

Résistance du puceron vert de pêcher (*Myzus persicae*) vis-à-vis des pyréthriinoïdes et des néonicotinoïdes

RESUME

Cette étude visait à rechercher des allèles de résistance à deux familles d'insecticides, les néonicotinoïdes et les pyréthriinoïdes, utilisées pour lutter contre le puceron *Myzus persicae*, sur des populations de ce puceron provenant de cultures de pêcher de la Drôme.

Les mécanismes de résistance recherchés sont une mutation entraînant le changement du codon 81 qui affecte le récepteur nicotinique (cible des néonicotinoïdes), et les mutations affectant le codon 918 du canal sodium (impliquées dans la résistance aux pyréthriinoïdes). L'objectif principal était de rechercher les deux mutations et, ainsi, d'avoir une esquisse de la fréquence des allèles de résistance aux deux familles chimiques ciblées dans les populations étudiées.

Pour **les néonicotinoïdes**, les populations de deux des trois vergers analysés présentent une très grande majorité d'individus porteurs de l'allèle de résistance. Environ 2/3 à 3/4 de ces individus se sont révélés être à l'état hétérozygote et environ 1/4 à l'état homozygote (le niveau de résistance de ces derniers s'étant avéré beaucoup plus élevé). Du fait de l'existence de recombinaisons génétiques avérées dans les populations vivant sur pêcher, cette situation pourrait conduire rapidement à l'augmentation du taux de ces individus homozygotes et donc engendrer des difficultés importantes pour la gestion future de la lutte avec cette famille de substances actives.

Pour **les pyréthriinoïdes**, aucun des pucerons analysés ne présente un génotype sensible et tous possèdent au moins un allèle de résistance. Aussi, même si la faiblesse du nombre de pucerons analysés par verger ne permet pas de définir précisément les profils de résistance des populations correspondantes, ce constat reste inquiétant.

En conclusion, et bien que le nombre d'individus testés par verger ait été souvent faible, les données obtenues en 2012 doivent inciter, dans les vergers analysés, à une grande prudence dans la gestion de la lutte contre *Myzus persicae* avec les substances actives de ces deux familles d'insecticides.

Mots-clés : Puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, résistance, pyréthriinoïdes, néonicotinoïdes

I. Rappel du contexte

L'étude des résistances développées par le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*) vis-à-vis de différentes substances actives utilisées dans la lutte phytosanitaire est un travail initié depuis 3 ans au sein de l'unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP).

Chez ce puceron très polyphage, deux grands types de mécanismes de résistances aux insecticides ont été bien identifiés et étudiés dans la littérature :

- Des résistances de type métabolique qui sont induites par la duplication d'un gène et qui engendrent une synthèse accrue de la protéine correspondante. La protéine surexprimée est une enzyme capable de dégrader une ou des substance(s) active(s). Chez *M. persicae*, deux types d'enzymes sont connus pour être impliqués dans des résistances métaboliques :
 - les carboxylestérases E4 ou FE4 qui confèrent une résistance modérée vis-à-vis d'un large spectre d'insecticides (carbamates, pyréthrinoïdes, organophosphorés) (Field *et al.*, 1993).
 - un cytochrome à P450 (Puinean *et al.*, 2010) qui est impliqué uniquement dans une résistance modérée aux néonicotinoïdes.
- Des résistances dites de cible ont également été détectées chez cet insecte. Elles sont dues à une modification de la protéine ciblée par l'insecticide et elles sont responsables d'une très forte baisse d'efficacité des insecticides concernés. Les pyréthrinoïdes et plus récemment les néonicotinoïdes comptent parmi les familles concernées par ce type de résistance :
 - pour les pyréthrinoïdes, deux mutations, parfaitement décrites chez *M. persicae*, affectent la cible de l'insecticide : le canal sodium. Ces mutations diminuent l'affinité de l'insecticide vis-à-vis de sa cible. Ces résistances sont nommées kdr (pour knock down resistance) et super kdr (s-kdr) (Martines-Torres *et al.*, 1999).
 - pour les néonicotinoïdes, une mutation, responsable d'un haut niveau de résistance, a été récemment décrite (Bass *et al.*, 2011).

L'objectif principal de l'étude menée en 2012 était la recherche, dans quelques populations vivant sur pêcher, de la fréquence des allèles responsables des résistances de cible vis-à-vis des deux familles chimiques ciblées (pyréthrinoïdes et néonicotinoïdes).

II. Description brève de la méthode utilisée

La résistance de cible aux néonicotinoïdes est liée à la mutation R81T (Bass *et al.*, 2011) qui affecte le gène codant pour le récepteur nicotinique ; elle se traduit par la substitution d'une arginine (Arg) par une thréonine (Thr) au niveau de l'acide aminé 81 de la sous unité $\beta 1$ du récepteur.

L'unité RPP a mis au point en 2012 une méthode de PCR dCAPS pour rechercher cette mutation et tous les individus prélevés au verger ont été soumis à cette analyse.

Pour la résistance aux pyréthrinoïdes, la mutation kdr affecte l'acide aminé 1014 et entraîne la substitution d'une leucine (Leu) par une phénylalanine (Phe). Les mutations s-kdr affectent l'acide aminé 918 et peuvent entraîner plusieurs substitutions décrites dans le tableau I. Ainsi la méthionine (Met) peut être remplacée par une thréonine (Thr) dans le cas de la mutation s-kdr classique (M918T) qui est toujours trouvée en association avec la mutation kdr. La méthionine peut être également substituée par une leucine (M918L), qui est trouvée en l'absence de la mutation kdr (Fontaine *et al.*, 2011). Ces mutations sont responsables d'une forte résistance aux pyréthrinoïdes en empêchant les pyréthrinoïdes de s'apparier correctement aux canaux sodium.

Pour les populations de pucerons analysées provenant de pêcher, la qPCR utilisée habituellement sur *M. persicae* du colza pour rechercher les différentes mutations impliquées, s'est révélée ne pas être une méthode adaptée. En effet, chez les pucerons provenant du pêcher, les études réalisées précédemment au laboratoire, mais non publiées, ont montré qu'il existait un grand polymorphisme concernant le codon 918.

Pour ces individus provenant du pêcher, un séquençage d'une portion du gène du canal sodium, codant pour les segments 4 à 5 du deuxième domaine intra-membranaire de la protéine, a été réalisé afin de déterminer quel était leur génotype. La portion de gène séquencé est le fragment connu pour contenir les principaux codons impliqués dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez *M. persicae*.

Tableau I : mutation détectée sur le codon 918 du gène canal sodium voltage dépendant, correspondance de l'acide aminé substituant la méthionine et phénotype associé

Codon (sur le brin sens)	Codification du codon	Phénotype
ATG	M918	sensible
ACG	M918T	Résistant(s-kdr classique) en association avec la mutation kdr*
TTG	M918L**	Résistant(s-kdr atypique)
CTG	M918L ^{bis} **	Résistant(s-kdr atypique)

En rouge, la base mutée par rapport au codon sauvage

* : L'acide aminé thréonine en position 918 (mutation s-kdr classique) est toujours trouvé en association avec l'acide aminé phénylalanine en position 1014 (mutation kdr L1014F)

** : 2 codons 918 mutés ont été trouvés chez *M. persicae* comme codant pour une Leucine

III. Echantillonnage

a. Modalités de prélèvements et d'analyses

Sur des parcelles où des inefficacités de traitement (en particulier vis à vis des néonicotinoïdes) ont été observées et, après vérification de l'espèce de puceron en présence (*Myzus persicae*), 25 à 30 pousses sont prélevées sur l'ensemble de la parcelle à raison d'une pousse infestée par arbre. Chaque pousse est individualisée et identifiée. Dans le cas d'une faible infestation, une pousse par charpentière peut être prélevée (mais, dans ce cas, les individus analysés ont une probabilité supérieure d'être issus de la même femelle fondatrice).

Au laboratoire, pour chaque pousse, 2 femelles (si ce stade est présent) sont prélevées. Une femelle est placée dans un micro-tube et stockée à -20°C en attendant la réalisation des tests biomoléculaires dont les résultats sont présentés dans le paragraphe ci-dessous.

Une seconde femelle est mise en élevage sur chou chinois (en pilulier, avec disque de feuille sur gélose) afin d'obtenir une descendance et de constituer un clone qui servira ensuite à la réalisation de tests biologiques. Des mortalités importantes sont généralement observées lors du transfert des pucerons depuis le pêcher sur le chou chinois. Lorsque l'obtention d'un clone est réussi, ce dernier est maintenu sur de jeunes plants de chou chinois jusqu'à la réalisation des tests biologiques qui permettent de définir son profil phénotypique de résistance. Ces clones font également l'objet de tests biomoléculaires afin de caractériser leur génotype (présence ou non de la mutation responsable de la résistance de cible) et les pucerons ainsi analysés participent aux résultats présentés plus loin. Le nombre de pucerons analysés par parcelle peut ainsi être supérieur au nombre de pousses prélevées au départ.

b. Echantillons analysés

Prévus chez trois producteurs de la Drôme (région Rhône-Alpes), les prélèvements effectués début juillet (02/07) se sont avérés trop tardifs par rapport aux attaques de pucerons et n'ont permis la collecte d'échantillons que dans une seule des parcelles initialement ciblées (n°12-067 à Lorient). Deux parcelles supplémentaires, à La Roche de Glun, ont été prospectées et ont pu faire l'objet de quelques prélèvements (n° 12-068 et 12-069), mais seule la parcelle de Lorient a permis un prélèvement de la taille optimale souhaitée (Tableau II).

Tableau II : Descriptif des échantillons prélevés

Référence Anses de l'échantillon	Commune	Producteur	Nom de la parcelle (Variété)	Prélèvement		Commentaires
				Nb arbres	Nb rameaux	
-	Bougé Chambalud	1	-	0	0	Absence de pucerons
12-067	Loriol	2	Les Grands Sablons (Snowball et Fine Top)	26	26	
-	La Roche de Glun	3	- (Gypse)	0	0	Autre espèce de pucerons
12-068	La Roche de Glun		- (Nectapomme)	6	8	Petite parcelle. Un prélèvement sur 3 charpentières du même arbre
12-069	La Roche de Glun		- (Western Red)	6	6	Présence de foyers uniquement sur de jeunes arbres disséminés sur un bloc de parcelles

N. B. : tableau détaillé des parcelles en annexe 2

IV. Résultats

Quelles que soient les mutations recherchées, les méthodes utilisées en tests biomoléculaires permettent de distinguer, pour chaque individu analysé, son génotype (homozygote ou hétérozygote). Aussi, pour chaque mutation, une codification particulière a été adoptée.

- Pour le gène concerné par la résistance de cible aux **néonicotinoïdes** (codon 81), les génotypes trouvés sont codifiés comme suit (tableau III) :

Tableau III : codification des génotypes trouvés pour le codon 81 du gène du récepteur nicotinique :

Génotype	Codification
Homozygote Arginine (sauvage sensible)	Arg/Arg
Hétérozygote Arginine et Thréonine	Arg/Thr
Homozygote Thréonine	Thr/Thr

- Il en est de même pour la codification concernant les différents génotypes pour la résistance aux pyréthrinoïdes (codon 918). Le tableau IV ci-dessous reprend la codification des différents génotypes rencontrés pour ce codon.

Tableau IV : codification des génotypes trouvés pour le codon 918 du gène du canal sodium

Génotype	Codification
Homozygote Méthionine (sauvage sensible)	Met/Met
Hétérozygote Méthionine et Thréonine	Met/Thr
Hétérozygote Méthionine et Leucine	Met/Leu
Hétérozygote Méthionine et Leucine ^{bis}	Met/Leu ^{bis}
Hétérozygote Leucine ^{bis} et Thréonine	Leu ^{bis} /Thr
Homozygote Leucine ^{bis}	Leu ^{bis} /Leu ^{bis}
Homozygote Thréonine	Thr/Thr

a. Résistances aux néonicotinoïdes

Vis-à-vis de cette famille de substances actives, le nombre de pucerons analysés par parcelle est compris entre 14 et 65, en fonction de la richesse des prélèvements effectués dans chacun des trois vergers.

Tableau V : Proportion de génotypes mis en évidence pour la résistance de cible aux néonicotinoïdes (codon 81)

Référence Anses de l'échantillon	Commune	Nb de pucerons analysés	codon 81 % de pucerons présentant les différents génotypes		
			Arg/Arg	Arg/Thr	Thr/Thr
12-067	Loriol	65	6,2	67,7	26,2
12-068	La Roche de Glun	17	0	76,5	23,5
12-069	La Roche de Glun	14	64,3	35,7	0

L'allèle de résistance aux néonicotinoïdes est détecté systématiquement dans les trois parcelles de pêcher analysées mais la proportion d'individus encore sensibles est très variable selon les parcelles (de 0 à 64% de génotype sensible Arg/Arg). La situation est, en fait, très contrastée selon les vergers. Deux d'entre eux sont très concernés par la présence de l'allèle de résistance, l'un à Loriol (n°12-067), l'autre à La Roche de Glun (n°12-068). Les populations de pucerons testés dans ces deux vergers apparaissent composées respectivement de 26% et 23,5% d'individus homozygotes résistants, le reste des individus de ces deux populations étant en totalité (ou presque) hétérozygotes (Arg/Thr). Ainsi, le verger de La Roche de Glun ne possède aucun individu sensible (sur les 17 analysés) tandis que celui de Loriol présente encore quelques individus sensibles (6%) et une majorité d'individus hétérozygotes (\approx 68%) sur les 65 pucerons analysés. Enfin, pour le second verger de La Roche de Glun (n° 12-069), la majorité des individus testés apparaît sensible (64% sur les 14 pucerons analysés), le reste des individus de cet échantillon étant hétérozygote.

Des tests biologiques ont été menés en parallèle à cette recherche de l'allèle de résistance. La description succincte de la méthode utilisée et quelques résultats sont présentés en Annexe 1. Les données obtenues sur l'ensemble des tests montrent un lien entre le génotype et le phénotype :

- les clones Arg/Arg (génotype sauvage sensible) présentent des facteurs de résistance (entre le clone étudié et la référence sensible de laboratoire 4106A) compris entre 1,6 et 4,9 selon les clones,
- les clones Arg/Thr (hétérozygotes pour l'allèle de résistance) présentent des facteurs de résistance compris entre 5,7 et 17,7,
- les clones Thr/Thr (homozygotes pour l'allèle de résistance) se révèlent beaucoup plus résistants (facteurs de résistance compris entre 210 et 249).

Les résultats de ces tests biologiques (du fait de l'important écart des facteurs de résistance observés entre clones homozygotes et clones hétérozygotes pour l'allèle de résistance) laissent donc supposer une différence de sensibilité entre individus homozygotes résistants et individus hétérozygotes ; la mutation R81T responsable de la résistance de cible aux néonicotinoïdes ne semble donc pas complètement dominante. Néanmoins, reste à savoir si, en sus de cette résistance de cible, certains clones ne présentent pas une résistance métabolique plus ou moins développée qui pourrait avoir une influence non négligeable sur les niveaux de résistance et expliquer la variabilité de réponse enregistrée dans les tests biologiques, notamment pour les clones hétérozygotes (facteurs de résistance compris entre 5,7 et 17,7).

En conclusion, la situation est très différente selon les vergers mais la comparaison n'est pas aisée du fait de l'hétérogénéité du nombre de pucerons analysés en fonction des parcelles (14 à 65) et du nombre d'arbres échantillonnés (6 ou 26). Il n'en reste pas moins que la situation paraît inquiétante notamment pour la parcelle 12-067 : sur 65 pucerons analysés, un quart des pucerons sont homozygotes pour l'allèle de résistance et une fraction minime de la population est encore sensible. Même constat, pour la parcelle 12-068 où, certes, sur un nombre faible de pucerons analysés (17), un quart des individus est homozygote pour l'allèle de résistance tandis qu'aucun individu sensible n'est observé.

b. Résistances aux pyréthrinoïdes

Vis-à-vis de cette famille, le nombre de pucerons analysés par parcelle est compris entre 13 et 19 selon les vergers.

Tableau VI : Proportion de génotypes mis en évidence pour la résistance de cible aux pyréthrinoïdes (codon s-kdr 918)

Référence Anses	Commune	Nb de pucerons analysés	codon s-kdr 918 % de pucerons présentant les différents génotypes						
			Met/Met	Met/Thr	Met/Leu	Met/Leu ^{bis}	Leu ^{bis} /Thr	Leu ^{bis} /Leu ^{bis}	Thr/Thr
12-067	Loriol	19	0	34,6	0	7,7	26,9	0	30,8
12-068	La Roche de Glun	14	0	25	0	0	75	0	0
12-069	La Roche de Glun	13	0	38,5	0	15,4	30,8	0	15,4

Parmi les individus prélevés dans les trois vergers de la Drôme, tous présentent au moins un allèle de résistance aux pyréthrinoïdes (aucun génotype Met/Met). Chez ces individus, trois allèles différents ont été détectés pouvant donc donner potentiellement neuf génotypes différents. Mais les individus analysés présentent majoritairement les trois génotypes suivants : Met/Thr, Leu^{bis}/Thr et, pour deux vergers sur trois, Thr/Thr (n° 12-067 et 12-069). Ces deux derniers vergers présentent de plus un quatrième génotype (Met/Leu^{bis}), en proportions plus modérées (voire faible pour le verger n° 12-067).

Tous les pucerons analysés dans les trois vergers sont donc en capacité de résister aux traitements à base de pyréthrinoïdes.

IV. Conclusion

L'étude réalisée sur les populations de *Myzus persicae* prélevées dans trois vergers de la Drôme avait pour but d'analyser la répartition des allèles de résistances aux pyréthrinoïdes et aux néonicotinoïdes dans ces populations. Ces analyses ont été réalisées *via* deux méthodes de détection de biologie moléculaire (dCAPS et qPCR).

Concernant les pyréthrinoïdes, les analyses ont montré une large diversité des génotypes observés, diversité à relier à la reproduction sexuée qui se déroule sur cet hôte. Tous les pucerons testés présentant au moins un allèle de résistance paraissent donc en capacité de résister aux traitements à base de pyréthrinoïdes. Aussi, même si la faiblesse du nombre de pucerons analysés par verger ne permet pas de définir précisément les profils de résistance des populations correspondantes, ce constat reste inquiétant.

Concernant les néonicotinoïdes, l'allèle de résistance recherché est présent dans toutes les populations de *M. persicae* prélevées. Très peu d'individus montrent un génotype sauvage sensible (génotype Arg/Arg). La majorité des individus analysés s'avère être hétérozygote pour cet allèle. Le niveau de résistance chez ce

type d'individu hétérozygote est moins élevé comparé au niveau de résistance des individus homozygotes mais il pourrait être renforcé de façon plus ou moins importante par des mécanismes de résistance métabolique. De ce fait, l'efficacité réelle des traitements au terrain sur ces populations majoritairement hétérozygotes n'est pas clairement connue. Néanmoins, la fréquence allélique de la mutation R81T, de 60% dans notre échantillonnage, indique qu'il existe une réserve importante de cet allèle de résistance dans les populations étudiées. Aussi, du fait de l'existence de recombinaisons génétiques avérées dans les populations vivant sur pêcher, il est évident que cette situation constitue un risque important et que ces réserves d'allèle muté peuvent conduire rapidement (notamment dans des conditions de pression de sélection) à l'augmentation du taux d'individus homozygotes dont la résistance élevée aux néonicotinoïdes est démontrée.

En conclusion, cette étude laisse présager une situation inquiétante pour la lutte contre *Myzus persicae* dans les vergers de pêcher analysés, compte tenu des fréquences alléliques observées pour les allèles de résistance à ces deux familles majeures de la lutte chimique contre ce puceron : les pyréthriinoïdes et les néonicotinoïdes.

V. Bibliographie

- Bass C., Puinean AM., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul VL., Crossthwaite AJ., Denholm I., Field LM., Foster SP., Lind R., Williamson MS., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*, BMC Neuroscience. 12:51
- Field, L M, Williamson, M S, Moores, G D, and Devonshire, A L., 1993. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem J*, **294**, 569–574
- Fontaine S., Caddoux L., Brazier C., Bertho C., Bertolla P., Micoud A. and 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.
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, *et al*, 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet* 6:1–11

VI. Partenaires scientifiques et techniques

Chambre d'Agriculture de la Drôme (Sophie Stevenin) – 2485 route des Pecollets – 26800 Etoile sur Rhône

ANNEXE 1

Résultats des tests biologiques sur *Myzus persicae* par ingestion de milieu nutritif amendé en insecticide

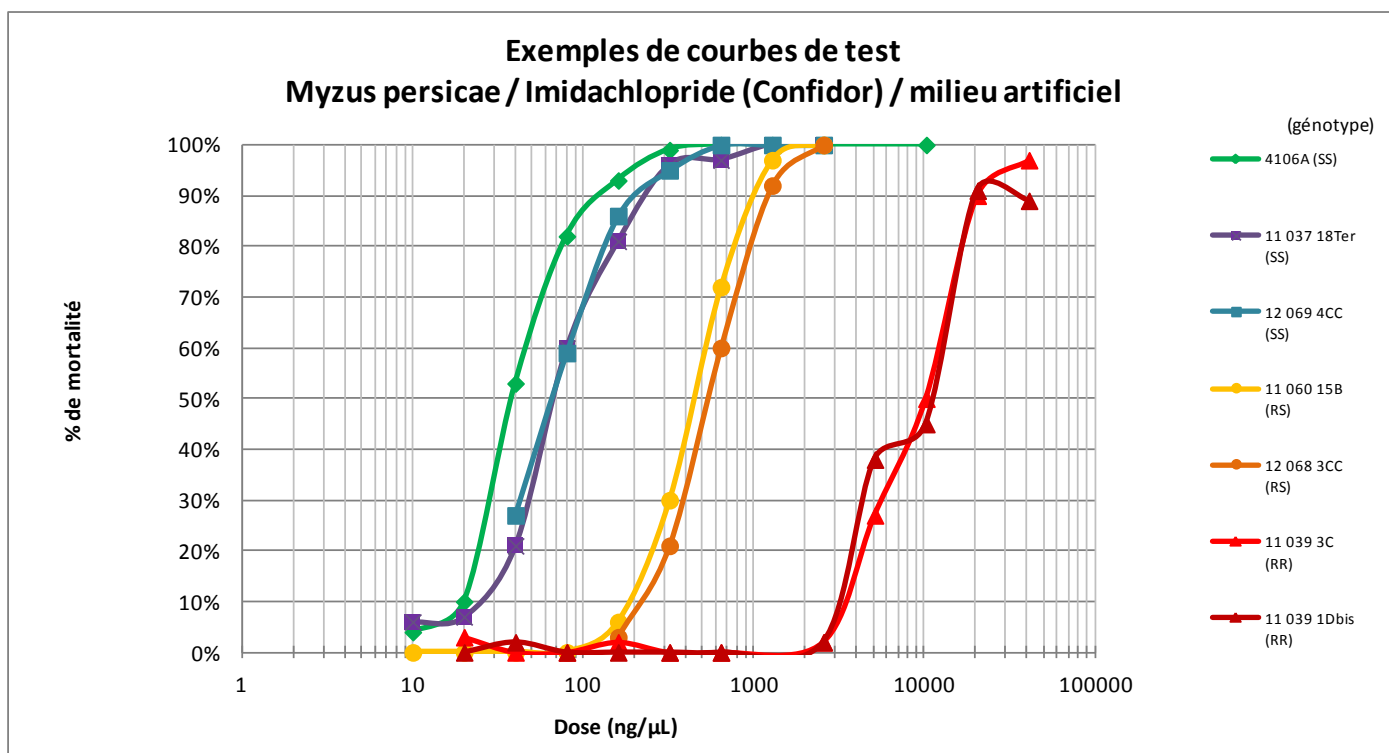


Figure 1 : Pourcentage de mortalité en fonction de la dose de Confidor (imidachlopride) pour des clones de différents génotypes :

- **Référence sensible de laboratoire** : clone **4106A**,
- **SS** (sensible pour la mutation R81T = génotype **Arg/Arg**) : clones 11-037 18ter **et** 12- 069 4CC
- **RS** (hétérozygote pour la mutation R81T = génotype **Arg/Thr**) : clones 11-060 15B **et** 12-068 3CC
- **RR** (homozygote pour la mutation R81T = génotype **Thr/Thr**) : clones 11-039 3C **et** 11-039 1Dbis

Les tests biologiques de résistance aux néonicotinoïdes présentés ici ont d'abord porté sur l'imidachlopride (ils seront, dans un deuxième temps, étendus au thiaclopride et au thiaméthoxam). Ils ont été effectués sur des clones provenant de prélèvements réalisés dans des parcelles de pêcher. Les pucerons ont été élevés et multipliés en clones sur chou chinois.

Les tests ont consisté à évaluer la mortalité de larves de stade L1, 48h après leur installation sur milieu nutritif liquide amendé (à 5%) avec l'insecticide (imidachlopride, Confidor) en gamme de doses (d'après une méthode développée par Rahbé et Febvay, 1993).

Plusieurs tests ont été réalisés pour chaque clone avec, à chaque date, deux répétitions d'au minimum 15 larves par dose d'insecticide.

Bibliographie :

Rahbé Y., Febvay G., 1993. Protein toxicity to aphids : an *in vitro* test on *Acyrtosiphon pisum*. Entomol. Exp. Appl. **67**: 149-160

ANNEXE 2

Descriptif des vergers échantillonnés

Référence Anses de l'échantillon	Commune	Producteur	Nom de la parcelle (Variété)	Prélèvement		Commentaires
				Nb arbres	Nb rameaux	
-	Bougé Chambalud	Bernard GABELLE	-	0	0	Absence de pucerons
12-067	Loriol	Gilbert LOUIS	Les Grands Sablons (Snowball et Fine Top)	26	26	
-	La Roche de Glun	Pascal GUERBY	- (Gypse)	0	0	Autre espèce de pucerons
12-068	La Roche de Glun		- (Nectapomme)	6	8	Petite parcelle Un prélèvement sur 3 charpentières du même arbre
12-069	La Roche de Glun		- (Western Red)	6	6	Présence de foyers uniquement sur de jeunes arbres disséminés sur un bloc de parcelles