

**AFPP – NEUVIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES RAVAGEURS EN AGRICULTURE
MONTPELLIER – 26 ET 27 OCTOBRE 2011**

**LES RÉSISTANCES DE CIBLE AUX CARBAMATES ET PYRÉTHRINOÏDES
CHEZ LE PUCERON VERT DU PÊCHER (*MYZUS PERSICAE*) SUR COLZA
ETAT DES LIEUX EN 2009 ET 2010**

S. FONTAINE ⁽¹⁾, L. CADDoux ⁽¹⁾, C. BRAZIER ⁽¹⁾, C. MOTTET ⁽¹⁾, C. BERTHO ⁽¹⁾,
P. BERTOLLA ⁽¹⁾, E. MORIGNAT ⁽²⁾, A. MICOUD ⁽¹⁾, L. ROY ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Anses Lyon - Unité Résistance aux produits phytosanitaires - 31 av. Tony Garnier - 69364 Lyon Cedex 07 - France. severine.fontaine@anses.fr

⁽²⁾ Anses Lyon - Unité épidémiologie - 31 av. Tony Garnier - 69364 Lyon Cedex 07 - France

RÉSUMÉ

L'étude présente les résultats de l'évaluation de la répartition et de la fréquence d'allèles résistants de gènes codant les protéines cibles de deux familles d'insecticides, les pyréthrinoides et les carbamates, dans des populations de *Myzus persicae* prélevées dans des cultures de colza du nord-est de la France. L'allèle Mace (résistance de cible aux carbamates) s'est révélé très présent dans toutes les régions concernées par les analyses (78% des pucerons). La résistance de cible aux pyréthrinoides liée à la mutation kdr L1014F est moins fréquente (< 25% des pucerons testés). Cependant, d'autres mutations affectant la cible des pyréthrinoides ont été détectées, dont la mutation super-kdr M918L, inédite chez *M. persicae* et qui s'avère liée à une forte résistance à cette famille d'insecticides.

Mots-clés : *Myzus persicae*, résistance, pyréthrinoides, carbamate, mutation.

SUMMARY

TARGET RESISTANCES AGAINST PYRETHROIDS AND CARBAMATES IN *MYZUS PERSICAE* POPULATIONS LIVING ON OILSEED RAPE IN FRANCE: SITUATION IN 2009 AND 2010

This study evaluates both the frequency and distribution of two insecticide families target resistance (pyrethroids and carbamates) in *M. persicae* populations sampled from oilseed rape cultures in North-Eastern France. Mace target resistance to carbamates proved to be widespread in all 7 administrative geographical areas analyzed (78% of the aphids). Target resistance to pyrethroids induced by kdr mutation was less frequent (< 25% of the aphids). Other mutations affecting the pyrethroids target were, however, detected. Among them, the M918L super-kdr mutation, which had never before been detected in *M. persicae*, seems to be linked to a strong resistance to pyrethroids.

Key words: *Myzus persicae*, resistance, pyrethroid, carbamate, mutation.

INTRODUCTION

Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), est une espèce polyphage, capable de coloniser un large spectre d'hôtes ligneux et de plantes herbacées. Les dégâts induits directement par sa prise de nourriture sont principalement représentés par le recroquevillement des feuilles et par des souillures, qui peuvent réduire la qualité des végétaux cultivés et entraîner des pertes économiques. Sa nuisibilité découle en grande partie de sa capacité à transmettre de nombreuses viroses. Sur colza, *M. persicae* peut être vecteur de trois viroses (TuYV : Turnip Yellow Virus ; CaMV : Cauliflower Mosaic Virus et TuMV : Turnip Mosaic Virus) susceptibles d'être préjudiciables pour la culture.

Chez ce puceron, les résistances aux insecticides sont multiples et relèvent de deux principaux types de mécanismes :

- une résistance métabolique, induite par une synthèse accrue de l'une des deux carboxylestérases E4 ou FE4 (Field *et al.* 1993). Ce mécanisme induit une résistance à un large spectre d'insecticides (carbamates, pyréthrinoïdes, organophosphorés). Il peut être détecté par des tests biochimiques qui quantifient l'activité enzymatique (Devonshire *et al.*, 1992).
- des résistances de cible, *i.e.* induites par la modification structurelle de protéines cibles, qui diminuent l'affinité de l'insecticide vis-à-vis de sa cible. Elles peuvent être responsables d'une très forte baisse d'efficacité des insecticides et concernent, chez *M. persicae*, des molécules qui agissent sur la transmission nerveuse : les pyréthrinoïdes et les carbamates. Pour les pyréthrinoïdes, deux mutations associées à des phénotypes de résistance parfaitement identifiés (L1014F et M918T) affectent le canal sodium dépendant du voltage, cible de cette famille. Les phénotypes associés sont nommés respectivement *kdr*, pour knock down resistance, et *skdr*, pour super-*kdr* (Martines-Torres *et al.*, 1999). La mutation *kdr* affecte le segment 6 du 2^{ème} domaine transmembranaire (IIS 6) du canal sodium. Elle se traduit dans la protéine par le remplacement d'une leucine par une phénylalanine (L1014F). L'allèle porteur de cette mutation est dominant chez *M. persicae* (Foster *et al.*, 2002). La mutation *skdr*, qui se traduit par la substitution d'une méthionine par une thréonine (M918T), est toujours trouvée en association avec la mutation *kdr* chez les insectes (Soderlund *et al.* 2003). Pour les carbamates, une mutation, responsable d'un haut niveau de résistance, a été identifiée sur l'acétylcholinestérase 2 (Nabeshima *et al.*, 2003), cible de cette famille. Cette mutation se traduit par la substitution d'une sérine par une phénylalanine au niveau de l'acide aminé 431 de l'acétylcholinestérase 2 (S431F), conséquence de la substitution de deux nucléotides : une cytosine et une alanine par deux thymines. Cette mutation, nommée *Mace* (Modified acétylcholinestérase), est responsable d'une perte de sensibilité au diméthylcarbamate chez les individus hétérozygotes comme homozygotes (Nabeshima *et al.*, 2003). La substitution S431F, située dans un secteur clé de la protéine, diminue l'affinité de l'acétylcholinestérase 2 avec les carbamates.

En France, la lutte contre *M. persicae* en culture de colza repose sur des traitements appliqués en pulvérisations foliaires à l'automne avec des insecticides de deux familles utilisées depuis plusieurs décennies, les carbamates et les pyréthrinoïdes, et, depuis 2009, d'une famille plus récente, les néonicotinoïdes. Sur cette culture, une fréquence élevée de résistances de cible aux pyréthrinoïdes a été mise en évidence sur la base d'un échantillon collecté sur colza à travers la France en 2001 (>90% d'individus porteur de l'allèle *kdr* ; Zamoum *et al.* 2005). En revanche, moins d'1% des individus étaient porteurs de modification de cible sur l'acétylcholinestérase dans la même étude. Le contrôle de *M. persicae* a ainsi pu rester efficace grâce à l'utilisation de spécialités contenant du pyrimicarbe (carbamate), et ce malgré la quasi-omniprésence de carboxylestérases surexprimées (Zamoum *et al.* 2005). Pourtant, depuis 2005 et plus particulièrement 2008, un changement semble avoir eu lieu, puisque l'échec de traitements sur le terrain avec des carbamates est rapporté dans la filière colza en France (source : CETIOM).

Dans le cadre d'un groupe de travail AFPP, les difficultés rencontrées par les producteurs de colza pour maîtriser *M. persicae* ont été soulignées. En lien avec le CETIOM, un travail a été initié à l'Anses en 2009, afin d'établir l'identité, la fréquence et la répartition des mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes et aux carbamates présents dans les

populations de *M. persicae* observées sur cette culture. Les résistances de cible étant connues pour générer les niveaux de résistance les plus élevés et la résistance métabolique étant apparemment très présente avant l'apparition des nouvelles difficultés, nous avons décidé d'explorer en premier lieu les mutations impliquées dans les modifications structurales des gènes codant le canal sodium et l'acétylcholinestérase. Nous nous proposons d'exposer les résultats obtenus aujourd'hui à partir d'insectes prélevés sur colza en 2009 et 2010.

MATERIEL ET METHODES

ÉCHANTILLONS PRELEVÉS AU CHAMP

Des populations de *M. persicae* ($n=38$) ont été collectées au cours de l'automne 2009 ($n=31$) et 2010 ($n=5$) dans des champs de colza situés dans le grand quart nord-est de la France, dans deux types de parcelles : des parcelles tout venant, cultivées dans un but de production (désignées par « parcelles de production ») et des parcelles cultivées dans un but d'expérimentation, comprenant différentes modalités (différents traitements insecticides, des témoins non traités) (nommées « essais »). Dans ce cas, plusieurs prélèvements de pucerons ont pu être réalisés sur le même site dans les différentes modalités expérimentales mises en œuvre (Tableau I).

Chaque échantillon était constitué d'une trentaine de feuilles infestées de pucerons. Pour chaque prélèvement 8 à 40 femelles parthénogénétiques ou larves L4 ont été sélectionnées, puis placées individuellement dans des tubes et stockées à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

Dans certains cas, des pucerons ont été maintenus en élevage (en boîtes, sur feuilles de colza ou de chou chinois, en milieu contrôlé : $20-25^{\circ}\text{C}$; J/N=16h/8h) jusqu'à ce que les analyses moléculaires aient été effectuées. Par la suite, des femelles de certains échantillons ont été isolées pour produire en masse des clones parthénogénétiques. Chacun des clones a été à nouveau caractérisé génétiquement avant d'effectuer des tests biologiques et enzymatiques afin de mettre en évidence les phénotypes de résistance associés aux génotypes isolés.

Tableau 1 : Prélèvements de pucerons.

Table 1 : Aphid samples.

Région	2009			2010			Total sites	Total échantillons
	Parcelles de production	Essais		Parcelles de production	Essais			
		N	<i>n</i>		N	<i>n</i>		
Alsace	1	0		0	0		1	1
Bourgogne	5	3	4	0	1	3	9	12
Centre	2	0		0	1	1	3	3
Champagne -Ardenne	0	4	10	3	0		7	13
Franche-Comté	4	1	1	0	0		5	5
Ile-de-France	4	0		0	0		4	4
Lorraine	1	0		0	0		1	1
Nord-Pas -de-Calais	2	1	2	0	1	2	4	6
Picardie	2	1	3	1	0		4	6
Total	21	10	20	4	3	6	38	51

N = nb de prélèvements par parcelle ; *n* = nb de modalités pour les essais

CLONES DE REFERENCES

Trois clones de pucerons, fournis par Emmanuele Mazzoni, ont été utilisés comme références pour les analyses biomoléculaires : 1X, sensible ; 4H1, résistant « kdr » ; 13HH, résistant « Mace ». Cinq clones ont été élevés en lignées parthénogénétiques pour servir de références dans les tests biologiques et/ou biochimiques : 2 clones, fournis par Diana Cox : 4106A, sensible ; 4916A, résistant métabolique surexprimant les carboxylestérases (R3) ; 1 clone, fourni par Véronique Brault : VBNL, prélevé en Hollande sur pomme de terre ; 2 clones issus de populations collectées sur colza : SSymA, en Rhône-Alpes ; 384c, en Franche-Comté.

ANALYSES BIOMOLECULAIRES

Les extractions d'ADN ont été réalisées à l'aide du kit Nucleospin (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant. La mutation kdr a été recherchée par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Cassanelli *et al.*, 2005). De plus, pour certains clones, un fragment PCR de 578-pb du gène codant le canal sodium a été séquencé pour rechercher d'éventuelles mutations supplémentaires avec les amorces kdr-F1 et kdr-R4 (Cassanelli *et al.*, 2005). Ce fragment comprend les segments 4 à 6 du II^{ème} domaine transmembranaire et recouvre les positions de toutes les mutations connues chez les insectes sur cette portion de gène, à l'exception de la mutation M827I (Davies *et al.*, 2007). Le séquençage a été réalisé directement sur les produits PCR par Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) avec un analyseur 3730 XL (Applied Biosystems). La mutation Mace a été détectée par PCR - allèle spécifique (AS-PCR) (Fontaine *et al.*, 2011).

ANALYSES ENZYMATIQUES

Des tests enzymatiques en microplaques (Devonshire *et al.*, 1992) ont été réalisés pour évaluer l'activité estérase des lignées clonales. Ces analyses permettent d'estimer le niveau d'expression des carboxylestérases totales par individu grâce à une mesure en point final de l'hydrolyse d'un substrat artificiel (l'acétate d'alpha-naphtyl). L'activité estérase est exprimée en fonction des protéines totales mesurées pour chaque individu au moyen du kit Pierce® BCA Protein Assay.

TESTS BIOLOGIQUES

Des disques de feuilles de colza ou de chou chinois sont placées sur de l'agar (15 g.l⁻¹; 10 ml / boîte) dans des boîtes en plastique de 4,5 cm de diamètre. Pour chaque boîte, dix à quinze pucerons femelles aptères sont déposés sur les feuilles la veille du traitement. Le stade ainsi que l'état des pucerons sont vérifiés juste avant la pulvérisation afin d'éliminer les pucerons morts et les stades L4 introduits par erreur. L'intérieur des boîtes, contenant les pucerons installés sur les feuilles, est pulvérisé à l'aide d'une tour de Burgerjon avec une gamme de dilutions d'insecticide de raison 4 (solvant = eau) - 8 doses comprises entre 0,117 et 1920 mg.l⁻¹ de lambda-cyhalothrine (KARATE® ZEON, lambda-cyhalothrine, 100 g.l⁻¹) - et de l'eau pour les témoins. Les applications ont été effectuées à raison de 4,0 mg +/- 0,2 mg par cm² sur les disques foliaires. Plusieurs tests indépendants ont été réalisés, à raison d'une à six répétitions par modalité. Les dénombrements de pucerons, morts et vivants, ont été réalisés 48 heures après traitement. Les DL₅₀ (Doses Létales pour 50 % de la population) ont été estimées avec le logiciel Priprobit Software.

TESTS STATISTIQUES

Le degré de significativité des différences dans les proportions d'allèles de résistance entre les pucerons issus de parcelles/modalités d'essai traitées ou non - avec carbamate, pyréthriinoïde ou association des deux substances actives - a été testé avec le test du χ^2 (5%).

RESULTATS

Pour la présentation du monitoring et la cartographie des mutations Mace et kdr, lorsque plusieurs prélèvements de pucerons ont été réalisés sur le même site – cas des essais – c'est la modalité TNT (témoin non traité insecticide) qui a été retenue. En revanche, pour

évaluer l'impact des substances actives appliquées sur la fréquence des allèles Mace et kdr, les résultats de toutes les modalités d'essais prélevées ont été conservés.

RECHERCHE DE RESISTANCES DE CIBLE AUX CARBAMATES ET AUX PYRETHRINOÏDES DANS LES POPULATIONS DE *M. PERSICAE* SUR COLZA

Monitoring 2009 et 2010 : 715 pucerons (2009 : 579 ; 2010 : 136) ont été analysés.

Sur la totalité de l'échantillonnage, 0,8 % des pucerons cumulent les deux allèles (kdr + Mace), 1,1 % des pucerons n'en possèdent aucun des deux, 98,1 % possèdent soit l'allèle kdr, soit l'allèle Mace. L'allèle kdr, a été détecté - à l'état hétérozygote dans tous les cas - chez 21 % de la totalité des pucerons testés. La proportion d'individus porteurs de cet allèle est plus importante en 2010 (44 % des individus) qu'en 2009 (16 %).

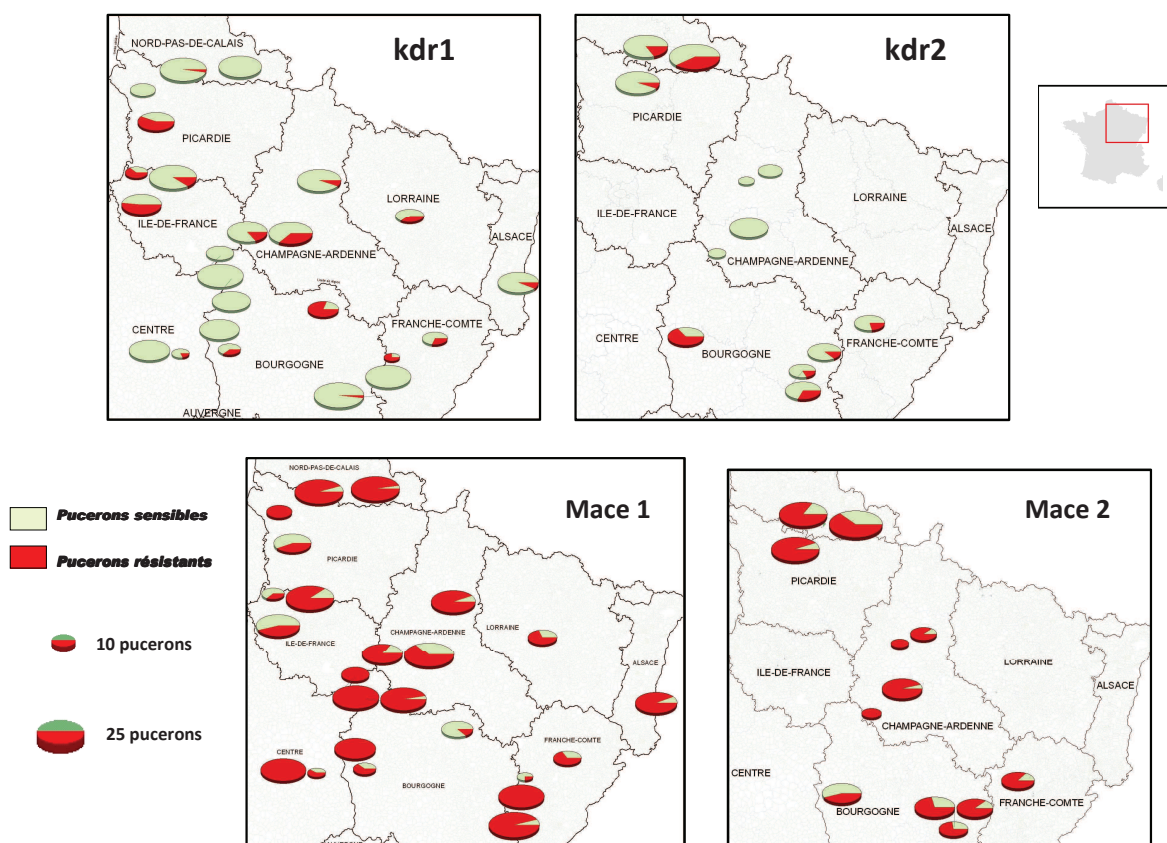
L'allèle Mace a été détecté chez 78 % des pucerons testés (présence/absence, la technique utilisée n'informe pas sur le statut de zygote). Contrairement à ce qui est observé avec l'allèle kdr, la proportion d'individus « Mace » est plus importante en 2009 (84 %) qu'en 2010 (56 %).

Dans l'échantillon 2010, une large part des prélèvements provenait de parcelles/modalités non traitées (2010, 60 % ; 2009, 35 %), ce qui peut expliquer les différences avec 2009.

Cartographie des allèles résistants : Les cartes présentent les résultats du monitoring pour la recherche des allèles résistants kdr et Mace, dans les isolats issus de 24 parcelles de production (kdr1, Mace1) et de 12 essais (kdr2, Mace2), répartis dans 9 régions : Nord-Pas-de-Calais, Picardie, Champagne-Ardenne, Ile-de-France, Bourgogne, Centre, Franche-Comté, Lorraine, Alsace (Figure I).

Figure I : Cartographie des proportions d'individus porteurs des allèles résistants kdr ou Mace dans les échantillons analysés (kdr1, Mace1, parcelles de production; kdr2, Mace 2, modalités non traitées des essais).

Figure I: Mapping of the ratio of kdr or Mace target resistant individuals in samples under test (kdr1, Mace1, producing fields ; kdr2, Mace 2, untreated plots in trials).



Allèle kdr : la mutation a été détectée dans 60 % des populations testées. Au sein de l'échantillon représentatif de la population d'une parcelle de production, les proportions d'individus la portant sont variables, comprises entre 2,56 % et 80 % et supérieures à 50 % dans 5 cas. La plus forte occurrence de cet allèle (80 %) a été observée dans un prélèvement réalisé en Bourgogne sur culture non traitée. C'est en Ile-de-France (3 cultures sur 4) et en Champagne-Ardenne (3 sur 3) que l'allèle résistant a été le plus souvent observé. Pour les modalités non traitées des essais, dans 8 cas, la mutation a été détectée (6 à 65 % des pucerons testés sont résistants) et dans 4 cas, elle ne l'a pas été (4 essais tous situés en région Champagne-Ardenne).

Allèle Mace : la mutation, présente dans toutes les parcelles/modalités échantillonnées, est détectée chez 13 à 100 % des individus testés. Pour 18 des 23 parcelles de production, elle est rencontrée chez au moins 50 % des individus testés. Toutes les régions sont concernées de la même façon. Pour 6 parcelles, tous les individus testés sont résistants aux carbamates (3, Bourgogne ; 1, Centre ; 1, Franche-Comté ; 1, Picardie). Pour les modalités d'essai non traitées, la situation est comparable à celle observée dans les parcelles de production : dans 11 cas sur 12, plus de la moitié des individus sont porteurs de l'allèle Mace.

RELATION ENTRE LES TRAITEMENTS APPLIQUES ET LA PREVALENCE DES ALLELES DE RESISTANCE

Les compositions moyennes des populations en termes d'allèles de résistance sont comparées en fonction des traitements appliqués sur les sites étudiés.

Individus « kdr » (Figure II) : le test du χ^2 appliqué à la comparaison traités/non traités met en évidence que la proportion d'individus porteurs :

- est significativement inférieure ($p < 0,0001$) sur parcelles/modalités d'essai traitées « carbamate » (appliqué seul ou en association)
- n'est pas modifiée de façon significative sur parcelles/modalités d'essai traitées « pyréthrinolide » (appliqué seul).

Ainsi, bien que le nombre de parcelles/modalités d'essai concernées et le nombre d'individus testés varient très largement selon les types de traitements appliqués, ces résultats montrent que :

- comme attendu, les carbamates sont en mesure de diminuer significativement la proportion d'individus « kdr » au sein des populations,
- contrairement à ce que l'on pouvait attendre, lorsque les parcelles/modalités ont été traitées par des pyréthrinolides seuls, la fréquence des individus « kdr » n'est pas significativement différente de celle qui est observée dans les parcelles/modalités non traitées.
- l'association (carbamate + pyréthrinolide) semble avoir le même impact sur la composition des populations que les carbamates seuls.

Figure II : Pourcentage d'individus porteurs de l'allèle de résistance kdr / Mace en fonction des substances actives appliquées.

Figure II : Percentage of individuals with kdr / Mace allele according to the applied active substances.

TNT : non traité ; Car. : carbamate ; Pyr. : pyréthrinolide ; Car + Pyr : association,

P : Nombre de parcelles, dont modalités des essais (E) ; Puc. : Nombre de pucerons ;

✱ : déviation significative à l'hypothèse d'uniformité de la distribution des allèles de résistance entre parcelles traitées et non traitées (test du χ^2).

Individus « Mace » (Figure II) : le test du χ^2 appliqué à la comparaison traités/non traités met en évidence que la proportion d'individus porteurs :

- est significativement supérieure ($p < 0,0001$) sur parcelles/modalités d'essai traitées « carbamate » (appliqué seul ou en association). Le traitement semble donc exercer une pression de sélection responsable d'un accroissement de la proportion d'individus résistants.

- n'est pas modifiée de façon significative sur parcelles/modalités d'essai traitées « pyréthriinoïde » (appliqué seul). Ce traitement ne semble donc pas être associé à une diminution de la fréquence des individus « Mace » (presque tous exempts de l'allèle kdr).

RESULTATS DE SEQUENÇAGE DU GENE *para*

Un séquençage du gène *para* codant le canal sodium dépendant du voltage a été réalisé chez 47 individus impliqués dans le monitoring de 2009 et provenant de 7 régions différentes. Le fragment séquencé correspond à une portion de la protéine s'étendant du 907^{ième} au 1041^{ième} acide aminé. Trente et un pucerons étaient « Mace », mais non « kdr ». Les 16 autres étaient « kdr » (hétérozygotes), mais non « Mace ». L'analyse des 47 séquences a révélé, outre la mutation kdr classique en position 1014 (L1014F), deux mutations non silencieuses dans les codons correspondant aux acides aminés 918 et 932 du canal sodium.

Concernant la mutation affectant l'acide aminé 918, la substitution d'une méthionine par une leucine (M918L) a été observée chez 31 pucerons. Tous ces pucerons étaient hétérozygotes pour cet allèle et présentaient également la mutation Mace sur le gène *ace2*. L'acide aminé 918 est connu pour être l'acide aminé impliqué dans le phénotype super-kdr (mutation M918T, toujours trouvée en association avec la mutation kdr L1014F). Une lignée clonale (384c) obtenue à partir d'un individu présentant la mutation M918L a été établie afin de caractériser, par la suite, le phénotype de résistance vis-à-vis des pyréthriinoïdes associé à cette mutation.

Concernant la mutation affectant l'acide aminé 932, la substitution d'une leucine par une phénylalanine a été mise en évidence (L932F) chez les 16 pucerons possédant la mutation kdr. Comme pour la mutation M918L, cette mutation a été détectée uniquement à l'état hétérozygote.

ÉTUDE DU PHENOTYPE ASSOCIE A LA MUTATION M918L

La découverte de la mutation M918L a nécessité de vérifier son impact sur la sensibilité aux pyréthriinoïdes. Des tests biologiques ont été réalisés pour comparer le pourcentage de mortalité obtenu avec des clones dénués de mutation en position 918 sur le canal sodium dépendant du voltage (4106A et VBNL) à celui de clones porteurs de la mutation M918L et dénués de L1014F (384c et SSym). Le nombre de tests retenus par clone (mortalité < 30 %, pour les non traités) et le nombre d'individus testés par concentration (dépendant du nombre d'individus disponibles dans les élevages) sont variables d'un test à l'autre (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats des tests biologiques (lambda-cyhalothrine ; tour de Burgerjon ; V % = % Abbott de femelles adultes aptères vivantes ; n = nombre de tests ; r = nombre de répétitions par test indépendant ; na = non appliqué).

Table 2: Results of the bioassays (lambda-cyhalothrin ; Burgerjon tower ; V % = alive apterous adult females % (corrected following Abbott's method) ; n = number of tests ; r = number of replicates per independent test ; na = not applied).

mg.l ⁻¹		0	0,117	0,468	1,875	7,5	30	120	480	1920
4106A	V %	97	na	22	4	9	0	0	na	0
	n	3		1	1	2	1	2		1
	r	1 à 2		2	2	1 à 2	2	1 à 2		1
VBNL	V %	80	88	17	0	0	na	na	na	na
	n	1	1	1	1	1				
	r	4	4	4	4	4				
384c	V %	74	95	100	87	95	79	68	43	6
	n	6	1	3	3	5	5	5	1	3
	r	1 à 4	1	1 à 4	1 à 4	1 à 4	1 à 4	1 à 4	3	2 à 3
SSym	V %	93	na	na	na	92	na	84	na	24
	n	2				2		2		2
	r	1 à 2				1 à 2		1 à 2		1 à 2

Un écart important est enregistré entre les DL₅₀ estimées par Probit des 2 types de clones, se traduisant par un FR (Facteur de Résistance, ratio DL₅₀ des résistants / DL₅₀ des sensibles) >1000 :

- DL₅₀ des sensibles : 4106A, $3,07 \times 10^{-2}$ mg.l⁻¹ [$3,29 \times 10^{-6}$ - $2,47 \times 10^{-1}$] ; VBNL, $2,49 \times 10^{-1}$ mg.l⁻¹ [$1,29 \times 10^{-1}$ - $3,48 \times 10^{-1}$]
- DL₅₀ des résistants : 384c, 237,61 mg.l⁻¹ [166,53 ; 336,46] ; SSym, 662,00 mg.l⁻¹ [329,00 - 1238,00].

Afin d'éliminer l'hypothèse d'une résistance métabolique chez les clones « M918L », une comparaison de l'expression d'enzymes détoxifiantes est venue compléter l'analyse. Les résistances métaboliques observées chez *M. persicae* vis-à-vis des pyréthrinoïdes et des carbamates reposant sur la surexpression d'une ou deux carboxylestérases bien identifiées (E4 et/ou FE4, Field *et al.*, 1993, 1994), la mesure de l'expression des carboxylestérases totales est considérée adaptée à leur mise en évidence (Devonshire *et al.* 1992). Trois tests enzymatiques (2 répétitions) ont été réalisés pour comparer le niveau d'expression des carboxylestérases totales chez le clone 384c, porteur de la mutation M918L et montrant une résistance marquée à la lambda-cyhalothrine à celui de deux clones dénués de mutation en position 918 : le clone 4106A, référence sensible, dénué de surexpression de carboxylestérases ; le clone 4916A, référence résistante métabolique, surexprimant fortement (R3) une carboxylestérase. L'activité enzymatique du clone 384c reste bien inférieure à celle de la référence résistante métabolique avec $2,34 \pm 0,88$ pour le ratio 384c/4106A contre $9,52 \pm 0,62$ pour le ratio 4916A/4106A.

DISCUSSION / CONCLUSION

L'étude réalisée montre une augmentation drastique de la résistance de cible aux carbamates dans les populations de *M. persicae* sur colza. En 2001, la fréquence de l'acétylcholinestérase mutée n'était que de 1 % dans un échantillon de 618 pucerons collectés sur colza en France (dont 318 provenant de 5 régions du quart nord-est) (Zamoum *et al.*, 2005). En 2009 et 2010, elle est *quasi* omniprésente (près de 80 % des pucerons sont porteurs de la mutation Mace, au sein de populations échantillonnées dans des régions chevauchant largement les régions concernées en 2001).

Une nette diminution du nombre d'individus possédant la mutation kdr L1014F est mise en évidence (91% en 2001, Zamoum *et al.*, 2005, <25% en 2009-2010, présente étude). En revanche, deux autres mutations du canal sodium dépendant du voltage, inédites chez *M. persicae*, ont été mises en évidence : une mutation de type super-kdr (résidu 918) M918L, jusqu'à présent observée uniquement chez *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Yang *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2007), et une mutation L932F uniquement décrite chez le pou de la tête *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778 (Gao *et al.*, 2003).

En ce qui concerne la mutation M918L, les tests biologiques réalisés montrent que sa présence est associée à une perte très marquée de sensibilité vis-à-vis des pyréthrinoïdes, non accompagnée de surexpression massive de carboxylestérase. Etant donné que nous avons recherché toutes les mutations sur un fragment du gène *para* (codant le canal sodium dépendant du voltage) et recouvrant la presque totalité des positions aujourd'hui connues pour porter des mutations impliquées dans les résistances aux pyréthrinoïdes chez les insectes et n'avons pas détecté de surexpression marquée de carboxylestérase chez le clone 384c, le facteur de résistance très élevé semble bien associé à la présence de cette seule mutation. La substitution en position 918 d'une méthionine, acide aminé hydrophobe, par une leucine, acide aminé aliphatique hydrophobe diffère de la mutation skdr classiquement décrite (thréonine, acide aminé polaire), qui se trouve, quant à elle, toujours combinée avec la mutation kdr. Le fait que la mutation M918L soit rencontrée de manière récurrente en l'absence de kdr pourrait s'expliquer par la nature non polaire de la leucine. Une autre mutation de type skdr, décrite également en l'absence de kdr, chez *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), conforte cette hypothèse. Chez *B. tabaci*, la méthionine est substituée également par un acide aminé non polaire : la valine (M918V). Des études d'expression du canal sodium dans des oocytes de xénope ont montré que M918T non seulement diminuait la sensibilité aux pyréthrinoïdes, mais aussi qu'elle perturbait le fonctionnement du canal

sodium (Lee *et al.*, 1999). Les auteurs de cette étude concluent que la fonctionnalité de la protéine est probablement restaurée par la présence concomitante de la mutation L1014F. Dans la présente étude, la fréquence de la mutation conservant la nature hydrophobe du résidu 918 (M918L) apparaît importante dans le sous-échantillon de 47 individus analysés (Fontaine *et al.*, 2011), suggérant un faible coût biologique. Ces observations soulignent la position clé du résidu 918 dans la résistance aux pyréthrinoïdes.

Quant à la mutation L932F, faute d'avoir réussi à maintenir vivants des clones présentant ce génotype, son impact sur le niveau de résistance des pucerons (tous déjà porteurs de *kdr*) vis-à-vis des pyréthrinoïdes n'a pas pu être déterminé.

Deux autres particularités ressortent de nos analyses. Sur un sous-échantillon, on observe un fort déséquilibre de liaison, d'une part, entre la mutation Mace S431F sur *ace2* et la mutation *skdr* M918L sur *para*, et, d'autre part, entre la mutation *kdr* L1014F et la mutation « du pou » L932F sur *para*. Sachant que M918L est associée à un facteur de résistance élevé à la lambda-cyhalothrine et étant donnée la très forte prévalence de S431F, l'association apparente entre S431F et M918L laisse craindre que la situation observée dans les populations se développant sur colza en France quant aux résistances de cible aux carbamates soit similaire pour les pyréthrinoïdes.

Plusieurs particularités biologiques de *M. persicae* expliquent sans doute un bouleversement si rapide (moins d'une décennie) des proportions des allèles de résistance Mace et *kdr*. La grande polyphagie de cette espèce, ainsi que la diversité des modes de reproduction (reproduction asexuée par parthénogenèse alternant avec de rares cycles sexués, non obligatoires), associée à l'effet de la sélection climatique et phytosanitaire laissent attendre des modalités de dispersion des gènes de résistance aux insecticides plutôt complexes. Ainsi, la capacité de reproduction asexuée (parthénogenèse thélytoque), majoritaire dans les populations se développant sur colza à l'automne, permet l'amplification très rapide de populations équipées des mutations les plus avantageuses. C'est d'ailleurs ce mode de reproduction qui est à l'origine, sans doute, des associations si marquées entre mutations non silencieuses. En outre, si des migrations avaient lieu entre cultures différentes, les changements observés pourraient provenir de populations de pucerons équipées d'un cortège de résistances différent de celui déjà en place qui seraient arrivées sur le colza en provenance d'autres cultures.

Plusieurs perspectives émergent à la suite de cette étude. Actuellement l'étude est poursuivie au sein des populations collectées en 2009 et 2010, afin de déterminer la prévalence de la mutation M918L (et de confirmer ou infirmer notre hypothèse d'une prévalence similaire à celle de S431F), via le développement d'un outil de détection de cette mutation en routine. En outre, la collecte d'individus vivants porteurs de la mutation L932F permettrait la mise en place de tests biologiques autour de cette mutation nouvellement isolée chez un puceron, tests qui pourraient être d'un intérêt scientifique primordial. Enfin, du fait de la complexité intrinsèque des facteurs présidant à la dispersion des gènes de résistance chez *M. persicae*, il est relativement difficile de prédire l'émergence des résistances sur le terrain chez de tels organismes sans passer par des analyses impliquant des marqueurs autres que sélectionnés. Notamment, des études de génétique des populations basées sur l'analyse de marqueurs neutres d'évolution rapide pourraient générer des données indispensables à la compréhension de la dispersion des gènes de résistance ainsi qu'au développement des stratégies de gestion des résistances (étude initiée : Roy *et al.*, 2011).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Y. Ballanger (CETIOM), ainsi que toutes les personnes ayant réalisé les prélèvements de pucerons (L.M. Allard, S. Aubert Campenet, B. Auclert, D. O. Bedu, M. Billiotel, D. Brauge, E. Bonnin, L. Burgy P. Chopard, J. Collet, E. Courbet, A. Charton, J.B. Davaine, S. Derangère, J. Dupé, T. Durand, L. Gauer, J.P. Goux, B. Huguet, S. Lejeune, P. Lepoutre, O. Mangenot, G. Metay, Y. Morio, L. Ruck, B. Oste, G. Vigneau, L. Warangot). Nous remercions également E. Mazzoni (Piacenza, Italy), D. Cox (Harpenden, UK) et Véronique Brault (Colmar, France) de nous avoir fourni des clones de *M. persicae* de leurs élevages.

BIBLIOGRAPHIE

- Cassanelli S., Cerchiari B., Giannini S., Bizzaro D., Mazzoni E., Manicardi G.-C., 2005 - Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and kdr insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag Sci*, 6, 1, 91-96.
- Devonshire A.-L., Devine G.-J., Moores G.-D., 1992 - Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bull entomol res*, 82, 459-463.
- Field L.-M., Williamson M.-S., Moores G.D., Devonshire A.-L., 1993 - Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Bioche. J*, 294, 569-574
- Field, L.-M., Javed, N., Stripley, M.F., Devonshire, A.-L., 1994. The peach-potato aphid *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* have the same esterased-based mechanisms of insecticide resistance. *Insect Mol Biol*, 3, 143-148.
- Fontaine S., Caddoux L., Brazier C., Bertho C., Bertolla P., Micoud A., Roy L., 2011 Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops, *Pest Manag Sci*, 67, 8, 881-885 DOI: 10.1002/ps.2224
- Davies T.-G.-E., Field L.-M., Usherwood P.-N.-R., Williamson M.-S., 2007 - A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect mol Biol*, 16, 3, 243-252.
- Foster S-P, Harrington R, Dewar A-M, Denholm I. and Devonshire A-L, 2002 - Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag Sci*, 58, 895-907.
- Gao J.-R., Yoon K.-S., Lee S.-H., Takano-Lee L.-M., Edman J.-D., Meinking T.-L., Taplin D., Clark J.-M., 2003 - Increased frequency of the T929I and L932F mutations associated with knockdown resistance in permethrin-resistant populations of the human head louse, *Pediculus capitis*, from California, Florida, and Texas. *Pestic biochem physiol*, 77, 115-124
- Lee S.-H., Smith T.-J., Knipple D.-C., Soderlund D.-M., 1999 - Mutations in the house fly Vssc1 sodium channel gene associated with super-kdr resistance abolish the pyrethroid sensitivity of Vssc1/tipE sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochem Mol Biol*, 29, 2, 185-94.
- Martinez-Torres D., Foster S.-P., Field L.-M., Devonshire A.-L., Williamson M.-S., 1999 - A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid. *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol Biol*, 8, 3, 339-346.
- Nabeshima T., Kozaki T., Tomita T., Kono Y., 2003 - An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 15-22.
- Roy L., Fontaine S., Caddoux L., Micoud A., Simon J.-C., 2011 Structure des populations de *Myzus persicae* et dispersion de gènes de résistance. 9^e Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Montpellier, France.
- Soderlund D.M., Knipple D.C., 2003 - The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563-77
- Yang X., Williamson M.-S., 2001 - A new super-kdr mutation is associated with resistance to pyrethroid insecticides in cotton aphid, *Aphis gossypii*. GenBank accession no. AF412815, NIH genetic sequence database at NCBI.
- Zamoum T., Simon J.-C., Crochard D., Ballanger Y., Lapchin L., Vanlerberghe-Masutti F., Guillemaud T., 2005 - Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*? *Heredity*, 94, 6, 630-639.