



Résistance des populations de puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*) sur colza en 2014 vis-à-vis des pyréthriinoïdes, des néonicotinoïdes et des carbamates

RESUME

Cette étude vise à rechercher des allèles de résistance à trois familles d'insecticides, les pyréthriinoïdes, les carbamates et les néonicotinoïdes, utilisées pour lutter contre le puceron *Myzus persicae*. Elle concerne uniquement des populations de pucerons provenant de cultures de colza du nord de la France. Les mécanismes de résistance recherchés sont les mutations affectant le codon 918 (s-kdr) et 1014 (kdr) du gène du canal sodium (impliquées dans la résistance aux **pyréthriinoïdes**), la mutation affectant le codon 431 du gène de l'acétylcholinestérase 2 (cible des **carbamates**) et une mutation entraînant le changement du codon 81 qui affecte le gène d'une sous unité du récepteur nicotinique (cible des **néonicotinoïdes**). L'objectif principal est d'estimer la fréquence des allèles de résistance aux trois familles chimiques ciblées dans les populations étudiées, à l'aide d'outils de biologie moléculaire.

Sur les 6 populations de *M. persicae* analysées, tous les individus s'avèrent sensibles aux néonicotinoïdes. Par contre, une très forte majorité d'entre eux présentent une double résistance aux pyréthriinoïdes et aux carbamates, jetant un très sérieux doute sur l'efficacité de ces familles d'insecticides dans les parcelles concernées.

Mots clés : *Myzus persicae*, résistances, pyréthriinoïdes, carbamates, néonicotinoïdes



I. Rappel du contexte

Cette étude vise à rechercher des allèles de résistance à trois familles d'insecticides : les pyréthriinoïdes, les carbamates et les néonicotinoïdes. Ces insecticides sont principalement utilisés pour lutter contre le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*. Les populations échantillonnées cette année l'ont été uniquement sur des parcelles de colza.

L'objectif principal est d'estimer la fréquence des allèles de résistance aux trois familles chimiques ciblées, dans des populations vivant sur colza, dans le quart Nord-Est de la France. Les pucerons analysés sont des individus prélevés en 2014 dans les parcelles suivantes :

Région	Référence échantillon Anses	Référence échantillon Expéditeur
Champagne Ardenne	14-143	14-CA-10-02
	14-144	14-MP-LPV-10-002
	14-145	14-CA-51-01
Lorraine	14-160	14-LOR-55-01
Picardie	14-137	14-PI-80-01-CETIOM
	14-147	14-PI-80-01-SRAL

II. Description brève des méthodes utilisées

- Pour la résistance aux **pyréthriinoïdes**, deux mutations de cible ont été recherchées, kdr et s-kdr affectant respectivement les codons 1014 (kdr) et 918 (s-kdr) du gène codant pour le canal sodium. Il a été démontré que ces mutations étaient impliquées dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez cette espèce. L'identification des différents allèles se fait par **séquençage Sanger** de la portion d'intérêt du gène du canal sodium. Le séquençage permet de génotyper simultanément les deux sites connus et permet également l'identification de potentiels nouveaux allèles de résistance. Quelle que soit la position de la mutation (site kdr ou site s-kdr) et quel que soit son statut (homozygote ou hétérozygote), dans tous les cas, l'individu porteur d'une de ces mutations présente une résistance aux pyréthriinoïdes.
- Pour la résistance aux **carbamates**, la détection de cette résistance se fait par **PCR-RFLP dCAPs** afin de détecter la mutation Mace, responsable de la résistance aux carbamates, en position 431 de l'acétylcholinestérase 2. La mutation entraîne une perte de l'affinité entre la substance active et l'acétylcholinestérase.
- Tous les individus ont également été analysés pour rechercher une résistance de cible aux **néonicotinoïdes** liée à la mutation R81T (Bass *et al.*, 2011) sur la sous unité β du récepteur nicotinique par une méthode de **PCR dCAPs**. Des recherches (Bass *et al.*, 2011) ont mis en évidence cette mutation (R81T) chez *M. persicae* responsable d'une baisse d'affinité entre le récepteur nicotinique et la molécule chimique.



Laboratoire Anses-Lyon
Unité Résistances aux produits phytosanitaires

Quelles que soient les mutations recherchées, les méthodes utilisées permettent de distinguer, pour chaque individu, son génotype (homozygote ou hétérozygote).

N.B. : pour la codification des différentes mutations, se conférer à l'annexe 1

III. Résultats

Un total de 165 pucerons a été échantillonné et analysé. Le tableau 1 donne la répartition du nombre de pucerons par parcelle.

Référence échantillon Anses	Référence échantillon Expéditeur	Nombre d'individus analysés
14-137	14-PI-80-01	24
14-143	14-CA-10-02	30
14-144	14-MP-LPV-10-002	28
14-145	14-CA-51-01	30
14-147	14-PI-80-01	30
14-160	14-LOR-55-01	23

Tableau 1 : Répartition du nombre de pucerons par parcelle du plan de surveillance 2014.

1. Résistance aux Pyréthriinoïdes

Pour 1 puceron (14-160-022), il n'a pas été possible d'obtenir de résultat pour kdr et s-kdr. Pour 1 puceron (14-143-015), il n'a pas été possible d'obtenir de résultats pour s-kdr. Le taux de données manquantes pour la détection des mutations du canal sodium est donc de 0,6 % pour le locus kdr et 1,2 % pour le locus s-kdr.

Sur les 163 pucerons avec des résultats (Fig 1) :

- 75,5 % des individus ne possèdent pas la mutation kdr mais sont porteurs de la mutation s-kdr sous la forme para-918^[ML];

- 24,5 % des individus testés sont porteurs de la mutation kdr (génotype hétérozygote para-1014^[LF]) dont :

- 21,5 % sans mutation s-kdr (para-918^[MM])
- 1,8 % avec la mutation s-kdr (para-918^[MT])
- 1,2 % avec les mutations s-kdr (para-918^[LT]) .

R : La mutation s-kdr sous forme para-918^[ML] n'a jamais été trouvée associée à la mutation kdr.

Chez tous les individus étudiés, au moins une des mutations conférant une résistance aux pyréthriinoïdes a été identifiée. La totalité des individus génotypés en 2014 sur colza présente donc une résistance aux pyréthriinoïdes.

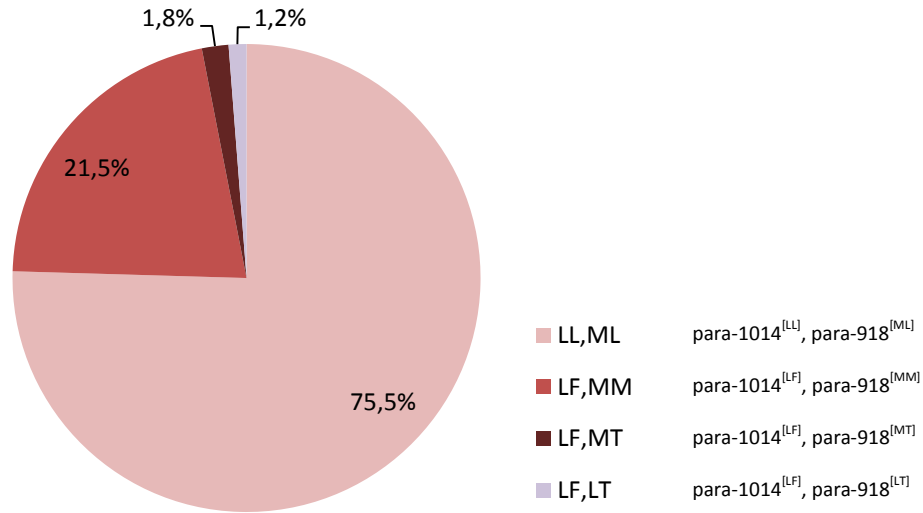


Fig 1 : proportion des génotypes cumulés pour tous les pucerons testés

Le génotype homozygote sensible pour la mutation kdr et hétérozygote pour la mutation s-kdr (para-1014^[LL], para-918^[ML]) est globalement très majoritaire dans les parcelles de colza étudiées (75.5 %). Ce génotype de résistance est également dominant (>50 %) dans 5 des 6 parcelles échantillonnées (Fig 2).

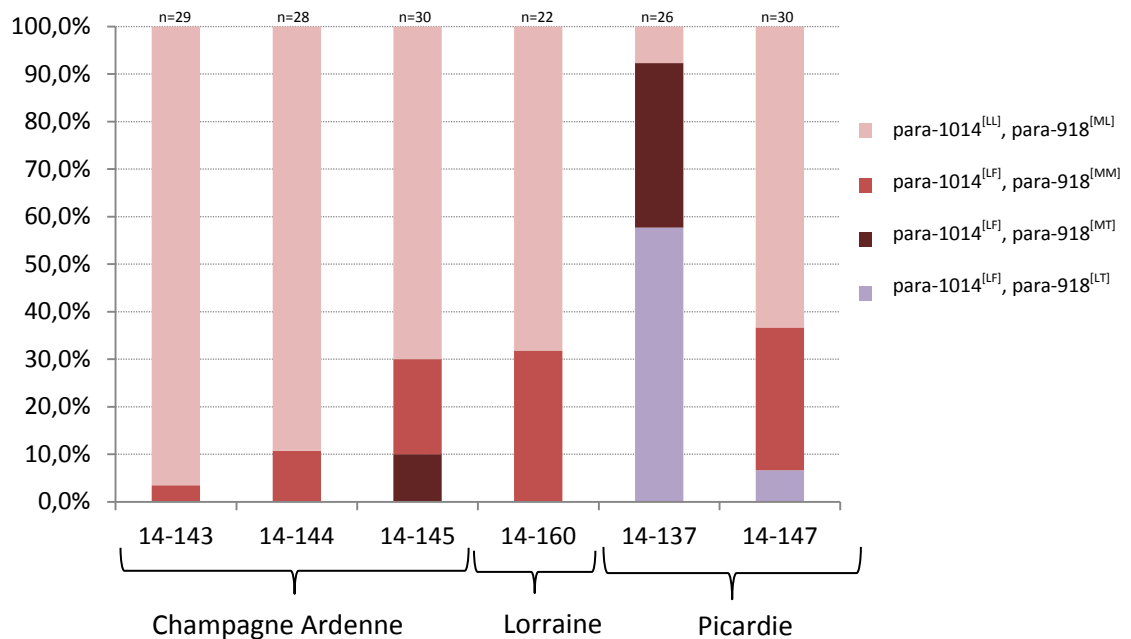


Fig 2 : répartition des génotypes para-1014 et para-918 détectés par parcelle.



2. Résistance aux Carbamates

Pour 1 puceron (14-160-022), il n'a pas été possible d'obtenir de résultat pour la mutation Mace (soit 0,6% de données manquantes).

Si l'on considère l'ensemble des pucerons analysés (164 individus), **76% d'entre eux possèdent la mutation Mace** à l'état hétérozygote (AChE-431^[SF]) tandis que 24% se sont révélés sauvages homozygotes (AChE-431^[SS]).

Dans toutes les parcelles analysées, des individus présentant un génotype hétérozygote pour la résistance aux carbamates sont détectés. La proportion minimale de ces individus est de 58% en Picardie (parcelle 14-137) et atteint même une proportion de 97% en Champagne Ardenne (parcelle 14-143) (Fig. 3). Il est intéressant de constater que nous n'observons pas d'individus homozygotes pour cette résistance, malgré une fréquence de l'allèle de résistance extrêmement élevée dans certaines populations. Ceci peut être interprété de deux manières. La première est que les populations sur Colza se maintiennent uniquement grâce à de la reproduction asexuée. En effet, si la recombinaison avait lieu, nous observerions, après une génération de reproduction sexuée, des homozygotes résistants à une fréquence élevée, en particulier dans les populations avec une forte fréquence d'allèle résistant. La seconde explication possible est que ces homozygotes résistants sont produits mais qu'un coût important sur la fitness de ces individus les contre-sélectionne dans la population.

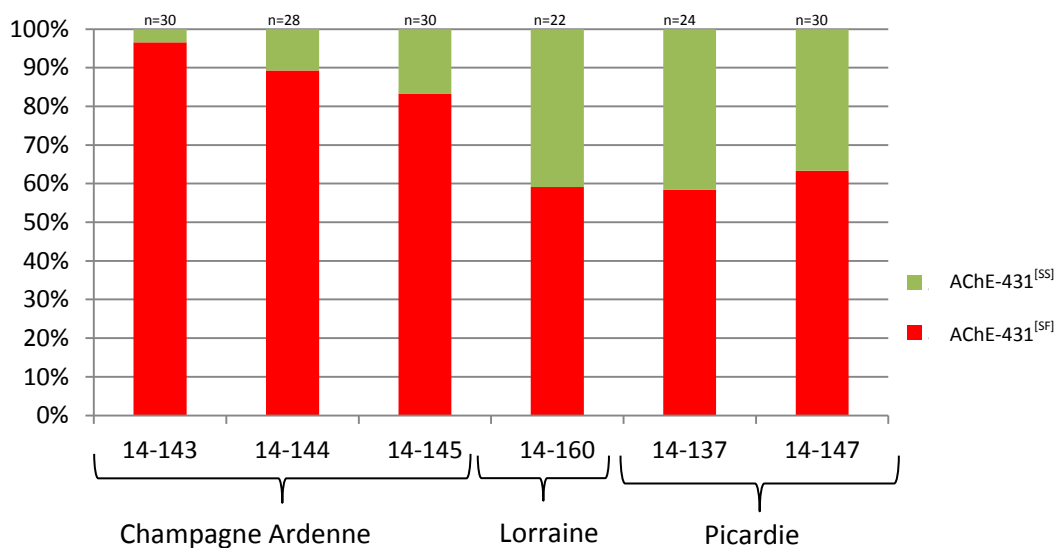


Fig 3 : répartition des génotypes AChE-431^[SS] et AChE-431^[SF] (Carbamates) détectés par parcelle.

3. Résistance aux Néonicotinoïdes

Aucune mutation R81T n'a été détectée sur les 165 pucerons analysés, donc pour l'ensemble des parcelles échantillonnées.



4. Profils de résistances combinées

4.1 Distribution et répartition des génotypes de résistances

4.1.1 Données globales

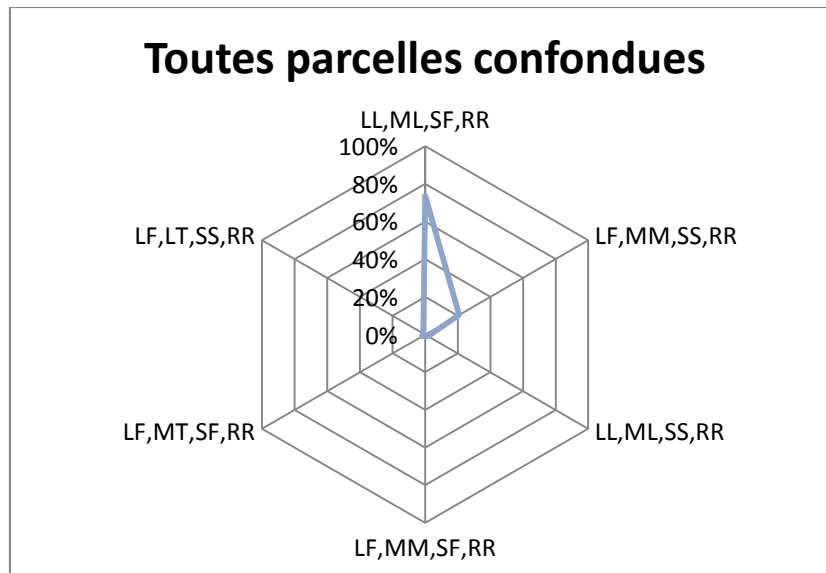


Figure 5 : répartition des profils de génotypes de résistance détectés, toutes parcelles confondues
Les loci de résistance qui constituent les génotypes sont donnés dans l'ordre suivant: *kdr*, *s-kdr*, *Mace*, *R81T*

Légende :

LL, ML, SF, RR : para-1014^[LL], para-918^[ML], AChE-431^[SF], B1-81^[RR]
LF, MM, SS, RR : para-1014^[LF], para-918^[MM], AChE-431^[SS], B1-81^[RR]
LL, ML, SS, RR : para-1014^[LL], para-918^[ML], AChE-431^[SS], B1-81^[RR]
LF, MM, SF, RR : para-1014^[LF], para-918^[MM], AChE-431^[SF], B1-81^[RR]
LF, MT, SF, RR : para-1014^[LF], para-918^[MT], AChE-431^[SF], B1-81^[RR]
LF, LT, SS, RR : para-1014^[LF], para-918^[LT], AChE-431^[SS], B1-81^[RR]

Le profil majoritairement représenté pour toutes les parcelles analysées est : LL, ML, SF, RR (résistant carbamates et pyréthriinoïdes avec mutation *s-kdr* atypique) avec 74 % des individus analysés présentant ce génotype. Le profil LF, MM, SS, RR (uniquement résistant aux pyréthriinoïdes avec mutation *kdr* seule) est le deuxième profil le plus fréquent avec 21 %. **Aucun profil totalement sensible à la fois aux trois familles ciblées** (profil attendu : **LL, MM, SS, RR**) n'a été détecté. Il est également intéressant de noter que des génotypes de résistances rares et différents sont observés dans les parcelles des différentes régions.

4.1.2 Répartition par parcelle des génotypes de résistance

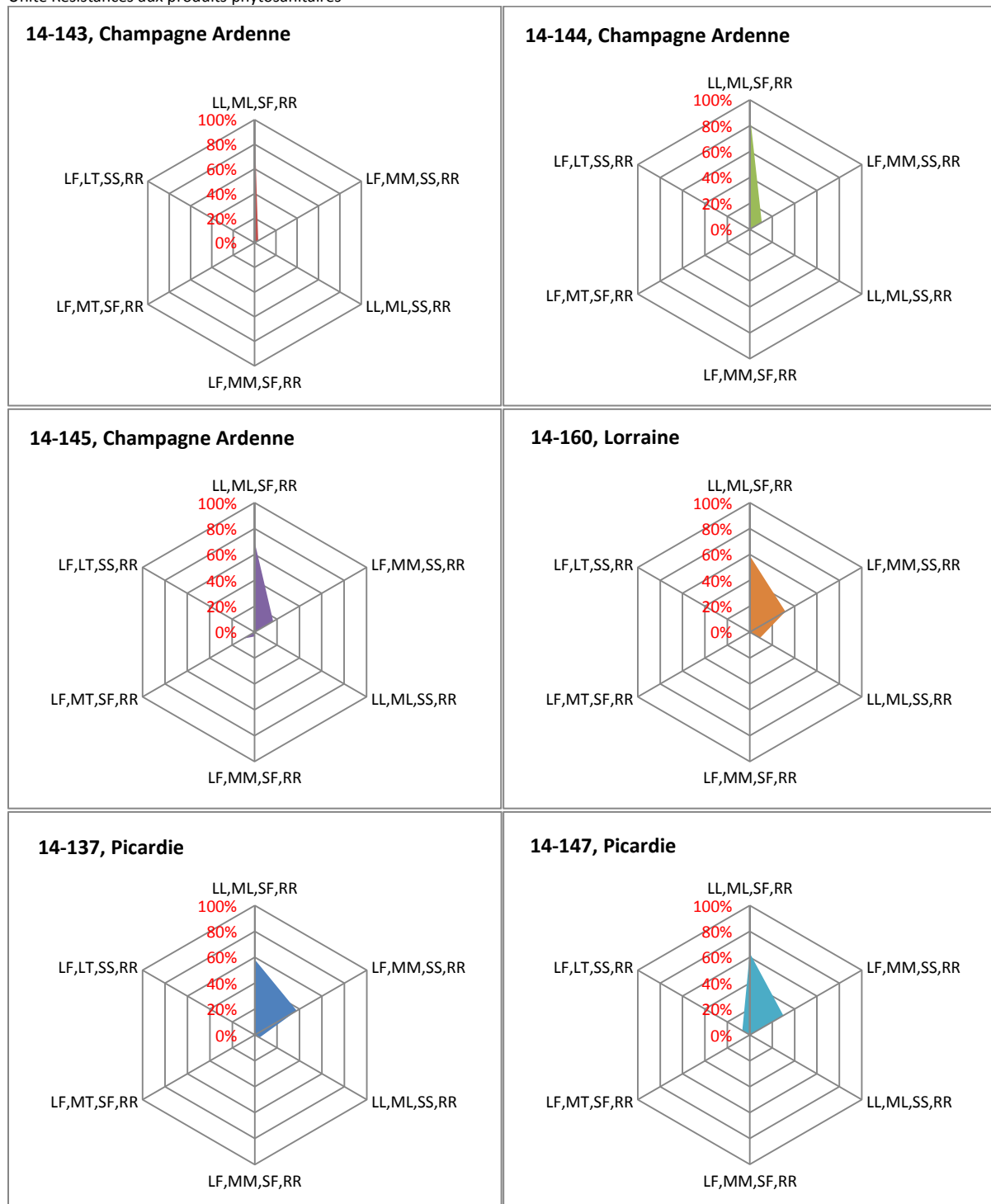


Figure 6 : répartition des profils de génotypes de résistance détectés par parcelle
Les loci de résistance qui constituent les génotypes sont donnés dans l'ordre suivant: kdr, s-kdr, Mace, R81T

Au niveau régional et bien que chacune des trois régions étudiées ne soit représentée que par un très faible nombre de parcelles, il ressort que :



- en Champagne, deux des trois parcelles échantillonnées présentent, dans leurs populations, uniquement les deux profils les plus majoritaires, avec une très forte fréquence du profil dominant LL, ML, SF, RR (>89 %) et une beaucoup plus faible proportion du second profil LF, MM, SS, RR (de 3 à 17 %).
Dans la troisième parcelle, le profil majoritaire LL, ML, SF, RR est toujours très présent (70 %) Trois autres génotypes sont détectés : le deuxième génotype dominant (LF, MM, SS, RR : 17 %) et deux autres profils (dont LF, MM, SS, RR et LF, MT, SF, RR) en faible fréquence (entre 3 et 10 %).
- en Picardie, les deux profils les plus majoritaires sont retrouvés dans les deux parcelles prélevées. Il faut toutefois noter que le second profil (LF, MM, SS, RR) est détecté avec une fréquence plus importante qu'en Champagne (38 et 30 %). Dans chacune de ces deux parcelles, un profil minoritaire différent est également observé.
- pour la parcelle de Lorraine, la composition de cette population s'avère assez proche de celle de la parcelle 14-137 de Picardie avec les trois mêmes génotypes de résistance présents dans des proportions similaires.

4.2 Profil de résistances des populations par fréquence allélique

4.2.1 Données globales

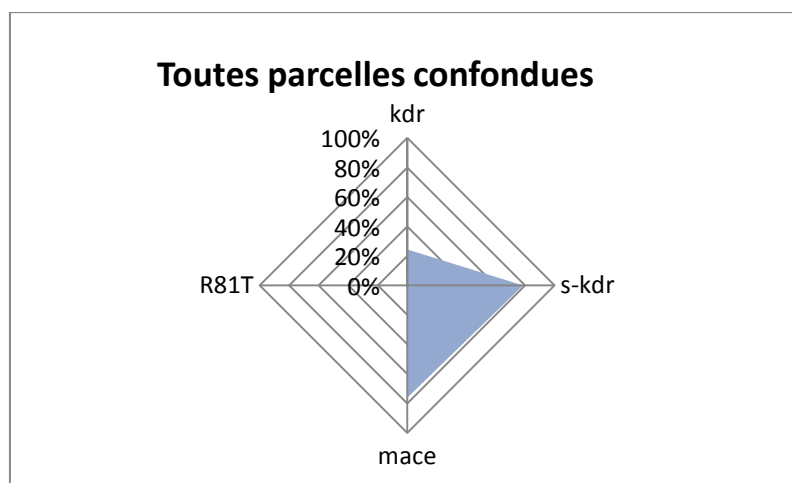


Figure 7 : Fréquence des allèles de résistance détectés toutes parcelles confondues

La fréquence globale des différents allèles de résistance observés dans le plan de surveillance de 2014 montre que la résistance Mace et la résistance s-kdr sont très majoritaires dans les populations étudiées (76 % et 79 % pour Mace et s-kdr, respectivement). On note également une fréquence non négligeable de l'allèle de résistance kdr (24 %).



4.2.2 Fréquences alléliques par parcelle

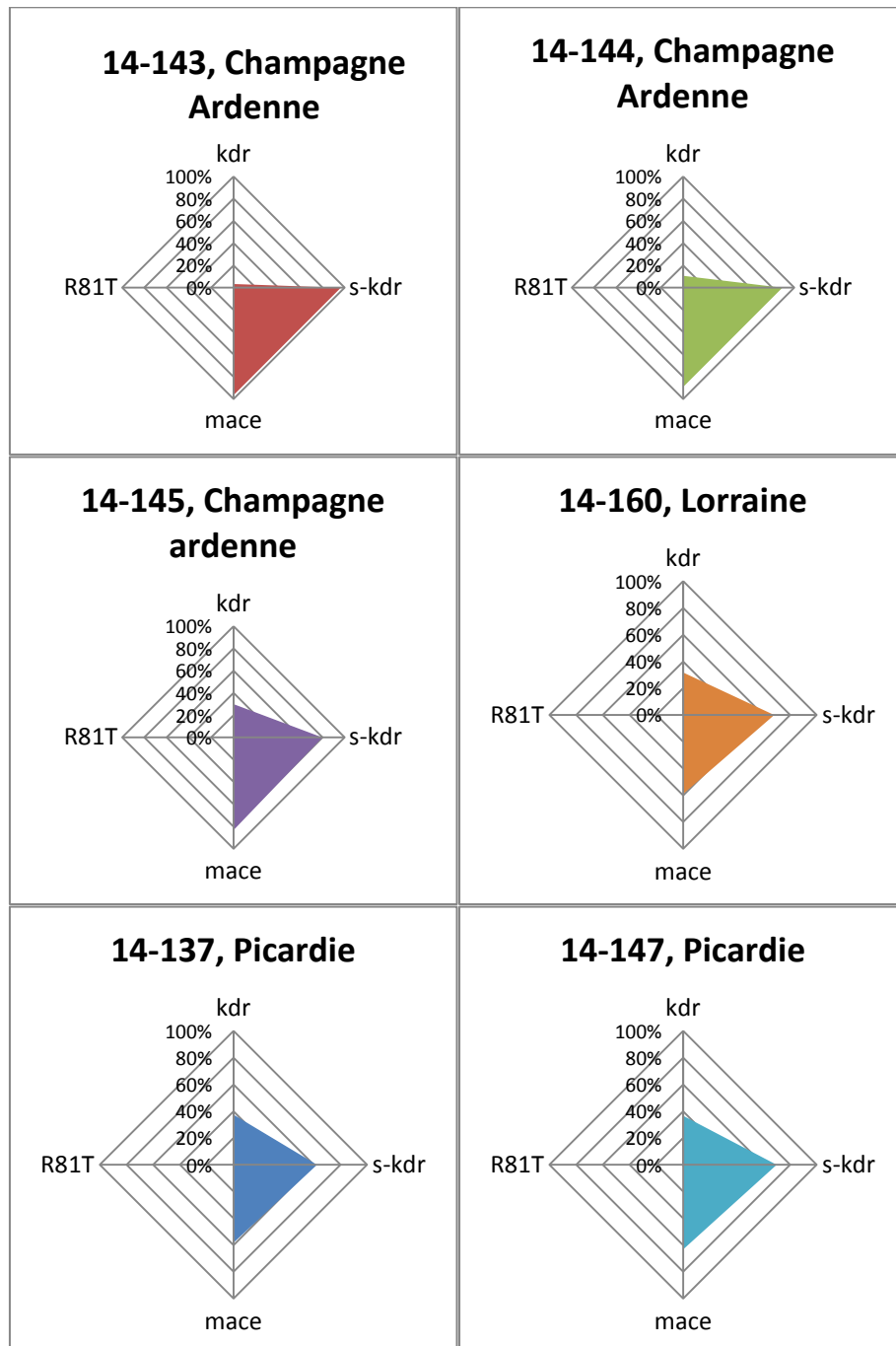


Figure 8 : Fréquence des allèles de résistance détectés par parcelle

Si on observe les résultats à l'échelle des parcelles étudiées, on note que les populations de Champagne-Ardenne ont une fréquence de l'allèle Mace résistant supérieure aux autres populations (90 % contre 60% en moyenne dans les autres parcelles). Ces populations de Champagne-Ardenne ont également une fréquence d'allèle résistant au locus s-kdr plus élevée (89 % contre 67 % en moyenne dans les autres parcelles). Enfin la fréquence de l'allèle de résistance kdr est variable dans les parcelles de Champagne-Ardenne (entre 3 et 30 %). Dans les autres régions, la fréquence de



résistance de type *kdr* est comparable et, en moyenne, plus importante qu'en Champagne-Ardenne (36 % contre 15 % en Champagne-Ardenne). Il est intéressant de constater que les très fortes fréquences en allèle de résistance *Mace* et *s-kdr* observées dans les populations de Champagne-Ardenne sont la conséquence directe de la dominance d'un même génotype de résistance dans ces mêmes populations.

IV. Conclusion

Sur les 6 populations de *M. persicae* analysées, toutes prélevées sur colza dans le nord de la France, tous les individus s'avèrent sensibles aux néonicotinoïdes mais tous sont résistants à au moins une des deux autres familles d'insecticides testées (pyréthrinoïdes et carbamates) et une très grande majorité d'entre eux cumule la résistance aux pyréthrinoïdes et aux carbamates. Ces résistances étant liées à des mécanismes de modification de cible (donc connues comme à haut niveau de résistance), l'efficacité des traitements avec ces types d'insecticides doit probablement être extrêmement limitée sur les parcelles échantillonnées.

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
- Delmotte, F., N. Leterme, et al. (2002). Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. Molecular Ecology 11(4): 711-723.
- 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.
- Slater R., Paul VL., Andrews M., Garbay M., Camblin P., 2012. Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain, Pest Management Science. 68 : 634-638



ANNEXE 1

Les génotypes trouvés chez *Myzus persicae* sont codifiés de la manière suivante :

- Pour les gènes concernés par la résistance de cible aux **pyréthrinoïdes**, les tableaux I et II décrivent les différents génotypes rencontrés.

Génotype	Codification
Homozygote Leucine (sauvage)	para-1014 ^[LL]
Hétérozygote Leucine et Phénylalanine	para-1014 ^[LF]
Homozygote Phénylalanine	para-1014 ^[FF]

Tableau I - codification des génotypes trouvés pour le codon 1014 (kdr) du gène du canal sodium (gène para)

Génotype	Codification
Méthionine / Méthionine	para-918 ^[MM]
Méthionine / Thréonine	para-918 ^[MT]
Méthionine / Isoleucine	para-918 ^[MI]
Méthionine / Leucine	para-918 ^[ML]
Méthionine / Leucine bis	para-918 ^[MLbis]
Leucine / Thréonine	para-918 ^[LT]
Leucine / Thréonine	para-918 ^[LT]
Leucine/Leucine	para-918 ^[LL]
Leucine bis/Leucine bis	para-918 ^[LbisLbis]

Tableau II - codification des génotypes trouvés pour le codon 918 (s-kdr) du gène du canal sodium (gène para)



- Pour le gène concerné par la résistance de cible aux **carbamates** (codon 431), les génotypes trouvés sont codifiés comme suit (tableau III) :

Génotype	Codification
Homozygote Sérine (sauvage)	AChE-431 ^[SS]
Hétérozygote Sérine et Phénylalanine	AChE-431 ^[SF]
Homozygote Phénylalanine	AChE-431 ^[FF]

Tableau III - codification des génotypes trouvés pour le codon 431 (mutation Mace) du gène de l'acétylcholinestérase 2.

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

Génotype	Codification
Homozygote Arginine (sauvage)	B1-81 ^[RR]
Hétérozygote Arginine et Thréonine	B1-81 ^[RT]
Homozygote Thréonine	B1-81 ^[TT]

Tableau IV : codification des génotypes trouvés pour le codon 81 du gène du récepteur nicotinique (sous-unité β1)

- Année de première détection des différents génotypes pour le codon 918 (s-kdr) par l'unité RPP chez des *Myzus persicae* prélevés sur colza et pêcher.

Génotype	Sur pêcher (année de première détection par RPP)	Sur colza (année de première détection par RPP)
para-918[MT]	2011	2010
para-918[MI]	-	2010
para-918[ML]	2013	2009
para-918[ML ^{bis}]	2011	2011
para-918[L ^{bis} T]	2011	-
para-918[LT]	2013	2011
para-918[LL]	2011	-
para-918[L ^{bis} L ^{bis}]	2011	-