre 10 et 20 couples d'individus sauvages sont placés dans une bouteille dont le fond a été découpé et remplacé par un tulle afin de laisser circuler l'air. Nous plaçons un coton humide dans cette bouteille pour conserver une certaine humidité et permettre aux papillons de s'abreuver. Des pommes sont ensuite placées devant les bouteilles, côté tulle, afin de stimuler l'oviposition. Nous augmentons l'humidité à l'intérieur des bouteilles par une brumisation quotidienne à l'aide d'un pulvérisateur et d'un voile humidifié posé sur l'ensemble bouteilles et pommes.

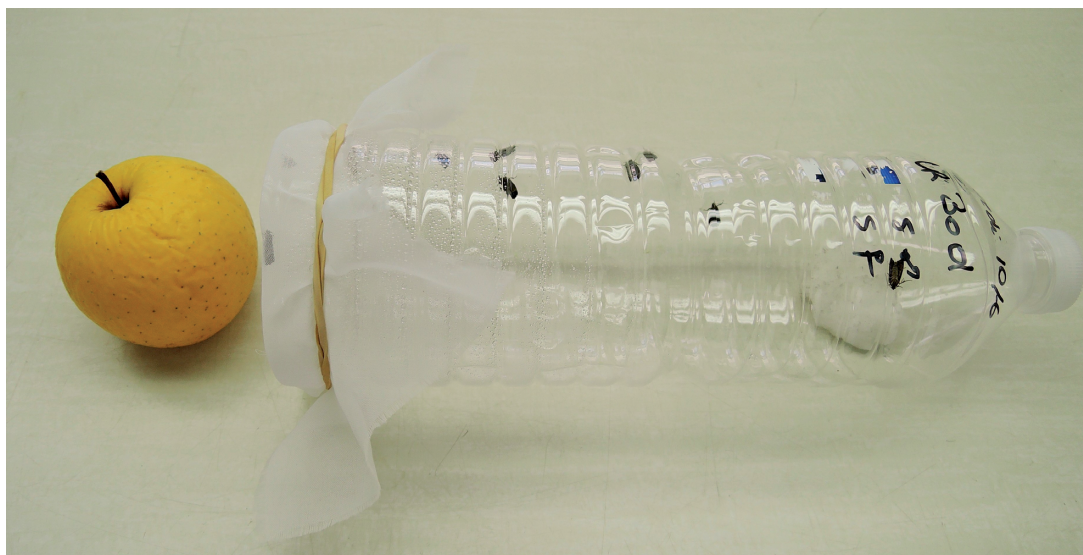


Figure 1. Bouteille de ponte (photo : INRA).

## Obtention des larves néonates

Au bout de 7 jours à une température de 23°C et à une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit, les papillons survivants sont transférés dans une nouvelle bouteille. L'ancienne bouteille est alors découpée afin de récupérer les pontes qui sont mises à incuber dans des boîtes rondes (80 mm x 50 mm) en présence d'un coton dentaire humidifié pour assurer une humidité relative optimale pour l'éclosion. Placés à 23 °C, les œufs éclosent de façon continue.

## Biotest

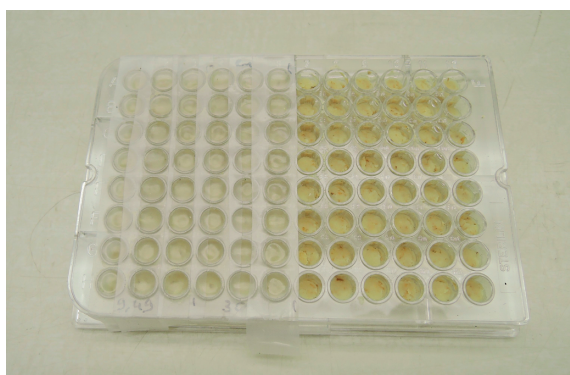
### Préparation du milieu

Le milieu nutritif est préparé au laboratoire à base d'une poudre commerciale (Stonefly diet, industries Wards Sciences®, USA), contenant des éléments nutritifs, à laquelle on ajoute de l'eau et de l'acide acétique. Le milieu fini se présente sous forme d'une pâte molle.



Ce milieu est injecté à l'aide d'une seringue sans aiguille dans les puits d'une plaque de microtitration. Le milieu est ensuite lissé à l'aide d'une tête de clou au diamètre des puits. Chaque puits est ainsi rempli au deux tiers (soit environ 150  $\mu$ L de milieu par puits) et présente une surface plane. Les plaques (Sterilin microtitre plate 96 well / flat bottom) contiennent 96 puits coniques à fond plat : 12 colonnes x 8 lignes (**Figure 2**).

Les traitements sont réalisés en appliquant, à l'aide d'une micropipette, 6  $\mu$ L de solution insecticide sur la surface du milieu nutritif (6  $\mu$ L d'eau distillée pour le témoin).

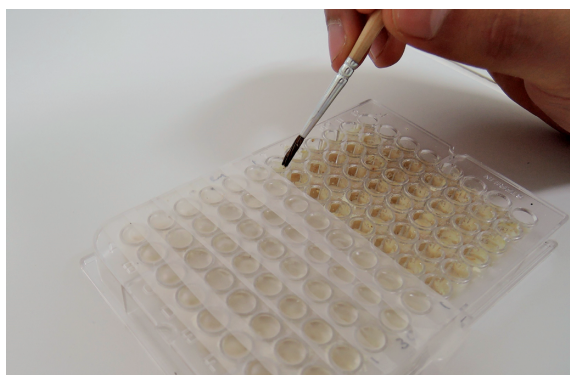


*Figure 2. Microplaque avec milieu nutritif (photo : INRA).*

### Installation des larves

Les larves néonates (stade larvaire L1, âge 0-4 h) sont prélevées à leur éclosion avec un pinceau humidifié et placées sur le milieu traité (**Figure 3**). Afin d'éviter toute trace d'insecticide dans les témoins nous utilisons un pinceau noté témoin uniquement dédié à cet usage.

Pour chaque test préliminaire ou définitif, l'infestation est réalisée sur 24 répliquats par concentration (une larve par puits), en commençant par installer les larves sur les témoins puis sur les différentes concentrations dans l'ordre croissant. Après la concentration la plus forte, le pinceau est rincé à l'alcool puis à l'eau distillée, et séché sur un papier absorbant. Nous répétons ensuite l'opération autant de fois que nécessaire.



*Figure 3. Installation d'une larve de carpocapse sur une microplaque préalablement traitée (photo : INRA).*

Dès que tous les puits d'une colonne de huit puits sont infestés, ils sont fermés par un morceau de parafilm.

La microplaque est ensuite placée pendant 7 jours en conditions optimales de développement pour ce stade, à 24 °C, 40 % d'humidité relative et 16 h d'éclairage par jour.

### Lecture du test

La lecture du test est effectuée par dénombrement sous loupe frontale des larves vivantes et mortes dans chaque modalité. Lors de la lecture, on distingue :

- ✓ les larves vivantes ;
- ✓ les larves moribondes, qui répondent à la stimulation de la pince mais sont incapables de se déplacer et sont comptées comme mortes ;
- ✓ les larves mortes, qui sont immobiles et ne répondent pas à deux stimulations avec une pince.

## Analyse des tests

Pour chaque concentration, la mortalité est corrigée par rapport au témoin, par la formule d'Abbott :

$$MC (\%) = \frac{MT (\%) - Mt (\%)}{100 - Mt (\%)}$$

Avec : MC = Mortalité Corrigée ; MT = Mortalité de la concentration ; Mt = Mortalité du témoin

Les données corrigées par rapport au témoin sont soumises à une analyse Probit permettant de déterminer la régression log. dose / probit mortalité, les concentrations létales avec les intervalles de confiance à 95 % selon la méthode Finney (Raymond, 1985), et les rapports de résistance. Les résultats sont analysés au moyen d'un logiciel d'analyse Probit : Priprobit (libre d'accès sur internet). Dans le cas, occasionnel, où des larves ne sont pas retrouvées à la lecture, elles sont soustraites de l'effectif initial.

## Exemple de tests préliminaires sur souches de laboratoire

Dans l'exemple présenté ci-dessous, nous allons nous intéresser à deux souches de laboratoire : une souche de référence sensible (SV) et une souche résistante à azinphos methyl (RAZ). Nous avons soumis ces deux souches à deux biotests : l'une avec un produit A et l'autre avec un produit B (Figure 4).

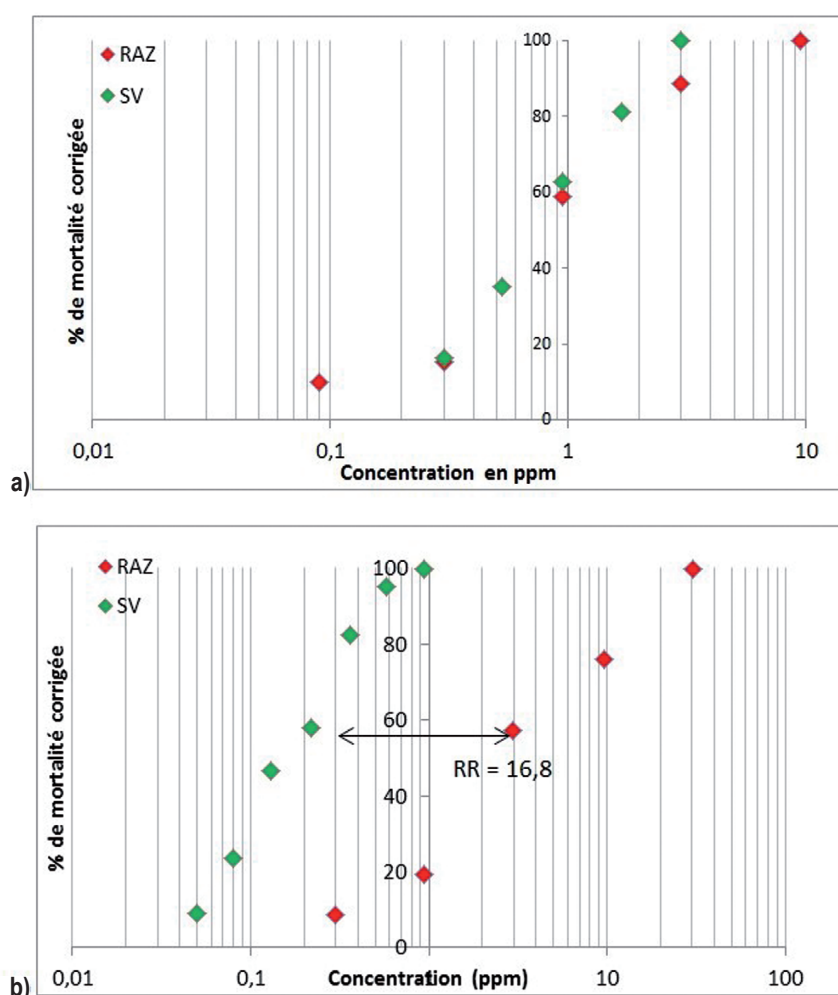


Figure 4. Résultats de biotests effectués sur les souches SV et RAZ avec a) l'insecticide A et b) l'insecticide B.



Ces résultats nous montrent qu'il y a une différence de sensibilité entre ces deux souches pour l'insecticide B alors qu'il n'y a pas de différence visible pour l'insecticide A.

**Tableau 1.** Analyse probit (logiciel Pripobit) des résultats des biotests obtenus sur les deux souches de carpocapse des pommes (souche RAZ résistante et souche de référence sensible SV), avec deux insecticides. Concentrations létales pour induire 50 % et 95 % de mortalité, les intervalles de confiance à 95 % sont entre parenthèses, et rapport de résistance entre les souches. Les différences significatives (non chevauchement des intervalles de confiance) par rapport à la souche de référence SV sont marquées par une étoile \*.

Souche		DL50		DL95	
		Produit A	Produit B	Produit A	Produit B
SV	Dose létale (ppm)	0,72 (0,59-0,85)	0,16 (0,13-0,18)	2,59 (1,97-4,01)	0,62 (0,48-0,91)
RAZ	Dose létale (ppm)	0,81 (0,60-1,06)	2,69* (1,98-3,58)	4,40 (2,95-8,40)	23,75* (14,81-48,90)
	Resist Ratio	1,1	16,8	1,7	38,3

Des différences significatives sont observées pour le produit B avec des rapports de résistance élevés (**Tableau 1**). Dans notre exemple cela signifie qu'il faut 16,8 fois plus d'insecticide pour induire 50 % de mortalité dans la souche RAZ et 38,3 fois plus d'insecticide pour induire 95 % de mortalité.

## Conclusion

Ce test utilisé sur le stade cible de l'insecticide, à savoir la larve néonate qui est exposée au traitement avant de rentrer dans le fruit, nous permet d'avoir des résultats plus homogènes. Le mode d'exposition, c'est-à-dire le dépôt de larves néonates sur du milieu préalablement traité en surface, permet la réalisation d'un grand nombre d'échantillons, donc améliore la robustesse d'analyse et garantit à la fois une bonne reproductibilité des résultats et une assez bonne conformité avec les conditions d'applications au champ.

Ce test est également réalisable avec d'autres lépidoptères. Il a permis la caractérisation de résistances de la pyrale du maïs (Siegwart et al., 2014) et de la tordeuse orientale du pêcher (Siegwart et al., 2011).

## Références bibliographiques

Bouvier JC, Boivin T, Beslay D, Sauphanor B (2002) Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* **51** : 55-66.

Raymond M (1985) Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour microordinateur. *Entomol Med Parasitol* **23** : 117-121.

Reyes M, Sauphanor B (2008) Resistance monitoring in codling moth : a need for standardization. *Pest Manag Sci* **64** : 945-953.

Sauphanor B, Bouvier JC, Brosse V (1998) Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in southeastern France. *J Econom Entomol* **91** : 1225-1231.

Siegwart M, Monteiro LB, Maugin S, Olivares J, Carvalho SM, Sauphanor B (2011) Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations. *J Econom Entomol* **104** : 636-645.

Siegwart M, Maugin S, Thibord JB, Doucet R, Flodrops Y (2014) La pyrale du maïs résiste aux pyréthrinoides. *Perspect Agric* n°408 .