

**DÉTECTION BIOCHIMIQUE DE LA RÉSISTANCE A LA
DELTAMÉTHRINE CHEZ LE CARPOCAPSE DES POMMES**

J.C. BOUVIER*, A. CUANY**, C. MONIER*, S. CLIER*,
V. BROSSE*, J.B. BERGE** & B. SAUPHANOR*

* INRA Zoologie, Agroparc, 84914 Avignon Cedex

** INRA Laboratoire de Biologie des Invertébrés, 06606 Antibes Cedex

RESUME : La résistance à la deltaméthrine de quatorze populations naturelles de carpocapses des pommes (*Cydia pomonella* L.) est évaluée par tests biologiques et comparée à l'activité des cytochromes P450, mesurée au niveau de l'individu par l'activité Ethoxycoumarine-O-Dééthylase (ECOD). Les populations, issues des principaux bassins français de production de pommes, sont collectées au moyen de bandes pièges au stade larves diapauses à l'automne 1995. La mise au point méthodologique, réalisée sur deux souches de laboratoire, l'une sensible et l'autre résistante à la deltaméthrine, montre que l'activité ECOD est stable durant le développement de diapause et qu'elle reste plus élevée chez la souche résistante que chez la souche sensible. Chez les populations naturelles, analysées également au stade larves diapauses, l'activité ECOD est corrélée significativement au taux d'individus résistants à la deltaméthrine. Ces résultats confirment l'implication des mono-oxygénases à cytochrome P450 dans la résistance à la deltaméthrine chez les populations considérées. Cette caractérisation par voie biochimique constitue un complément utile de la détection par voie toxicologique. La forte variabilité individuelle observée laisse supposer l'intervention d'autres mécanismes de résistance, qui devront être élucidés afin de mettre en relation chacun d'entre eux avec les spectres de résistance des populations de carpocapse à combattre.

Mots-clés : *Cydia pomonella*, résistance, deltaméthrine, détection, cytochromes P450

SUMMARY : BIOCHEMICAL DETECTION OF DELTAMETHRIN RESISTANCE IN THE CODLING MOTH. The resistance to deltamethrin was evaluated in 14 field populations of the codling moth (*Cydia pomonella* L.) by the way of biological tests and compared to mixed function oxidase (mfo) activity, which was measured at the individual level through ethoxycoumarine deethylase (ECOD) activity. The samples were issued from the main French orchard areas. Diapausing larvae were collected by the way of corrugated paper band traps in autumn 1995. The tests were first performed on two laboratory strains, one susceptible and one resistant to deltamethrin. The ECOD activity appeared to be stable during the diapause development and was always higher in the susceptible strain than in the resistant one. The ECOD activity was significantly correlated to the rate of resistant insects in the field populations. The mfo system seems to be involved in the resistance to deltamethrin in these populations. This biochemical characterization of the populations complements the biological detection of the resistance. A high individual variability is observed in ECOD activity, in field populations as well as in the laboratory resistant strain, indicating that other resistance mechanisms are presumably involved.

Key words: *Cydia pomonella*, resistance, deltamethrin, mixed-function oxidase

INTRODUCTION

Il existe chez les insectes plusieurs mécanismes de résistance aux insecticides. Les moins connus affectent le comportement ou bien sont dus à une diminution de la pénétration cuticulaire voire à une augmentation de la vitesse d'excrétion du pesticide. Les résistances par modification des cibles de l'insecticide sont plus étudiées : l'acétylcholinestérase est la cible des organophosphorés et des carbamates, les canaux sodium voltage dépendant sont les cibles des pyréthrinoides et du DDT, les récepteurs GABA sont les cibles du lindane.

Les résistances métaboliques sont les plus répandues. Trois principaux systèmes enzymatiques, les monooxygénases à cytochromes P450, les estérases et les transférases biotransforment les molécules toxiques afin qu'elles puissent être plus facilement éliminées par l'organisme. Ces enzymes peuvent intervenir séparément ou de manière concomitante. Dans ce dernier cas, l'action de l'une d'entre elles sera presque toujours prépondérante par rapport à celles des autres.

Ces mécanismes sont pour l'instant méconnus chez les carpocapses résistants aux insecticides. A partir d'une étude préliminaire réalisée sur des carpocapses élevés au laboratoire, nous n'avons pas trouvé de différence d'activité estérasique entre les souches sensible et résistante à la deltaméthrine, contrairement à ce que nous avons observé pour l'activité monooxygénase. Nous avons alors envisagé la possibilité de détecter la résistance vis-à-vis de cette matière active chez des populations naturelles de carpocapse des pommes par la mesure de l'activité des cytochromes P450 pris comme marqueurs enzymatiques.

MATERIEL ET METHODES

LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches de laboratoire

Elles sont élevées sur du milieu nutritif artificiel selon la méthode décrite par GUENNELON *et al.* (1981).

La souche S, utilisée comme référence sensible, est élevée depuis plus de 20 ans au laboratoire sans pression de sélection.

La souche résistante VD est issue d'un prélèvement de larves réalisé en 1995, dans un verger vaclusien situé à Les Vignères, où la lutte chimique contre le carpocapse des pommes était en échec. Les larves néonates de chaque génération subissent une sélection massale. Elles sont installées sur du milieu traité par pulvérisation de deltaméthrine (Décis 25 CE). Jusqu'à la huitième génération, l'insecticide est appliqué à la CL50 (concentration qui tue 50% des individus) de chaque génération, puis à partir de la dixième génération à la concentration constante de 2ppm.

Les populations naturelles

La collecte et le conditionnement au laboratoire des échantillons (larves diapausantes) sont décrits précédemment par SAUPHANOR *et al.* (1997).

Nous avons testé 14 échantillons, représentant chacun une population issue de vergers situés dans les principaux bassins français de production de pommes : région Provence Alpes Côte d'Azur, Languedoc, Midi-Pyrénées, Rhône-Alpes, Aquitaine et Val de Loire.

Conditionnement des souches de laboratoire pour la diapause

Etant donné le stade de prélèvement des populations naturelles, la mise au point méthodologique sur les souches de laboratoire est réalisée sur larves diapausantes.

Nous appelons J0 le premier jour du cinquième stade larvaire. La diapause est induite en conditionnant les larves en photopériode courte (12 h de jour et 12 h de nuit) à 23°C, de l'éclosion jusqu'à la fin de leur croissance (J15). Le développement de la diapause est réalisé en photopériode courte à 2°C jusqu'à J105. La diapause est ensuite levée en photopériode longue (16 h de jour et 8 h de nuit) et à 23°C.

LES TESTS BIOLOGIQUES

Le taux d'individus résistants à la deltaméthrine est déterminé par contact tarsal des adultes issus de populations naturelles sur un support traité avec une concentration discriminante de l'insecticide.

ANALYSES BIOCHIMIQUES

L'activité monooxygénase est évaluée au niveau de l'individu par mesure de l'activité ECOD (Ethoxycoumarine-O-Dééthylase) des tubes digestifs en plaque de microtitration (DE SOUSA *et al.* 1995).

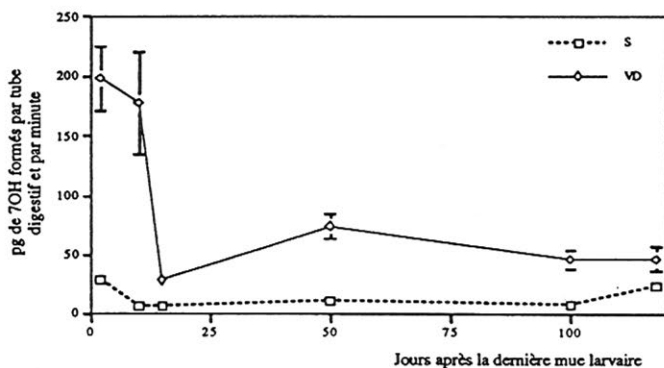
Pour chacune des deux souches de laboratoire, les analyses enzymatiques sont réalisées sur larves diapauses en croissance à J2, J10 et J15, sur larves diapauses en arrêt de développement à J50 et J100, et après levée de la diapause à J118.

L'activité ECOD des populations naturelles est mesurée après trois mois environ de séjour à 2°C 12/12, et les résultats soumis à une analyse de variance.

RESULTATS

ACTIVITE ECOD DE SOUCHES SELECTIONNEES

Fig. 1. Evclution comparée de l'activité ECOD d'une souche résistante (VD) et d'une souche sensible (S) de laboratoire, en fonction de l'âge (moyenne $\pm$ erreur standard)



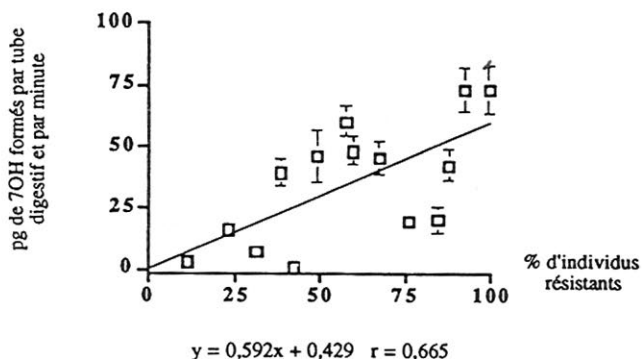
L'activité ECOD est plus forte lorsque les larves sont encore en croissance. Elle diminue ensuite et se stabilise pendant la période de développement de diapause au froid (fig. 1).

L'activité monooxygénase de la souche résistante VD présente une variabilité individuelle à tous les âges sauf en J15. Elle est toujours significativement supérieure de celle de la référence sensible S.

POPULATIONS NATURELLES

L'analyse de l'activité ECOD révèle des différences significatives entre les populations ($F=25,65$; $p=0,00$) mais également une forte variabilité intra population. Sur l'ensemble des échantillons testés, l'activité monooxygénase est corrélée positivement avec le taux d'individus résistants à la deltaméthrine, au seuil de 1% pour 12 degrés de liberté (fig. 2).

Fig. 2. Relation entre l'activité ECOD (moyenne $\pm$ erreur standard) et la résistance à la deltaméthrine chez 14 populations de carpocapses des pommes



DISCUSSION ET CONCLUSION

La stabilité de l'activité ECOD durant le développement de diapause permet de mesurer ce caractère sur des échantillons dont la date d'entrée en diapause n'est pas connue avec précision, ce qui simplifie le protocole de prélèvement des populations pour ce type d'analyse.

De fortes variabilités individuelles sont néanmoins observées pour ce caractère, aussi bien chez la souche résistante de laboratoire que chez certaines populations naturelles. Chez les échantillons collectés sur le terrain, cette hétérogénéité peut s'expliquer par le

fait que des prélèvements ont pu être réalisés à partir de populations en cours de sélection, renfermant une part non déterminée d'individus sensibles à faible activité ECOD. Cette variabilité peut également provenir de migrations interpopulations. La variabilité observée chez la souche résistante de laboratoire est par contre inattendue. Cette souche subit depuis treize générations une pression de sélection à dose létale pour les individus sensibles. D'un point de vue toxicologique, elle peut donc être considérée comme homogène pour le caractère « résistance à la deltaméthrine ». Une partie des individus qui la composent ne présente cependant qu'une faible activité ECOD. L'Ethoxycoumarine n'étant pas un substrat spécifique, l'étude de l'activité ECOD ne rend pas compte de toute l'activité monooxygénase. On peut donc envisager que certains cytochromes P450 mutés dégradant la deltaméthrine, n'aient qu'une faible activité ECOD.

Actuellement les tests toxicologiques sur adultes que nous avons conduits parallèlement constituent une méthode de détection de la résistance à la deltaméthrine plus fiable que la mesure de l'activité ECOD. Mais parcequ'elle confirme le rôle des cytochromes P450 dans la métabolisation accrue de la deltaméthrine chez les souches de carpocapses étudiées, l'activité ECOD peut être un élément de caractérisation des mécanismes de résistance au niveau d'une population.

Ces analyses biochimiques nous ont permis de caractériser un mécanisme de métabolisation des insecticides chez les populations résistantes de carpocapses en France. L'étude est à poursuivre, pas nécessairement dans l'optique de mettre au point une méthode de détection biochimique, qui ne serait *a priori* pas plus souple que les tests toxicologiques, mais afin de déterminer l'ensemble des mécanismes impliqués. Cette connaissance pourra constituer un outil pour caractériser les relations entre stratégie de protection et sélection de tel ou tel mécanisme de résistance, par l'analyse de populations en provenance d'autres pays ou zones de production. La détermination des spectres de résistance associés aux différents mécanismes observés permettra une meilleure gestion des gènes de résistance.

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur participation à la collecte des populations les Services Régionaux de la Protection des Végétaux. Nous remercions la Région PACA ainsi que le MRES (ACCSV3) pour leur contribution financière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DE SOUSA G., CUANY A., BRUN A., AMICHOT A., RAHMANI R., BERGE J.B., 1995. A microfluorometric method for measuring Ethoxycoumarin-O-Deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens : interest for screening resistance in insect populations. *Analytical Biochemistry* 229 : 86-91.
- GUENNELON G., AUDEMARD H., FREMOND J.C., IDRISSI AMMARI M.A., 1981. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* 1 : 59-64.
- SAUPHANOR B., MONIER C., CLIER S., BROSE V., BOUVIER J.C., MARTINET C., 1997. Extension en France de la résistance du carpocapse des pommes aux insecticides. 4^{ème} conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, 6-8 janvier 1997. *Annales ANPP*, 77-83.