

Résistance aux (bio)insecticides du carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) et du puceron rose (*Dysaphis plantaginea*)

Myriam SIEGWART

myriam.siegwart@inra.fr

Présentation groupe pomiculteurs québécois 12 février 2019

DEFINITION DE LA RESISTANCE

DEFINITION OMS (1957)

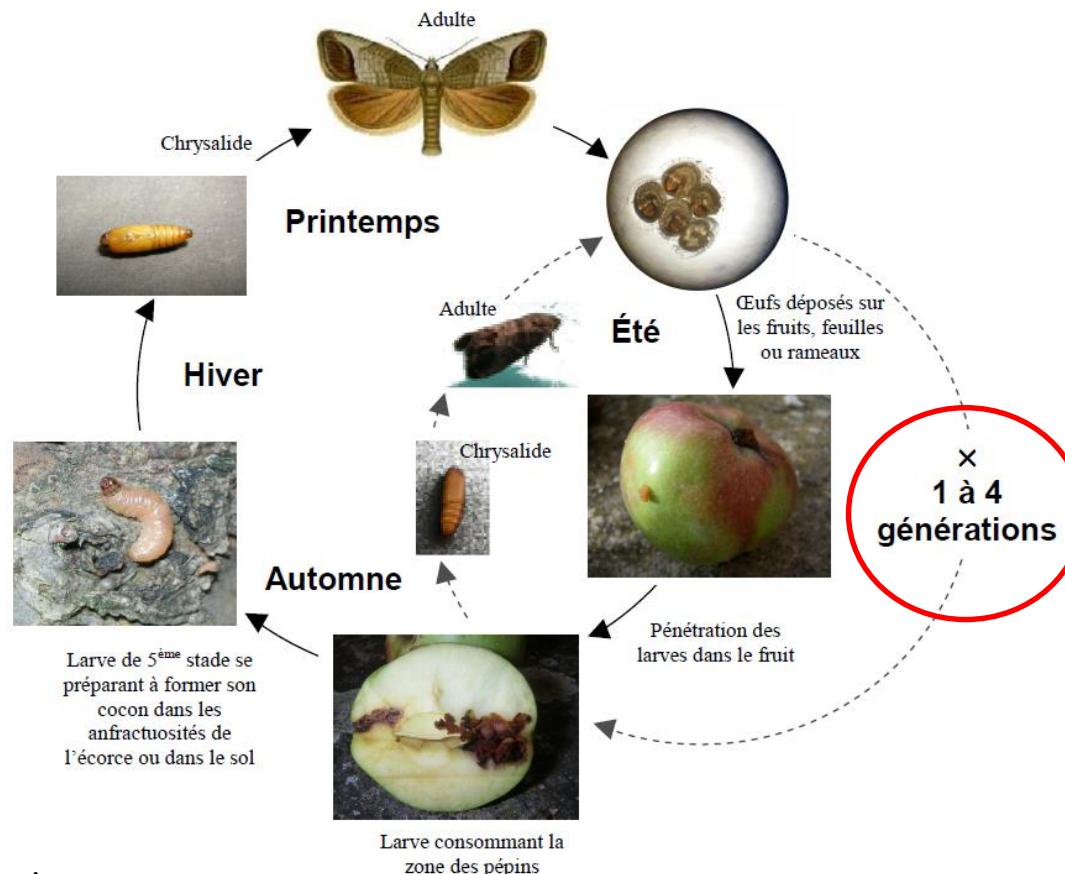
La résistance d'une race d'insectes aux insecticides, c'est le DEVELOPPEMENT d'une capacité à tolérer des doses de toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus d'une POPULATION normale de la même espèce.

DEFINITION DE CROW (1957)

La résistance marque un CHANGEMENT GENETIQUE dans la réponse d'un insecte à un insecticide.

Le carpocapse des pommes

(*Cydia pomonella*)



Hôtes principaux : pommiers,
poiriers, cognassiers, noyers

A quoi ça sert d'étudier les résistances aux insecticides ?

✓ Caractérisation

Observations au champ
échec de traitement ?

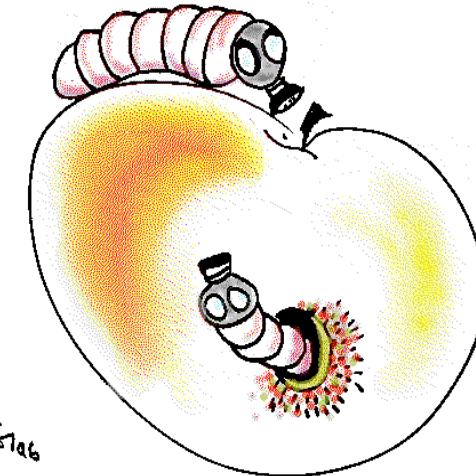
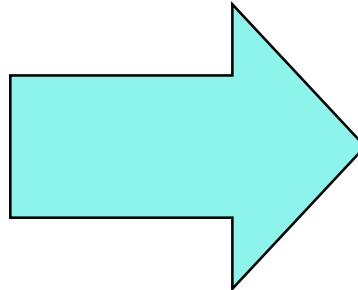
Biotest : Spectre de résistance

Mécanismes

Hérédité

✓ Surveillance

✓ Stratégie de lutte



GESTION
de la
RESISTANCE aux INSECTICIDES

Biotests

- Populations identifiées
 - isolement
 - Sélection de souche
 - production massale

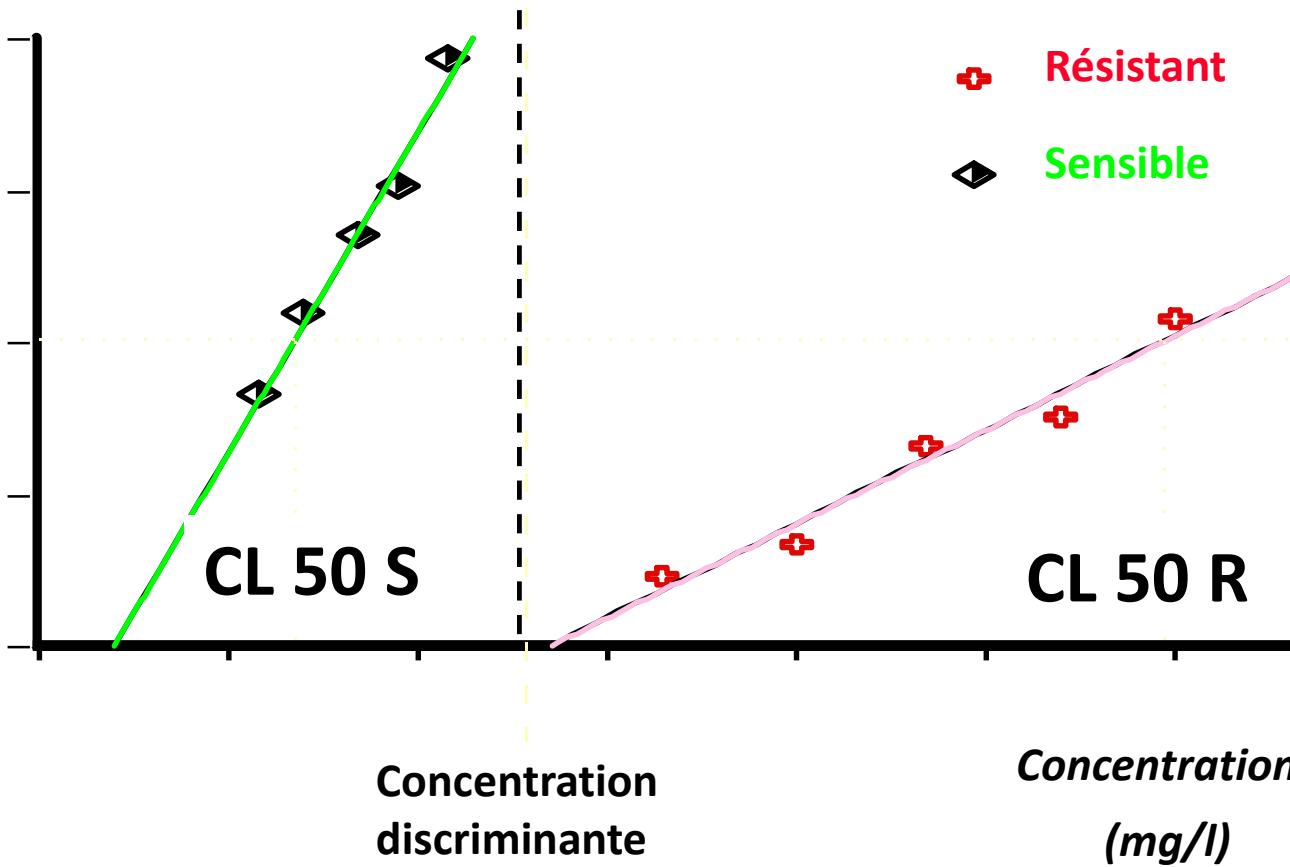


- Biotests
 - stade « cible »
 - matériel homogène
 - mode d'application
 - reproductibilité



Essai biologique pour la caractérisation de la résistance (Carpocapse / diflubenzuron)

Probit
mortalité



Concentrations / doses en progression géométrique

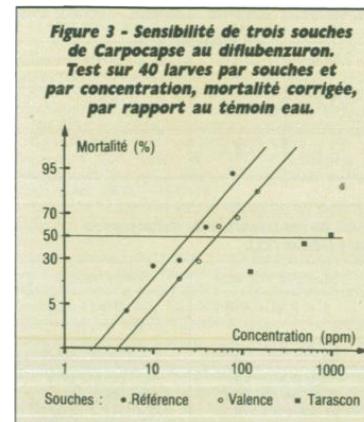
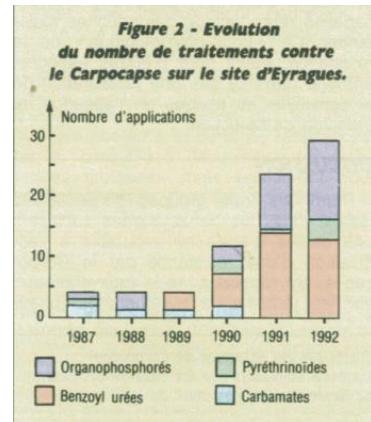
Histoire Française : Début 1990's résistance au diflubenzuron

Homologué en 1975

famille chimique des benzoyl-urées recommandée en agriculture raisonnée car relative innocuité sur la faune auxiliaire

1^{er} échec de protection en 1989 dans la région Sud-Est

1^{er} cas avéré : tests en laboratoire 1993 : Rapport de résistance d'environ 300



En 1995 mise en évidence que cette résistance est croisée. Elle confère des résistances au diflubenzuron, à la deltaméthrine, à la phosalone, à l'azinphos-méthyl et au dimétoate

Courant 90's caractérisation de la résistance à la deltaméthrine

Constitution de souches de laboratoire pour étudier les mécanismes de résistances
(RR=3 170)

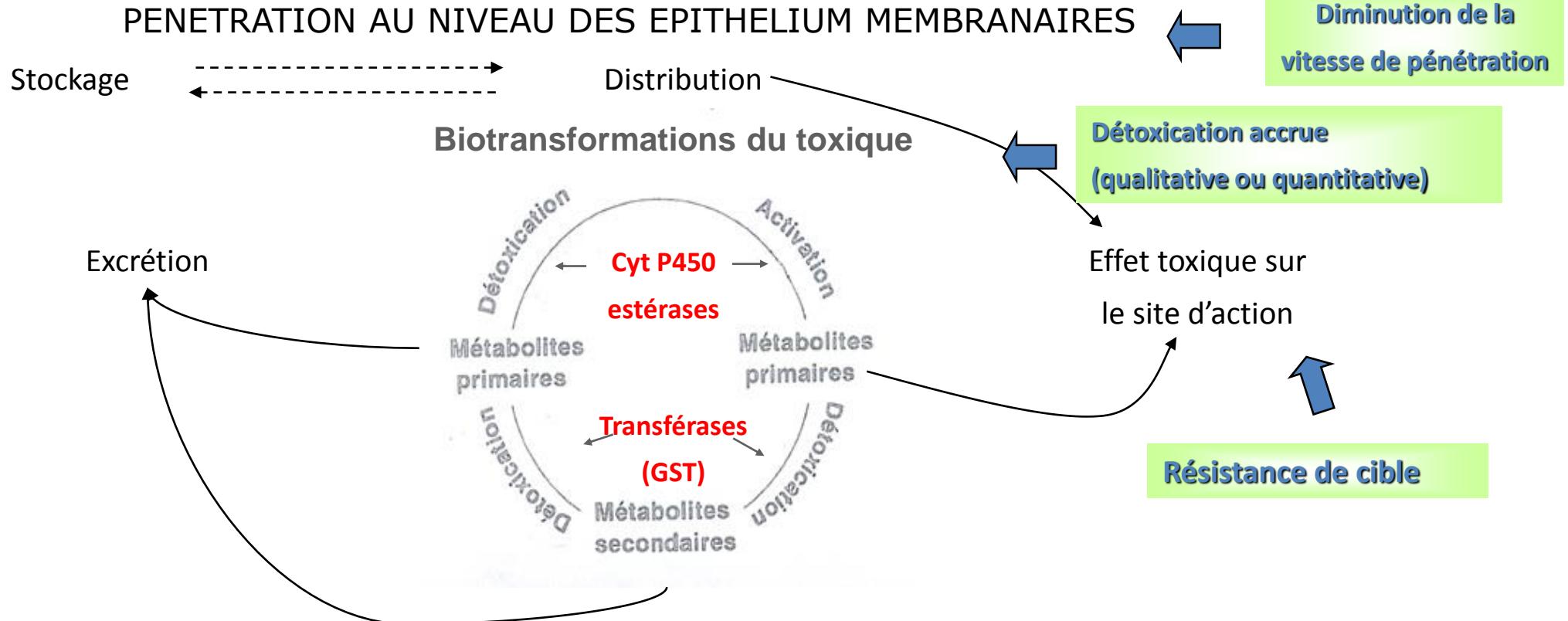
Début 2000's résistance à l'azinphos-méthyl

Intensification de la lutte essentiellement au moyen d'organo-phosphorés à fortes doses
due aux résistances déjà mentionnées

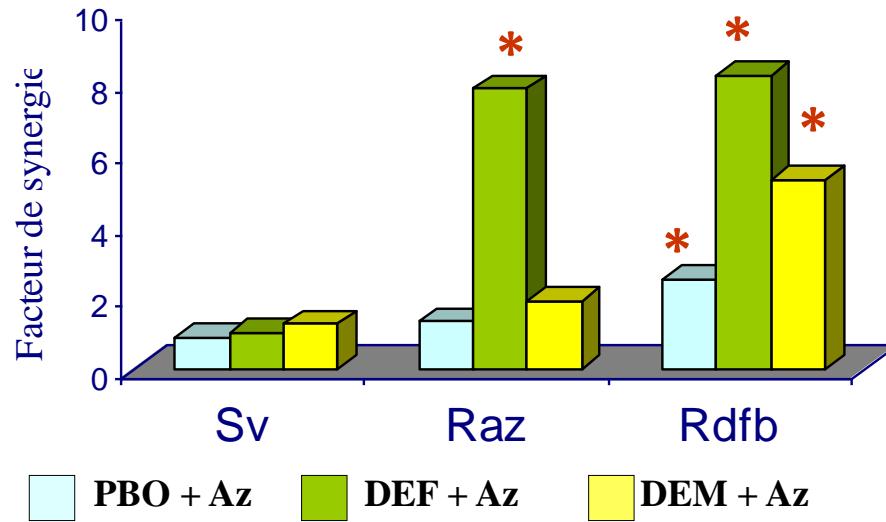
Mécanismes de résistance

APPLICATION DE L'INSECTICIDE

- Voie cutanée
- Voie orale
- Voie respiratoire



Caractérisation des mécanismes : synergies



- Synergie du PBO et DEM chez Rdfb seul : **implication MFO et GST**
- Forte synergie avec le DEF chez Rdfb et Raz : **EST impliquées dans la résistance**
- EST modifiée, affinité forte pour l'az et faible pour β -naphtyl

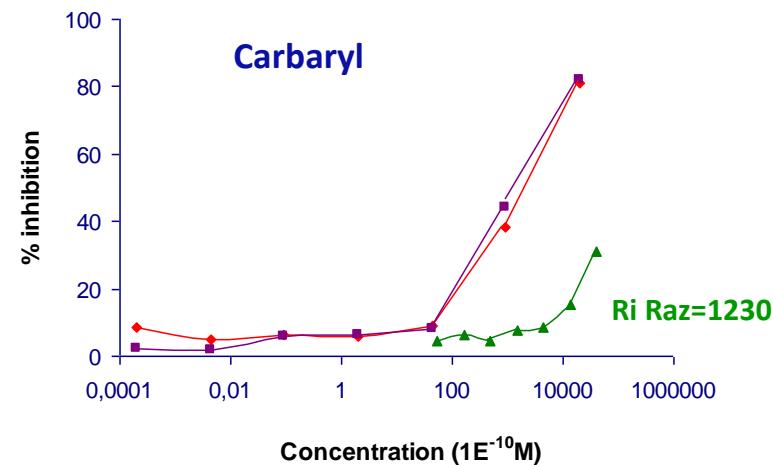
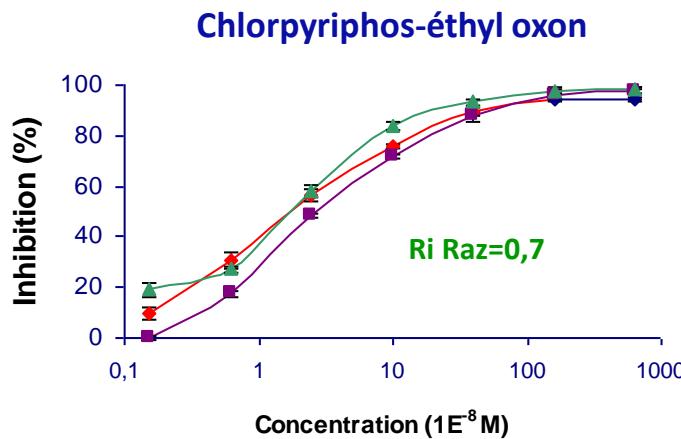
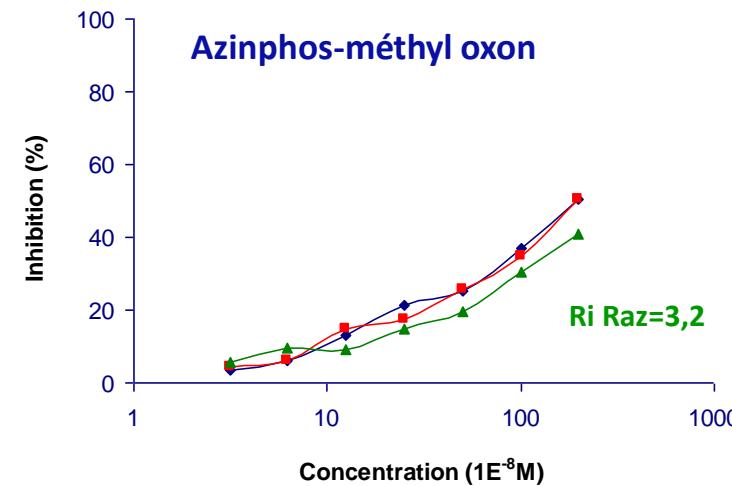
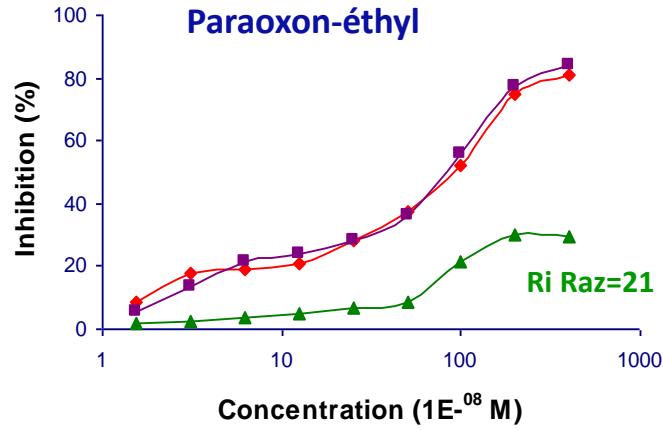
Hypothèse de l'aliesterase

(Oppernoth et van Asperen, 1960)

- ✓ piperonyl butoxide (PBO) : inhibiteur des MFO
- ✓ diethyl maleate (DEM) : inhibiteur des GST
- ✓ S,S,S-tributyl phosphorotritioate (DEF) : inhibiteur des EST

$$\text{Facteur de synergie} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ insecticide seul}}{\text{DL}_{50} \text{ insecticide + synergiste}}$$

Inhibition de l'activité AChE



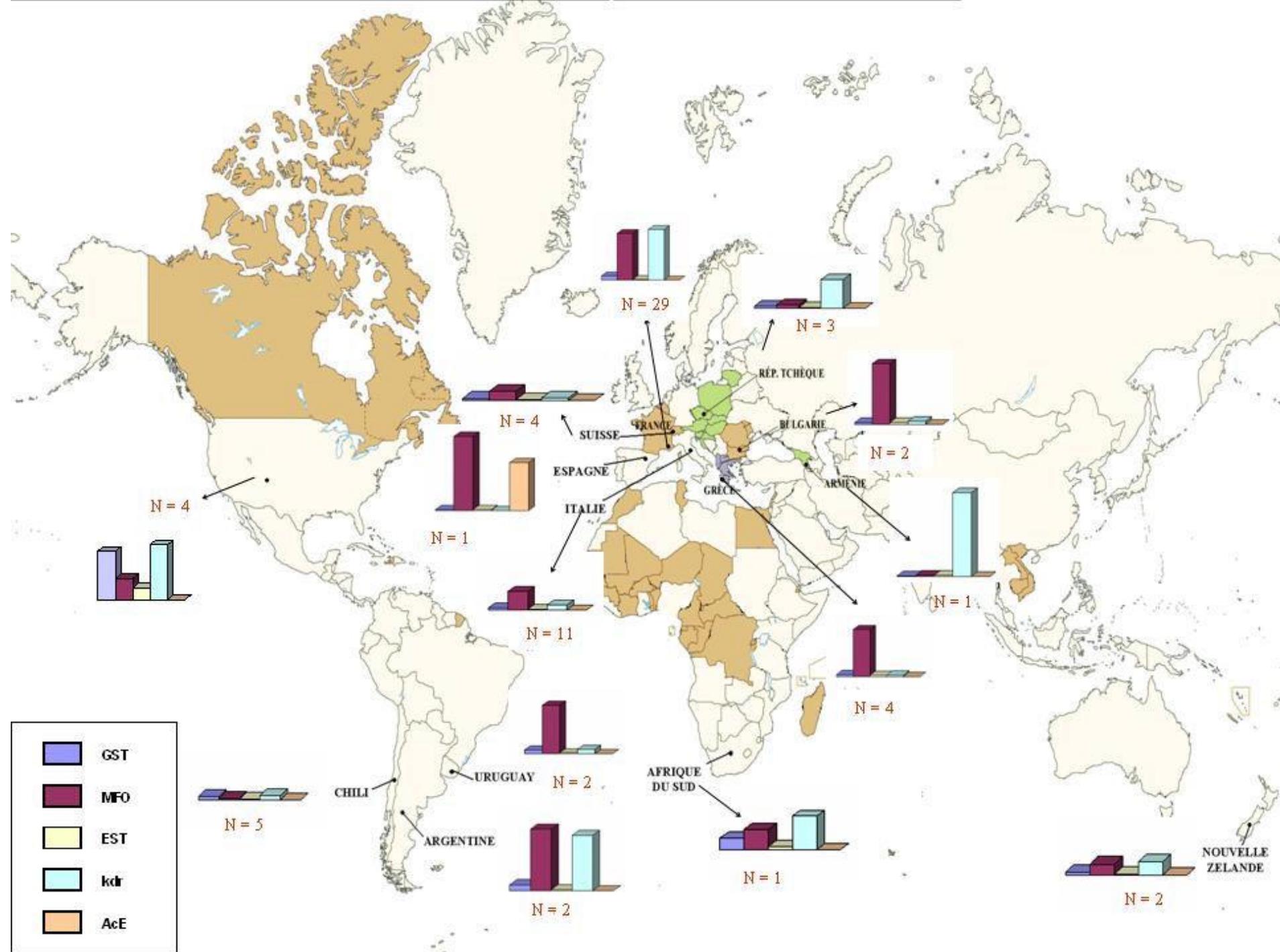
Sv



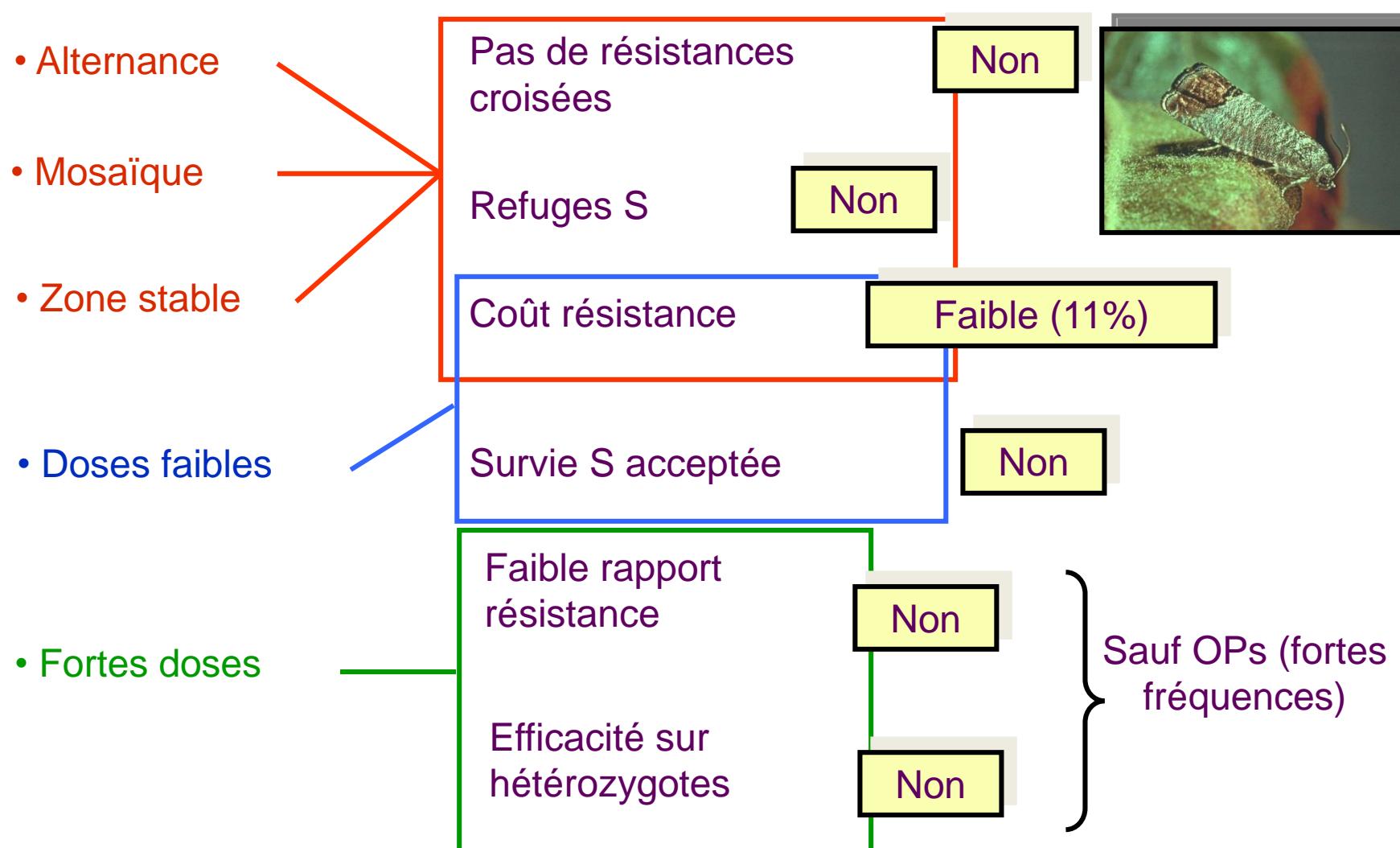
Raz



Rdfb



Principes usuels de gestion de la résistance



Un problème récent inquiétant ...

LE VIRUS DE LA GRANULOSE

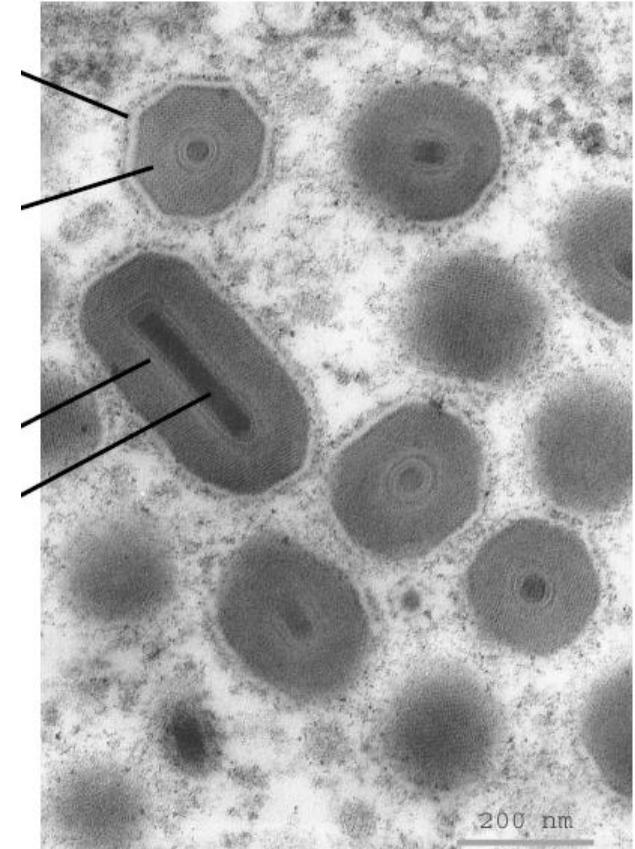
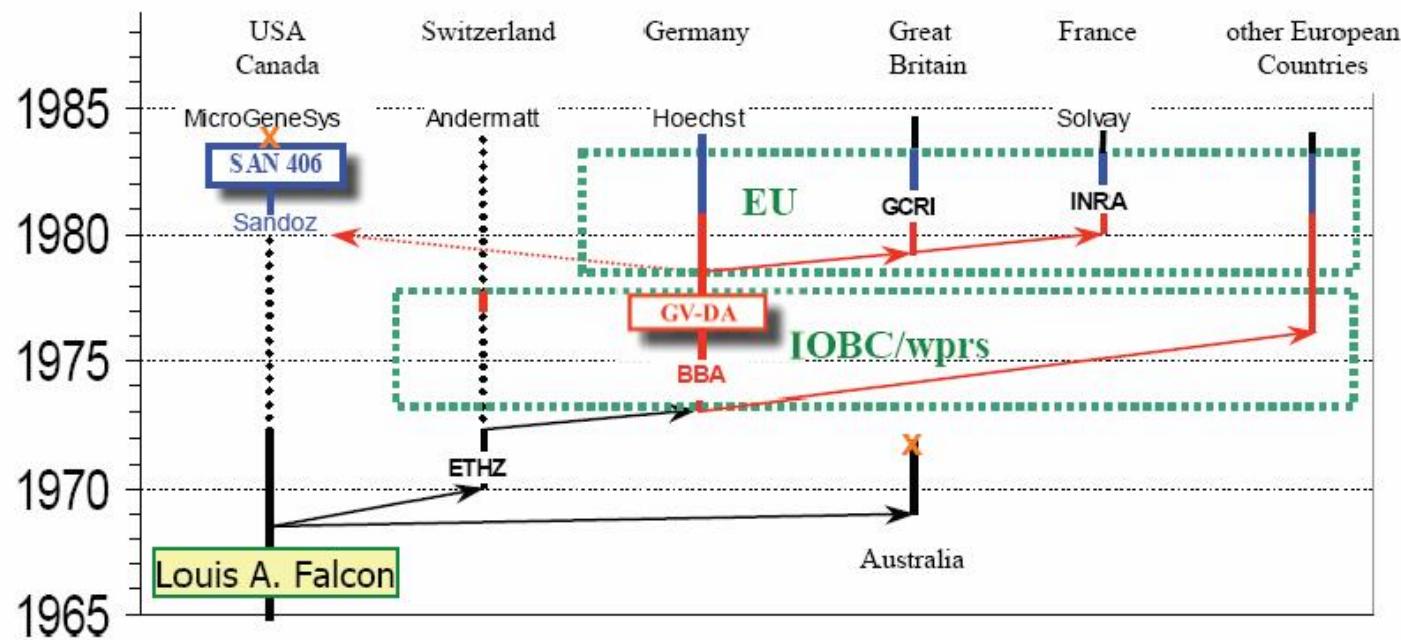
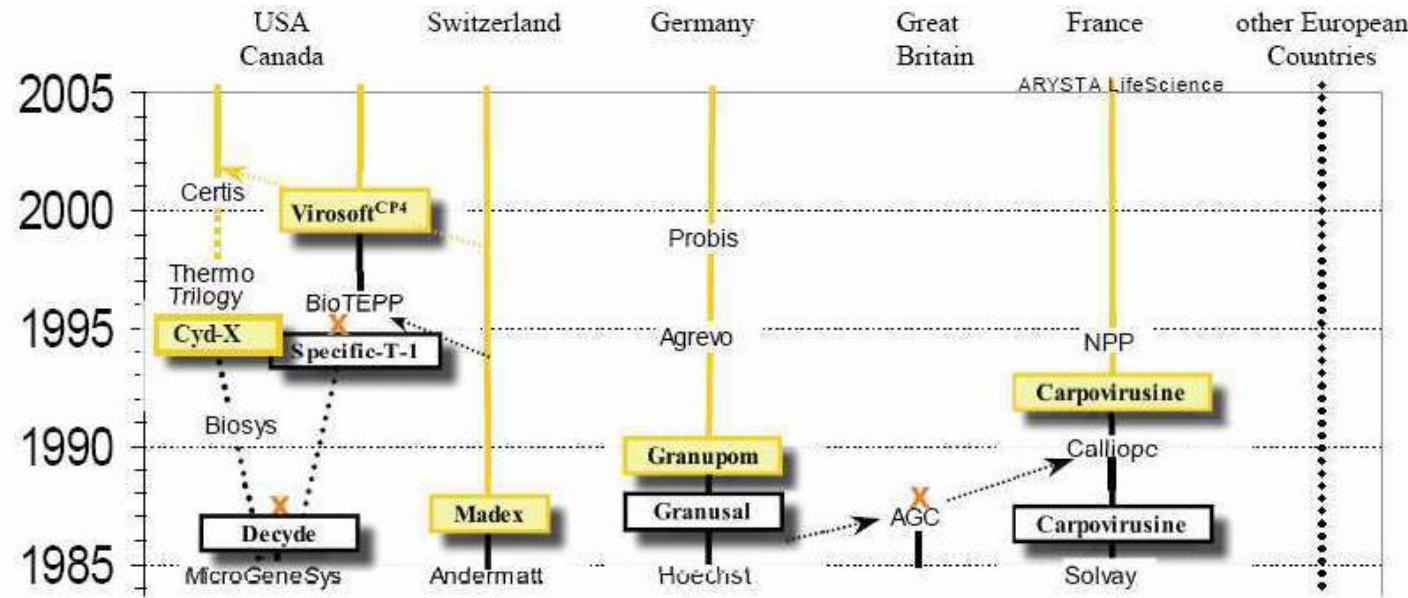
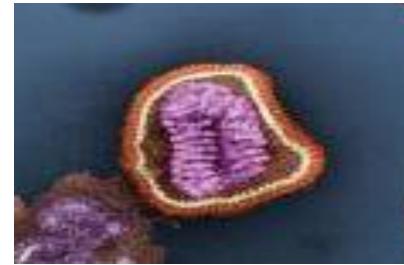


Photo I. Bornard

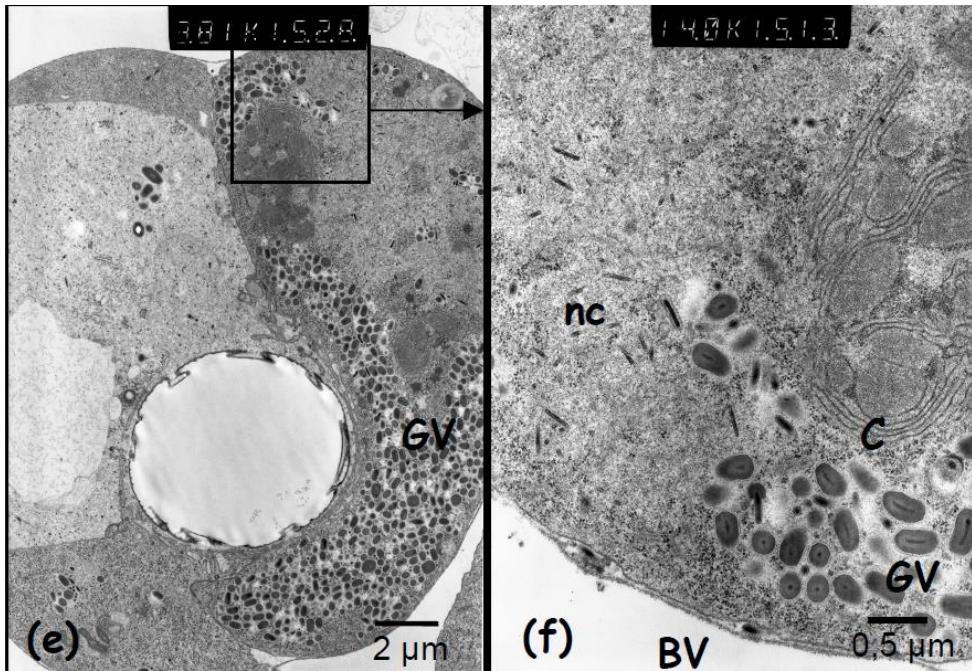


CpGV comme biopesticide

- Utilisé depuis 1992 comme bio pesticide
- Grande fréquence d'utilisation
(14 traitements par an)
- Utilisé rapidement après commercialisation du fait du peu de produit disponible en agriculture biologique



Le CpGV en quelques chiffres



Dose léthale 50 :

5 granules /larves

Durée d'incubation avant mort :

3 jours

Degré de spécificité :

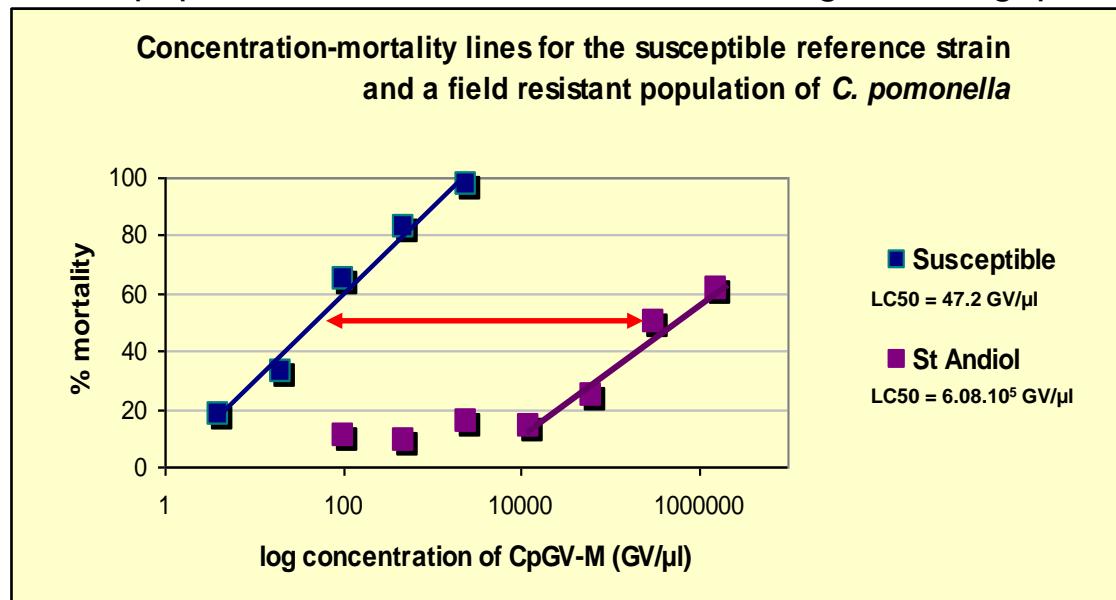
Bon

Les baculovirus



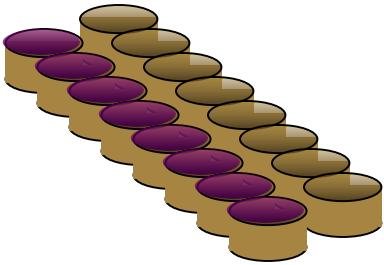
Virus de la granulose

Depuis 2004, détection de populations résistantes au virus en vergers biologiques



1^{ère} population résistante identifiée à St-Andiol (13):
Facteur de résistance = 13 000

Méthode d'évaluation de la sensibilité au Virus (Thèse de Marie Berling)



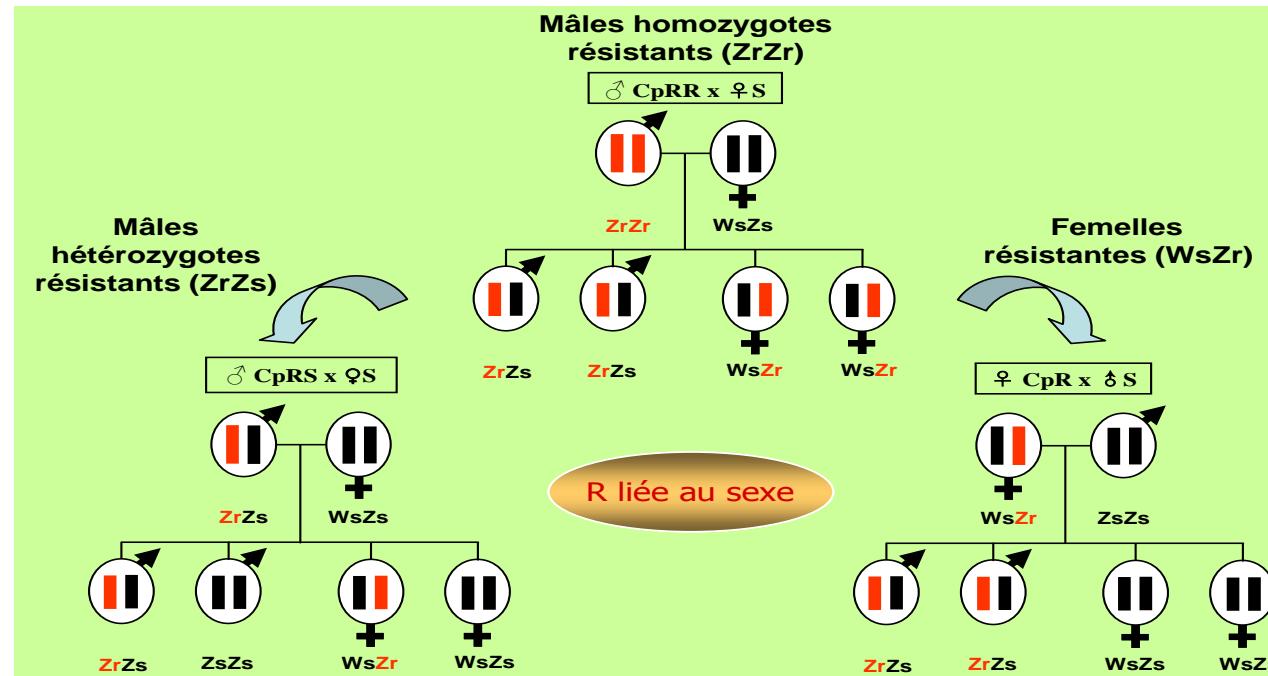
- Installation d'une larve par puits
(âgée de moins de 12h)
- Fermeture des puits à l'aide d'une bande de parafilm
- Microplaques de 96 puits remplies au $\frac{3}{4}$ avec du milieu artificiel (milieu soja Stonefly)
- Dépôt en surface de 6 µl de suspension virale



Résistance du carpocapse au virus de la granulose

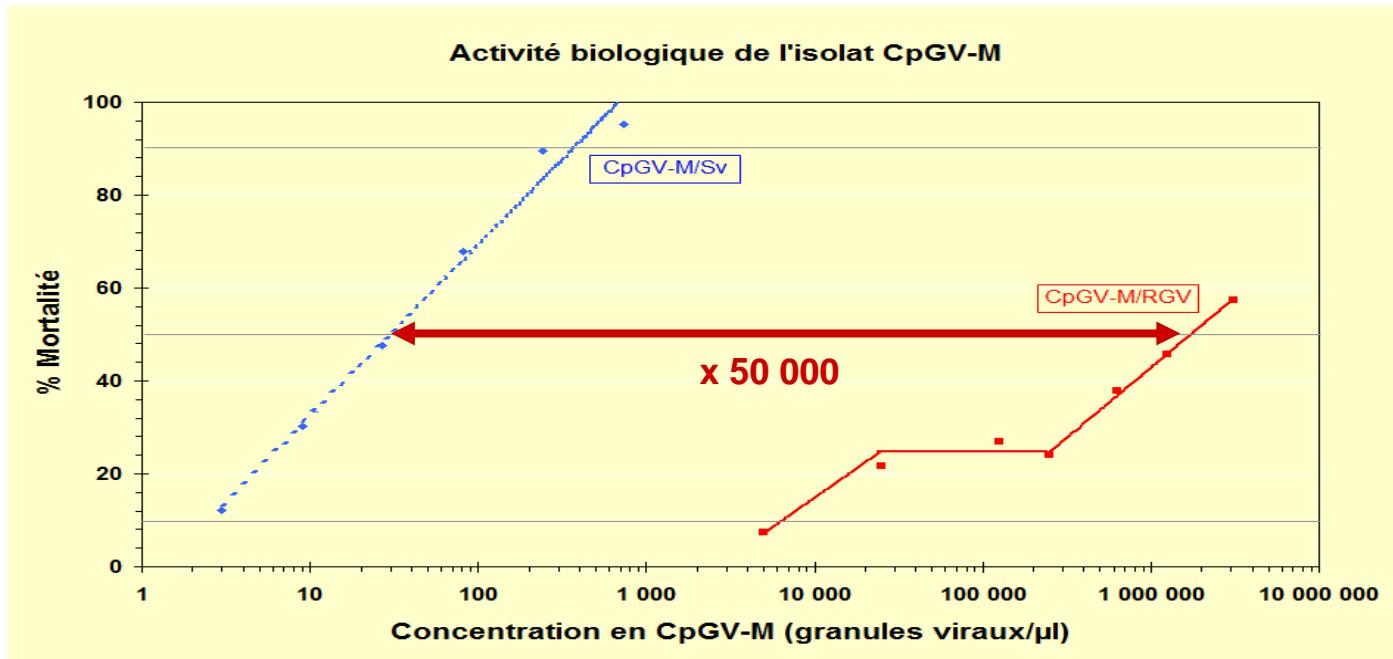
Caractérisation génétique de la résistance :

- Caractère dominant
- 1 seul gène majeur
- Allèle R porté par le chromosome Z



Résistance du carpocapse au virus de la granulose

Criblage des différents isolat viraux disponibles sur la colonie RGV8



Résistance du carpocapse au virus de la granulose

Criblage

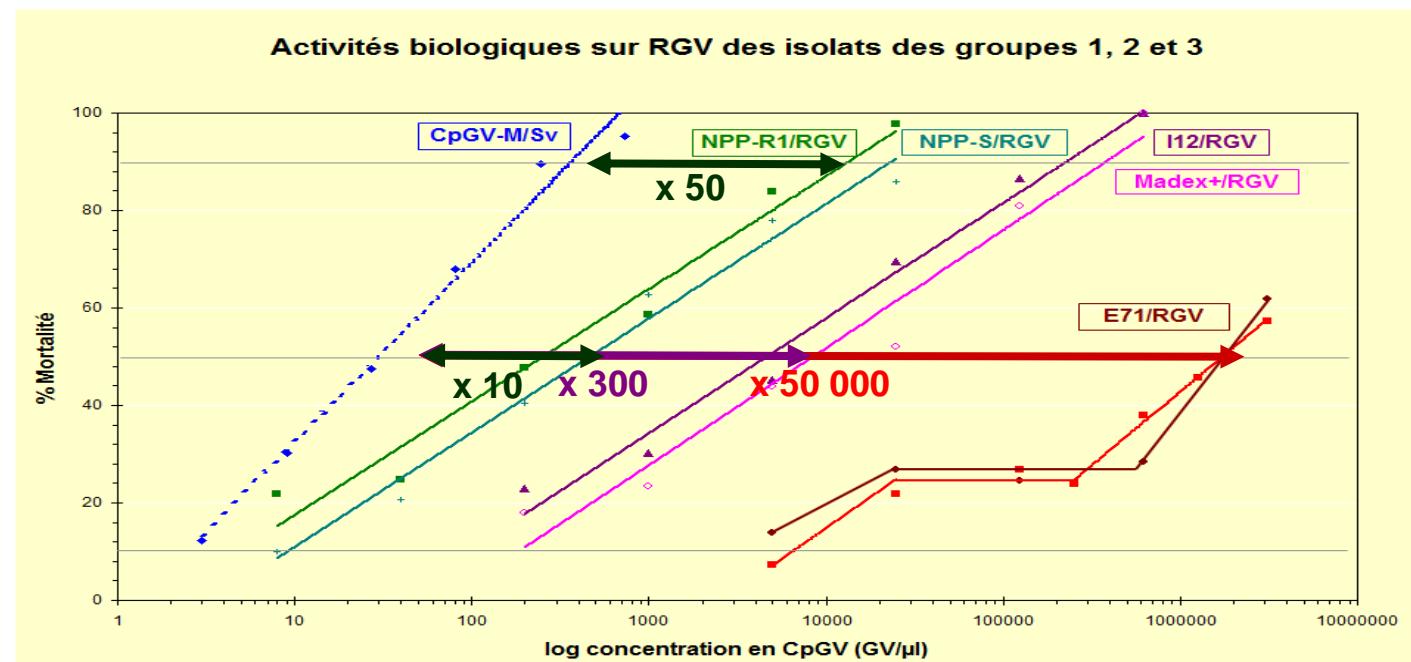
5 isolats de CpGV disponibles : E71, Madex+, I12, NPP-S et NPP-R1

Rapports de résistance :

➤ Groupe 1 :
x 50 000

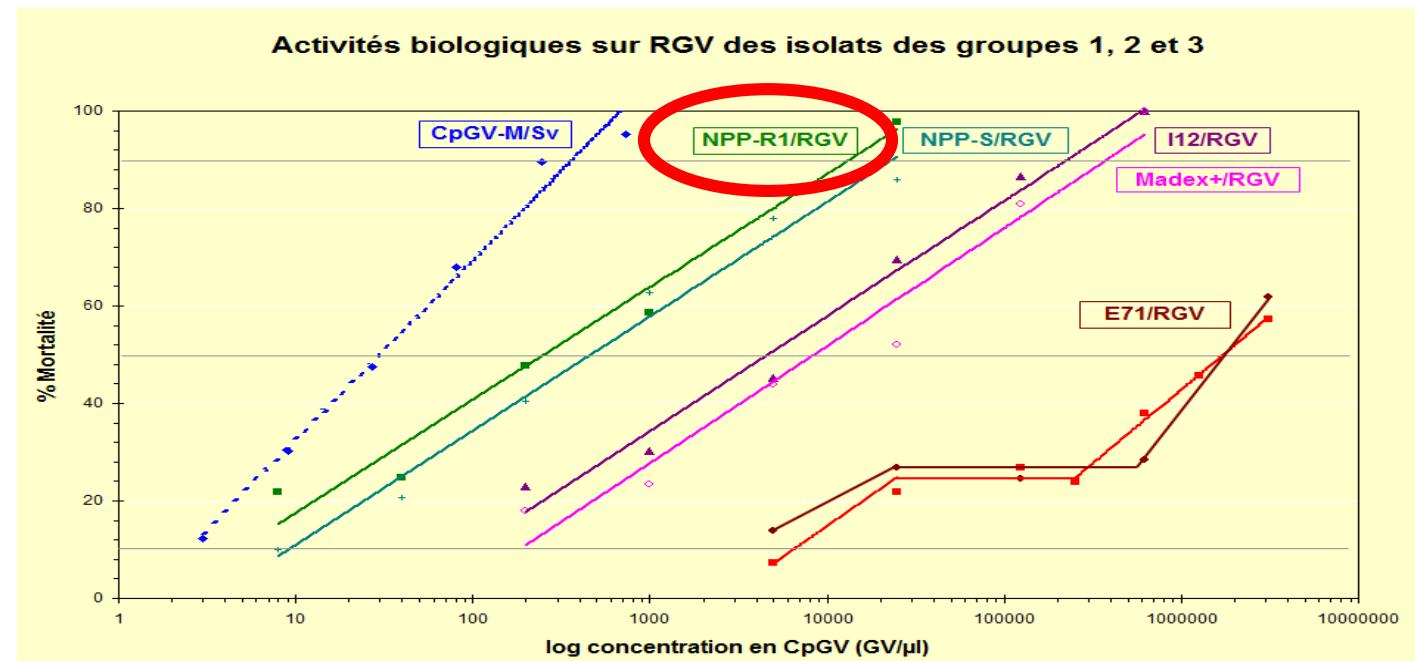
➤ Groupe 2 :
x 210-385

➤ Groupe 3 :
x 7-17



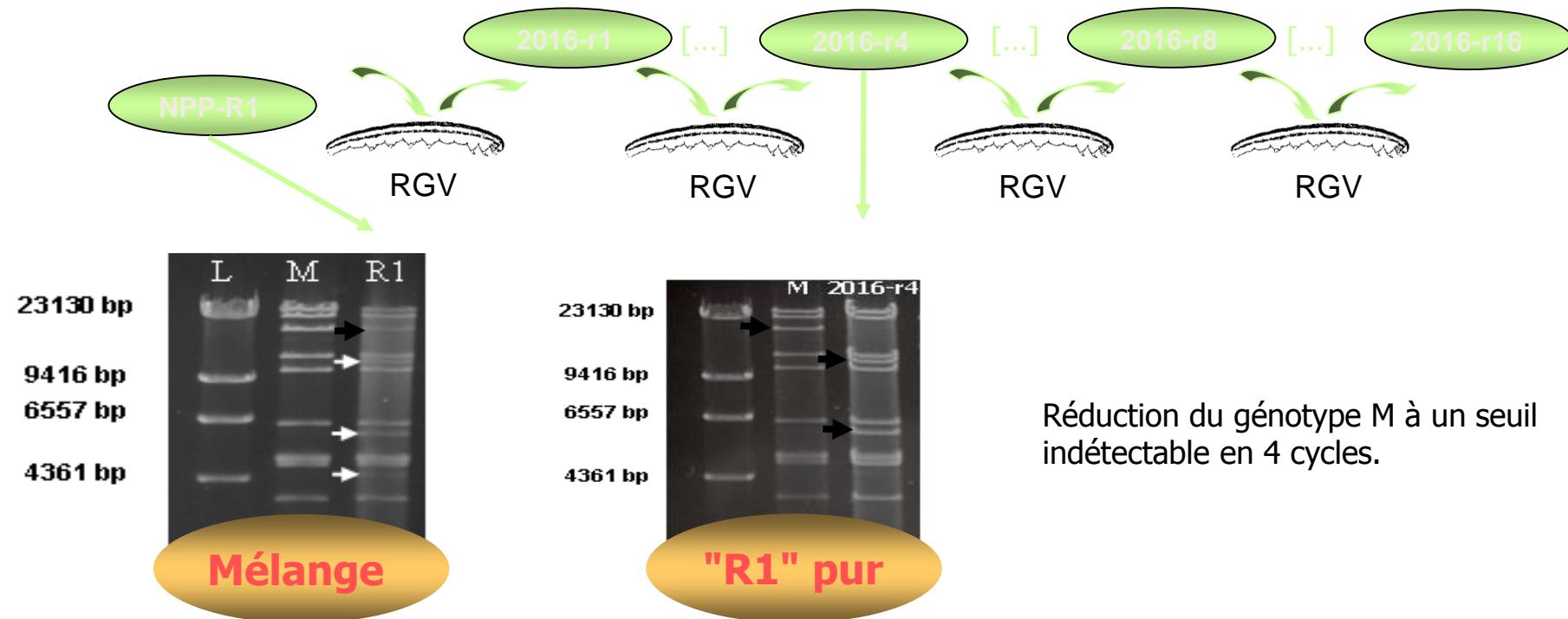
Résistance du carpocapse au virus de la granulose

NPP-R1: Le meilleur candidat pour le contrôle des populations résistantes au champ

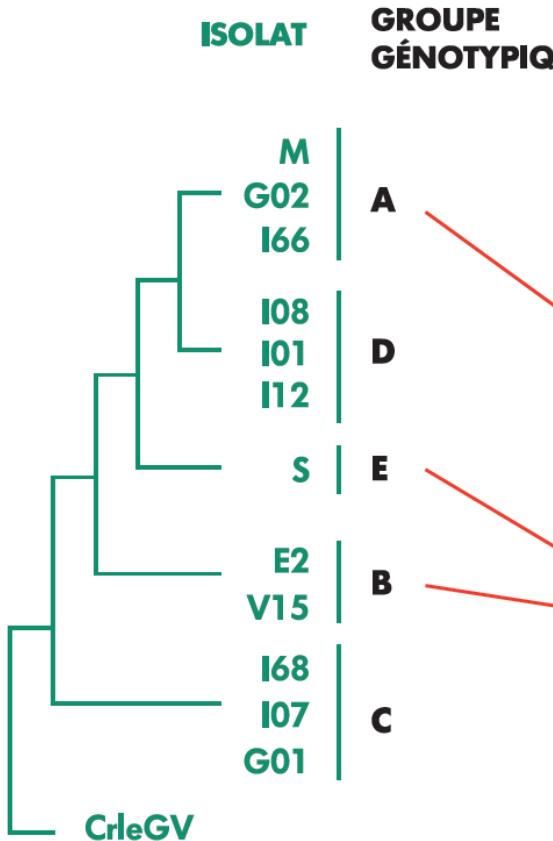


Résistance du carpocapse au virus de la granulose

résistantes



I 5 groupes génotypiques de CpGV mis en évidence



Grâce à l'**analyse moléculaire de leur génome**, et dans l'état des connaissances actuelles, il est désormais possible de **répartir les isolats connus de virus de la granulose en cinq groupes**, dénommés groupe A à groupe E (Gebhardt et al., 2014).

Les insecticides à base de virus disponibles en Europe étaient à l'origine constitués d'un même isolat viral d'origine mexicaine (CpGV-M), appartenant au groupe génotypique A.

Madex® Twin (groupe **A**) a bénéficié d'une sélection d'isolats spécifiques qui lui confère une **efficacité optimale contre le carpopophage ou la Tordeuse Orientale du Pêcher (TOP)**.

Madex® Pro dispose d'une base génétique inédite jusqu'à présent sur le marché, avec des **isolats provenant des groupes génotypiques B et E** (J.Jehle, non publié).

Gestion des résistances actuelle

LA RÉSISTANCE DE TYPE I



Elle est décrite pour la première fois en 2005, et concerne uniquement des **préparations virales relevant du groupe génomique A** (Gebhardt et al., 2014). La résistance de type I est **transmise par un gène dominant, localisé sur le chromosome Z du carpocapse** (Undorf-Spahn et al., 2012).

Les isolats des autres groupes B, C, D et E sont à même de surmonter la résistance de type I (Gebhardt et al., 2014).

LA RÉSISTANCE DE TYPE II



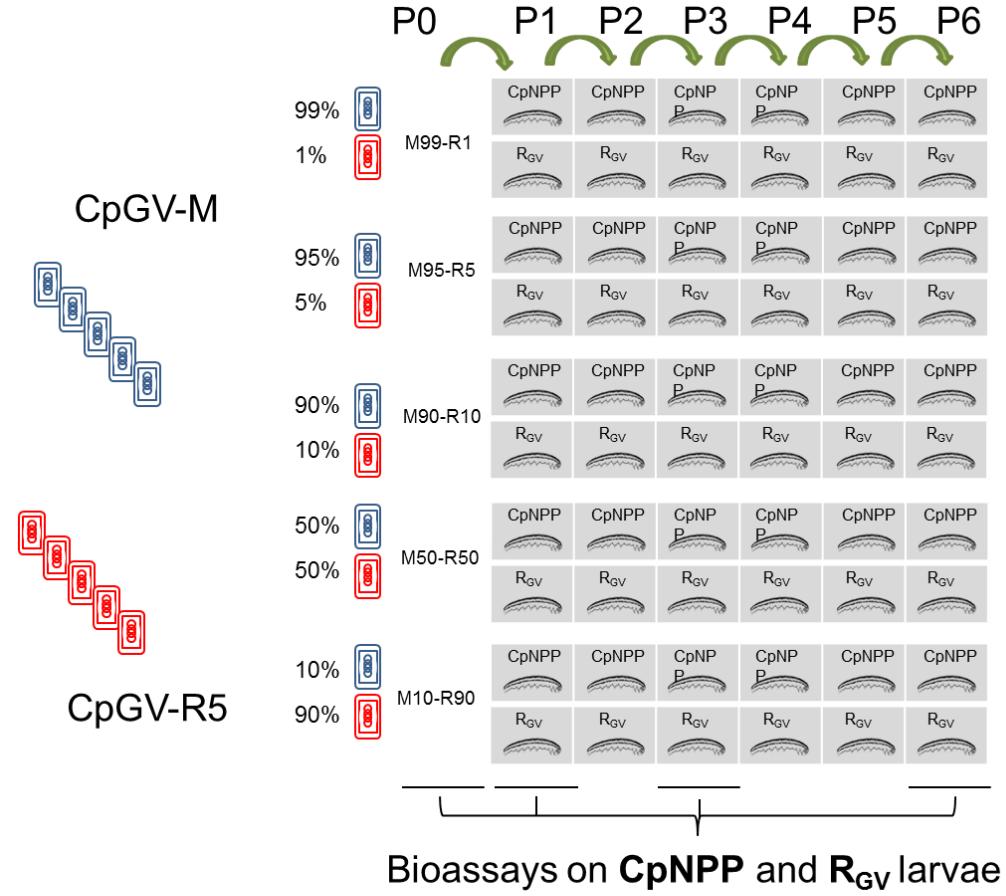
Elle a été identifiée à l'origine en Allemagne (Jehle et al., 2016). Ce type de résistance **se transmet également par un gène dominant, qui ne se situe pas sur le chromosome Z** (localisation précise à déterminer).

Le mécanisme de la résistance fait toujours l'objet de recherches. **Seuls les insecticides du groupe génomique B sont en mesure de surmonter cette résistance.**

C'est le cas de Madex® Pro.

Deuxième thèse sur les mélanges viraux (B. Graillot)

- Y a-t-il un intérêt à travailler sur des mélanges viraux (augmenter la durabilité) : entraide ou compétition ?
- Que se passe t il quand on mélange différents génotypes viraux ?
- Comment rendre cette méthode de lutte plus durable ?



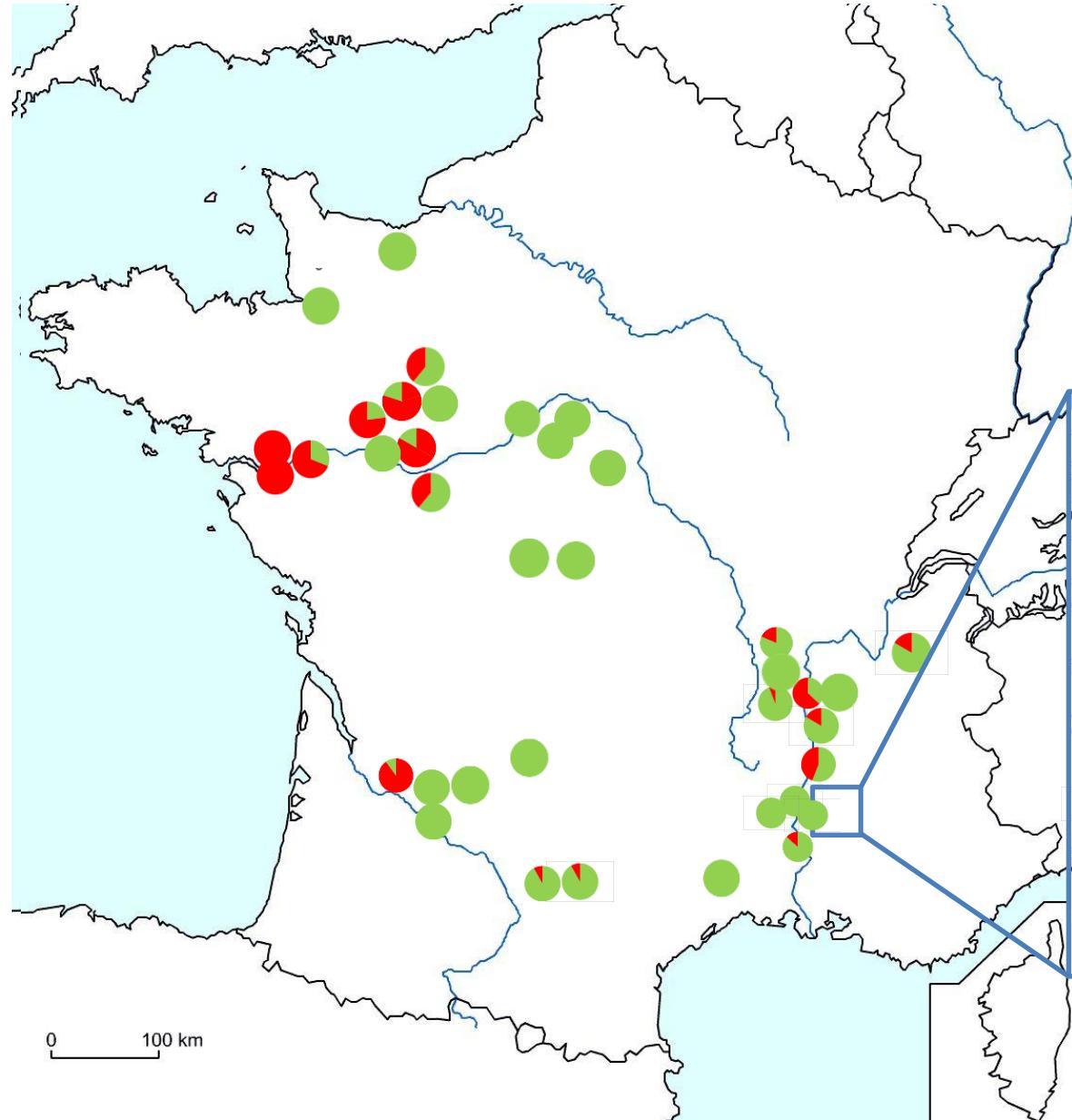
Sandrine MAUGIN
Myriam SIEGWART
Anaïs HERRIAU
Lucile BLOUQUY
Aurélien DUCOUX
Béatrice COLLANGE
Sylvie KOROWNIKOFF

BILAN 2019 SURVEILLANCE DU TERRITOIRE

VIRUS DE LA GRANULOSE

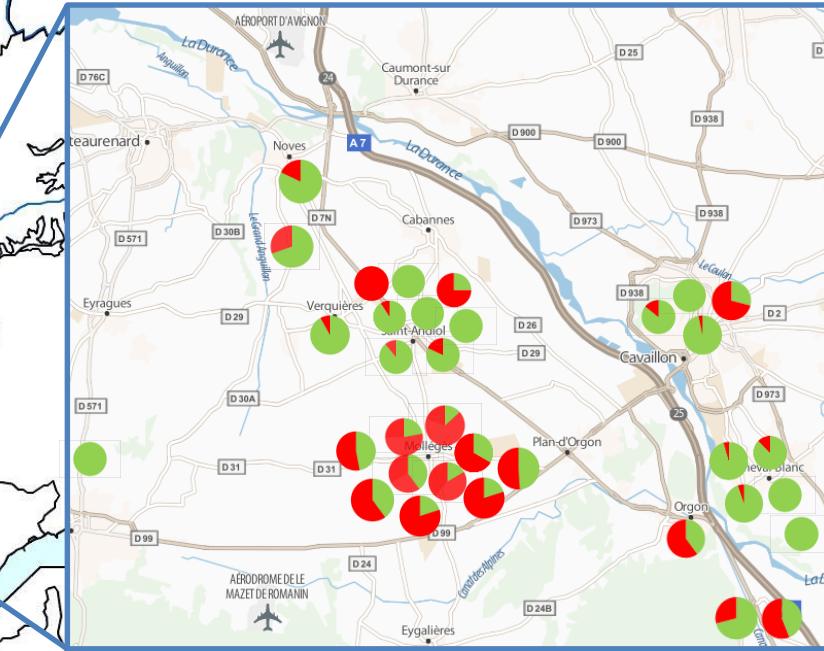
12 ans de surveillance

CPGV-M ET V22



72 pop
12 ans

% d'individus résistant à 6250
PV/ μ l = dose discriminante



Anthranilic diamide

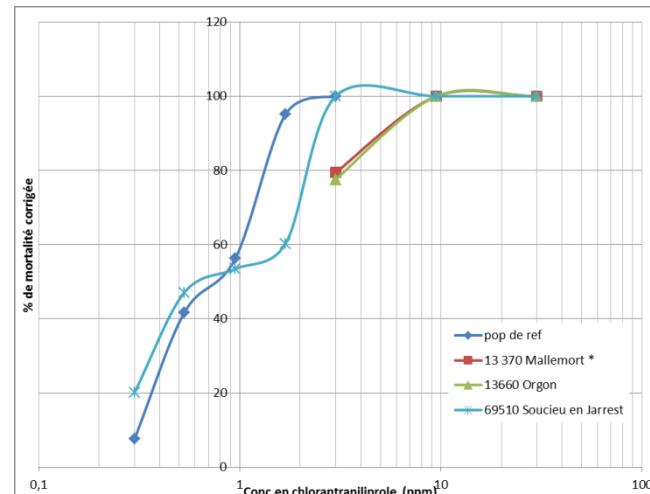
CHLORANTHANILIPROLE

Sensibilité à la dose discriminante

Année test	Population	nb Témoins	nb testé à 3 ppm	Mortalité corrigée (%)	KH12/SS Corr. Yates	Signif.
2017	Pop référence	99	24	95,3	0,0	-
	13 370 Mallemort *	120	24	36,8	171,3	***
	84 300 Cavaillon	54	26	35,7	192,4	***
2018	Pop référence	14	24	100,0	0,2	-
	13 370 Mallemort *	28	24	79,4	93,0	***
	13660 Orgon	13	29	77,6	134,3	***
	13370 Mallemort	49	24	100,0	0,2	-
	69510 Soucieu en Jarrest	36	23	100,0	0,2	-

Multi-résistante:
 CpGV-M
 Phosmet
 Thiachlopride
 Chlorantraniliprole

Arrachage de la parcelle 2017

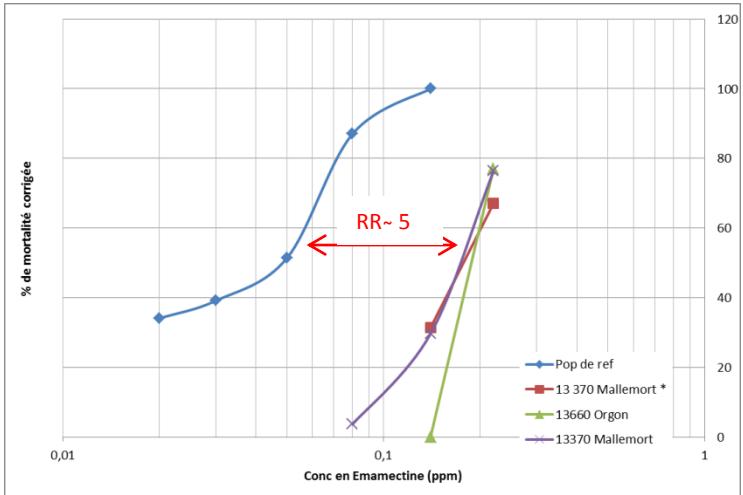


Part de la population de Cavaillon pour faire une souche de laboratoire

Autres familles chimiques

EMAMECTINE TÉBUFÉNOZIDE FÉNOXYCARBE

Pop 2016 analysées en 2017



Population
13 370 Mallemort

Produit	nb Témoins	nb testé à DL 98	Mortalité corrigée (%)	KHI2 /SS Corr. Yates	Signif.
Tébufénozide	40	40	55,56	367,66	***
Fénoxycarbe	40	40	44,44	585,35	***

Application topique sur larves
diapausantes

Même protocole que précédemment

Différences significatives de sensibilité pour ces trois produits.
A FAIRE -> analyse plus approfondie pour calcul des DL50

LE CAS DU CARPOCAPSE DANS LE MONDE



Familles d'insecticides	Insecticides (Matières actives)	Résistances croisées	Localisations
Carbamates (1A)	Sevin (Carbaryl)		ES
Organophosphorés (1B)	Guthion (Azinphos-méthyl†) (Chlorpyrifos) (Phosalonet†)	Acétamipride (4A) δ-méthrine (3A) Diflubenzuron (15)	AR, CA, CH, EC, ES, FR, MO, ON, QC, SZ, UT, WA
	Imidan (Phosmet)		MI
Pyréthrinoïdes et pyréthrines (3A)	Matador (λ -cyhalothrine) Decis (δ -méthrine)	Azinphos-méthyl† (1B) Diflubenzuron (15) Phosalonet† (1B)	MI ES, CH, FR
Néonicotinoïdes (4A)	Assail (Acétamipride) Calypso (Thiaclopride)	Azinphos-méthyl† (1B)	AR, WA, AK, ES, QC, TU
Avermectines et milbémycines (6)	(Émamectines)		FR
Benzoylurées (15)	(Diflubenzuron)	Tébufénozide (18)	EC, ES, FR, IT, OR
Dyacylhydrazines (18)	Intrepid (Méthoxyfénazole) Confirm (Tébufénozide)	Azinphos-méthyl† (1B) Diflubenzuron (15)	MI, QC CH, FR
Virus	CpGV		GE

Dysaphis plantaginea

- Puceron cendré du pommier = puceron rose
- Dégâts sur pommier uniquement (dégâts directs)
- Hôte secondaire : plantain
- Flonicamide : inhibition de la prise alimentaire



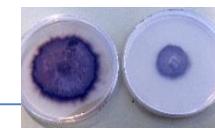
Dysaphis plantaginea © INRA, Bernard Chaubet



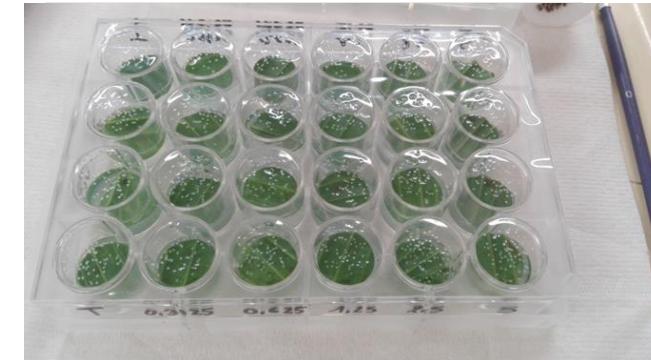
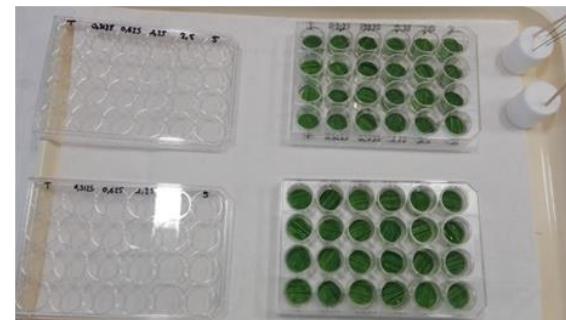
Dysaphis plantaginea © INRA, Bernard Chaubet



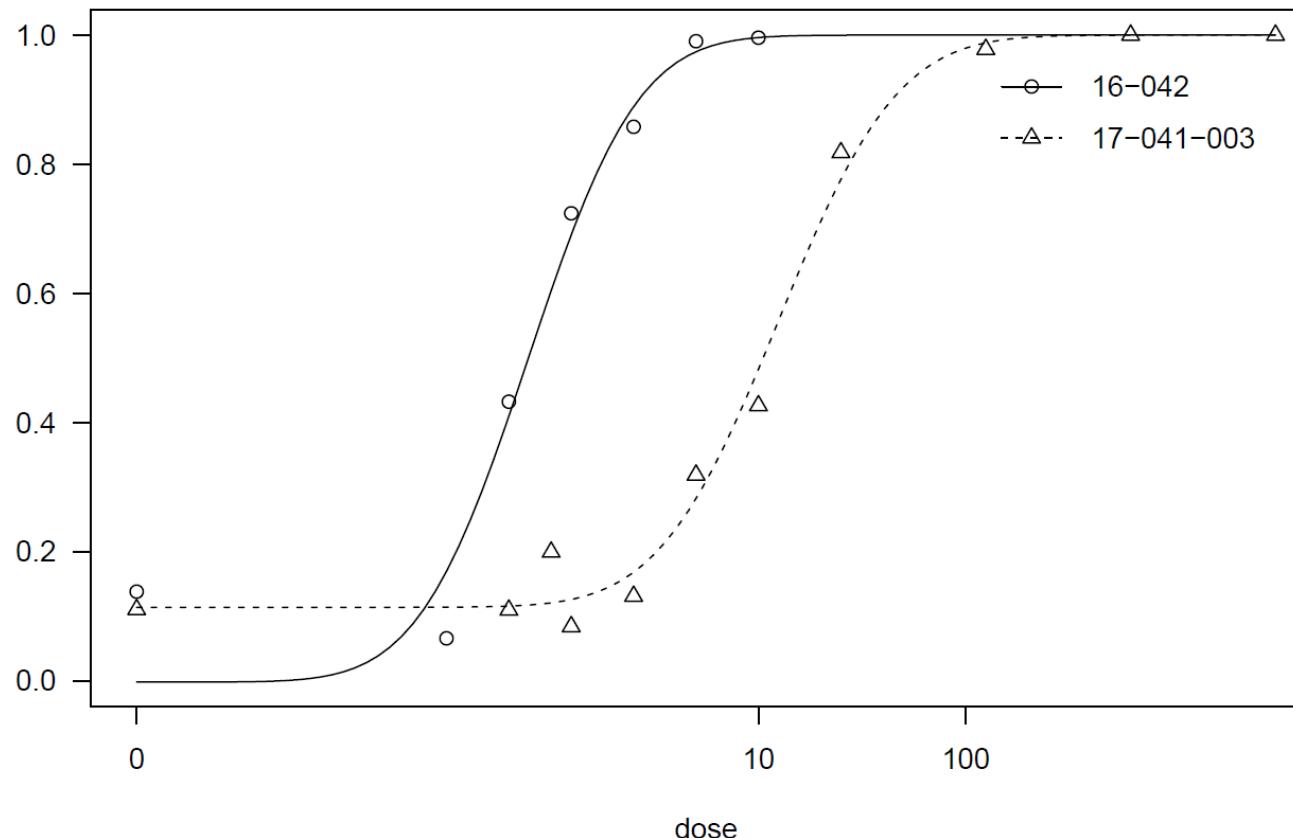
Mise au point d'un test biologique



- Inspiré d'une méthode IRAC, adaptée pour *Dysaphis*
- Test par contact et ingestion, exposition 120h



Des signes de dérive de sensibilité



$DL50_{16-042} = 0,78 \text{ mg/L}$

$DL50_{17-041-003} = 6,8 \text{ mg/L}$

→ $FR=8,7$

Nombre d'échantillons reçus :

- 2 échantillons en 2016
- 6 échantillons en 2017
- 3 échantillons en 2018

→ Un clone de 2017 en dérive de sensibilité

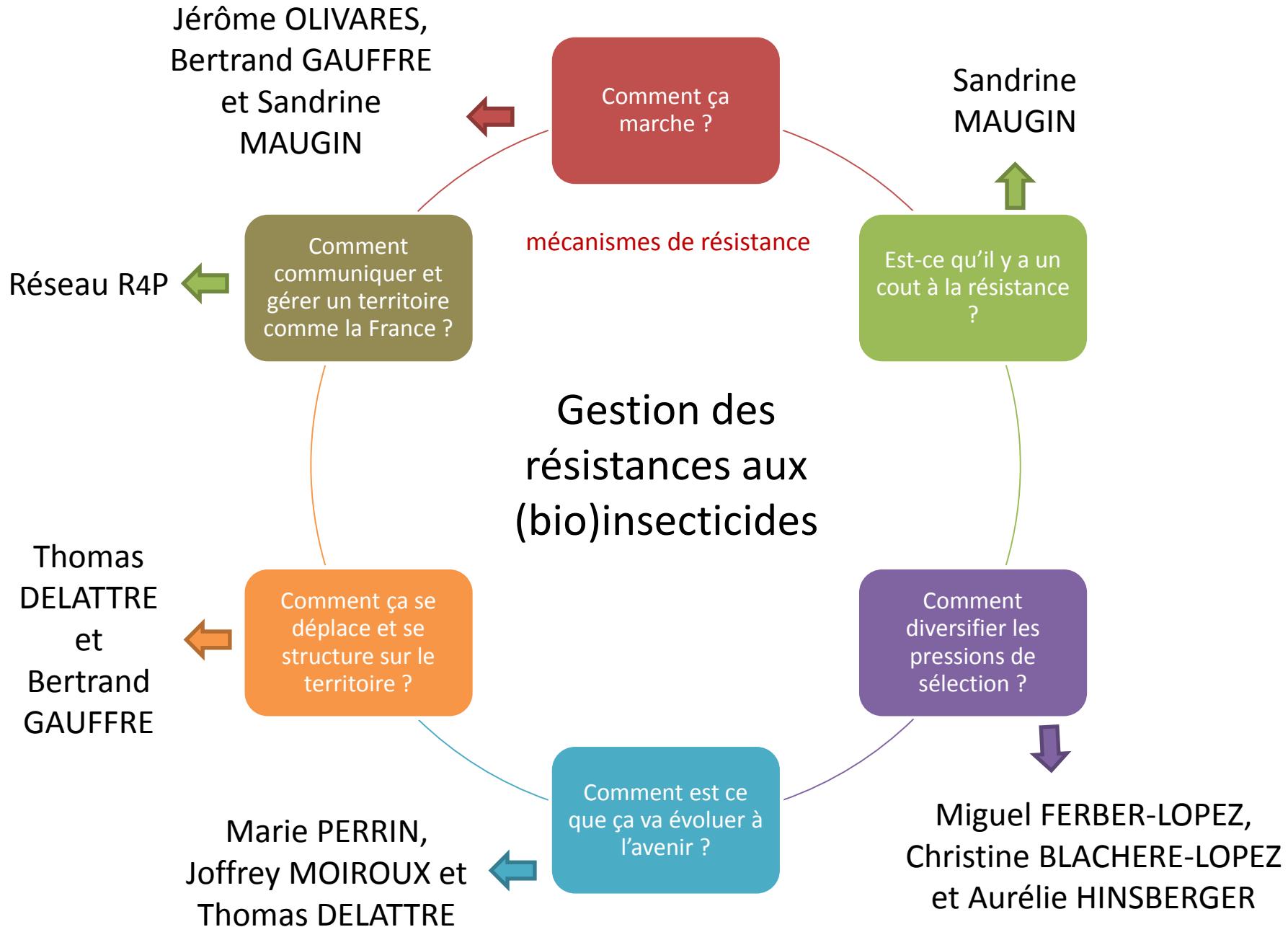
→ Mise au point d'une méthode pour utiliser une dose discriminante



Remerciements à toute l'équipe

Myriam SIEGWART
Sandrine MAUGIN
Jérôme OLIVARES
Bertrand GAUFFRE
Thomas DELATTRE
Marie PERRIN
Aurélie HINSBERGER

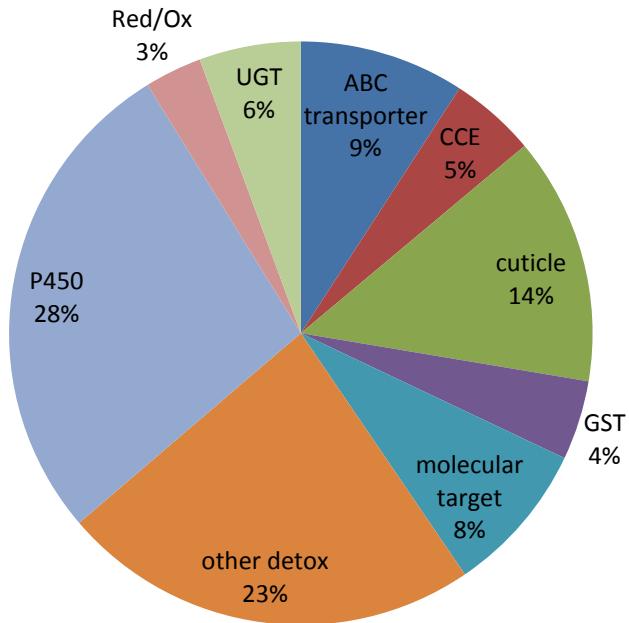
LA RECHERCHE SUR LES RÉSISTANCES AUX (BIO)INSECTICIDES



Comment ça
marche ?

Mécanismes de résistance aux (bio)insecticides chez le carpocapse des pommes

Candidate genes (568)



Comparaison séquences de ces gènes entre ind sensible et résistant + de 10 000 de variations de séquences... Approche statistique GWAS

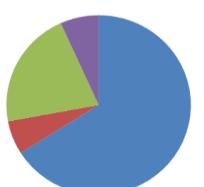
Qqs résultats prometteurs ...

Mutation sur un récepteur muscarinique

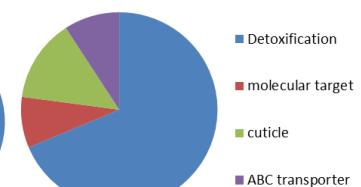
Mutation dans un récepteur à Octopamine

Mutations dans le promoteur d'une P450

Aedes aegypti



Cydia pomonella



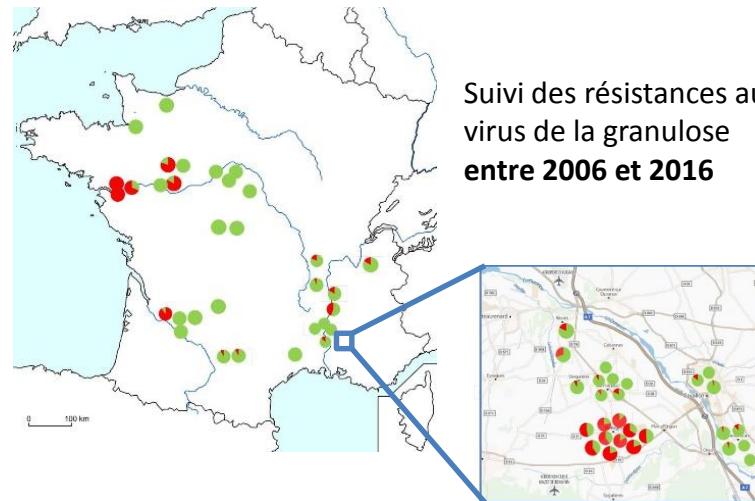
... ce n'est qu'un début

Améliorer la surveillance des résistances en populations naturelles



Méthode classiquement utilisée: Bio-tests

- **Longs** => près d'un an pour avoir les résultats d'une population
- **couteux** => besoin de conduire un élevage en insectarium [1500 Euros / pop]
- **Imprécis** (fréquence des résistance) et impossibles quand peu de matériel biologique
- Une seule molécule à la fois



Améliorer la surveillance des résistances en populations naturelles

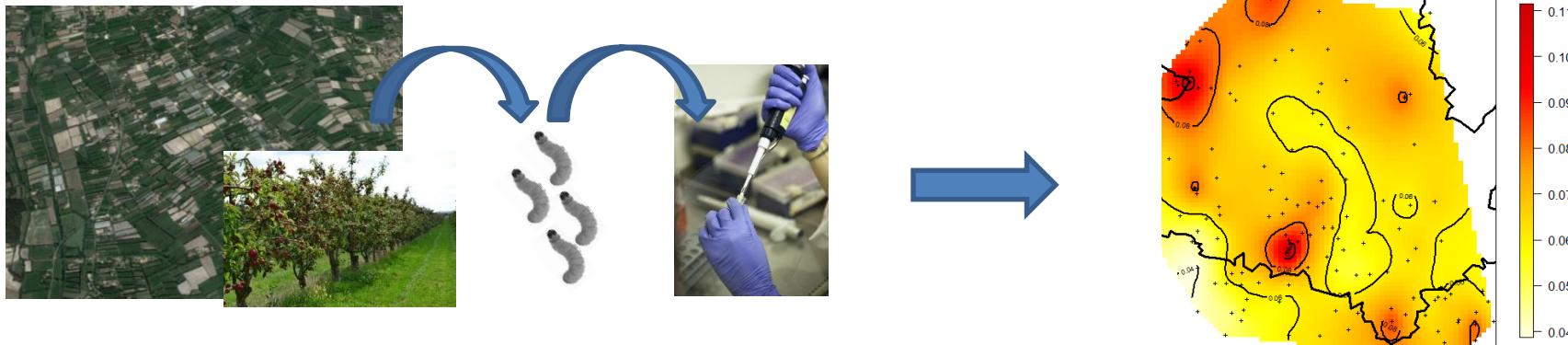


Kit de détection moléculaire des résistances

- Rapide: résultats quasi immédiats
- Economique : <50 Euros / pop = 30 x moins cher
- Précis (à l'individu), bonne estimation des fréquences des résistances



Suivis d'un très grand
nombre de parcelles



⇒ Nécessite de connaître les bases génétiques des résistances,
lien génotype - phénotype

Exemple: Mutation KDR / super KDR

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Multiple Origins of the Sodium Channel *kdr* Mutations in Codling Moth Populations

Pierre Franck*, Myriam Siegwart, Jerome Olivares, Jean-François Toubon, Claire Lavigne

INRA, UMR115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Avignon, France

Abstract
Resistance to insecticides is one interesting example of a rapid current evolutionary change. DNA variability in the voltage-gated sodium channel gene (*transmembrane segments 5 and 6 in domain III*) was investigated in order to estimate resistance evolution to pyrethroid in codling moth populations at the World level. DNA variation among 38 sequences revealed a single nucleotide polymorphism (SNP) at position 304 (0.104%) involving a missense mutation which encodes several convergent substitutions. The analysis of codling moth samples from 52 apple orchards in 19 countries using a simple PCR-RFLP confirmed that this *kdr* mutation is almost worldwide distributed. The proportions of *kdr* mutation were negatively correlated with the annual temperatures in the same regions. Heterozygous *kdr* genotypes in the French apple orchards showed lower Pectin Cytolytic Enzyme (PCE) activities than other genotypes. The most plausible interpretation of the geographic distribution of *kdr* in codling moth populations is that it has both multiple independent origins and a spreading limited by low temperature and negative interaction with the presence of alternative resistance mechanisms to pyrethroid in the populations.

Objectifs de recherche



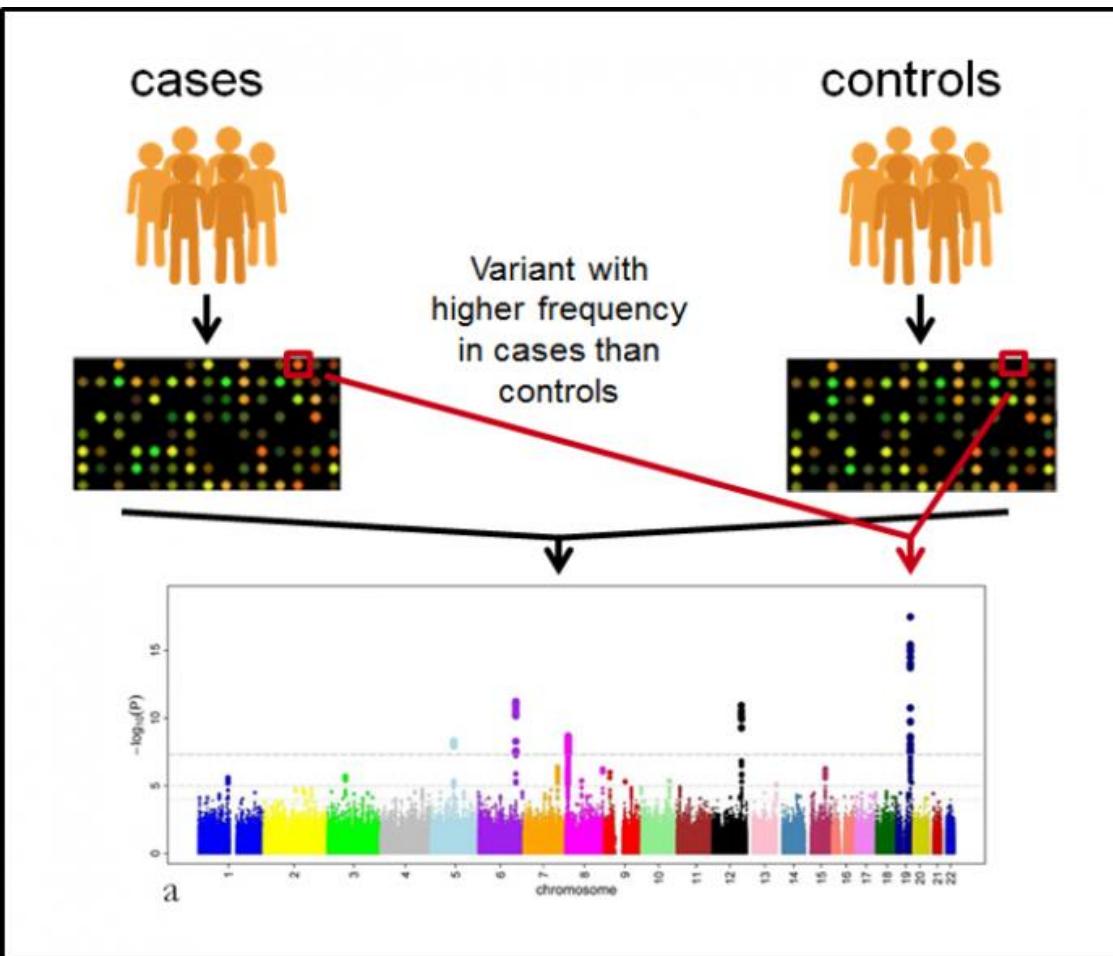
- Mieux appréhender la complexité des résistances dans les populations sauvages
 - 1) Identifier les bases génétiques des résistances aux (bio)pesticides
 - Identifier les loci porteurs des allèles associés aux résistances
 - Architecture génétiques des résistances / Résistances multiples / combinaisons de résistances
 - 1) Mieux connaître la dispersion et la dynamique spatio-temporelle des résistances = déterminer l'échelle spatiale à laquelle implémenter la surveillance et les mesures de contrôle
 - 2) Développer un kit de détection des résistances

⇒ **Génomique des populations (dans l'espace)**

Un génome récemment séquencé / assemblé et annoté (chine + CBC: 600 Mb / 0.3-0.6 ht)

1) Identifier les bases génétiques des résistances

Principe du GWAS



-> même background génétique

-> plusieurs répliques

3) Kit de détection moléculaire et validation sur pop naturelles

- Projet INRA – SPE 2018 (déposé)
- Thèse INRA-ANSES (déposé)

=> Mise au point du kit

- Sélectionner une série de SNP associés aux résistances identifiés i) dans la littérature et ii) via le Pool-GWAS
- Méthode haut débit, e.g. KASP (Kompetitive Allele Specific PCR)

=> Test sur populations naturelles échelles locale et régionale

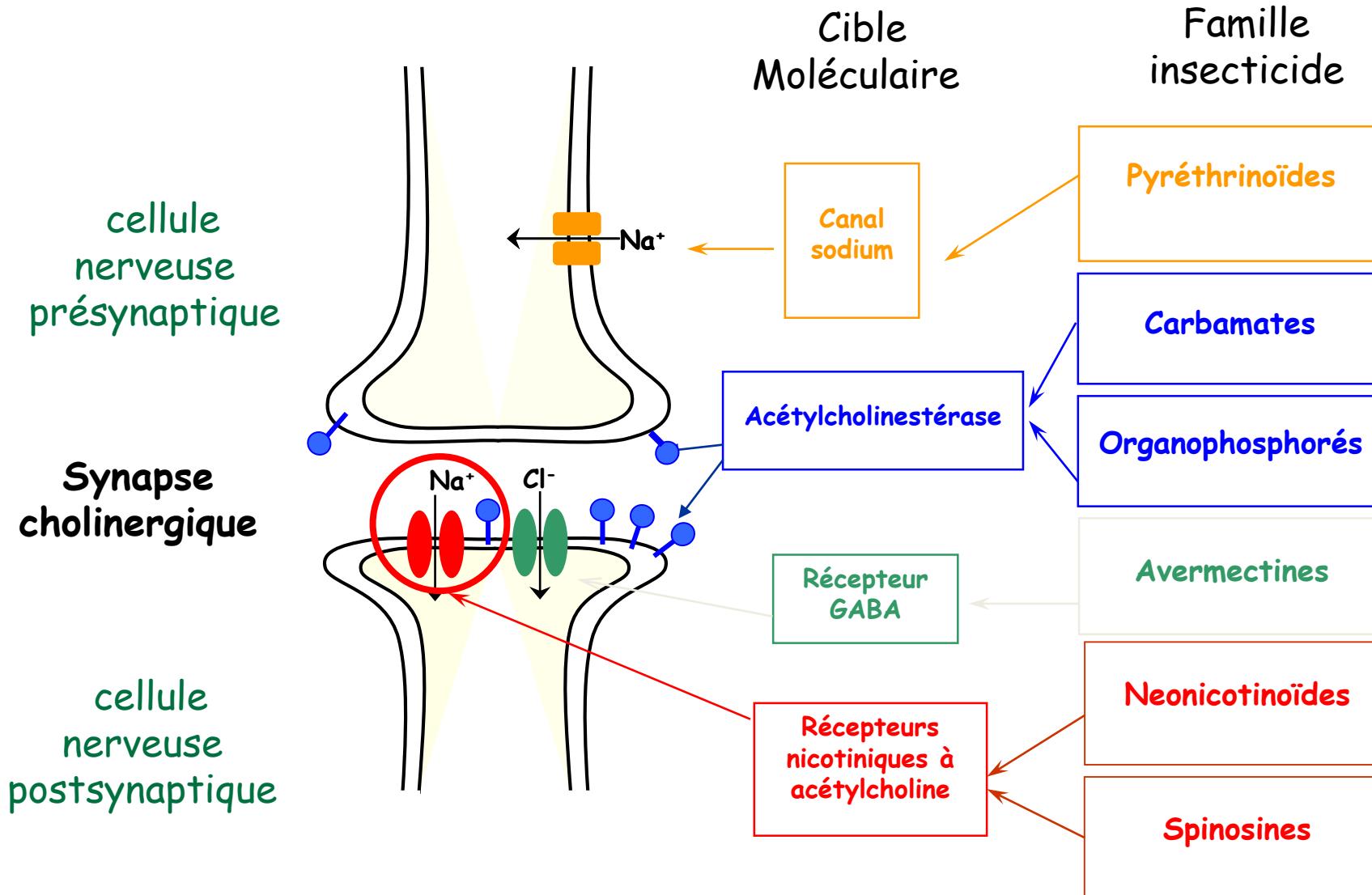
- En PACA + zoom Zone 13
- Eté 2020, plusieurs centaines de parcelles

=> Comment transférer les résultats de cet outils aux producteurs et favoriser une gestion collective des résistances à l'échelle du paysage?

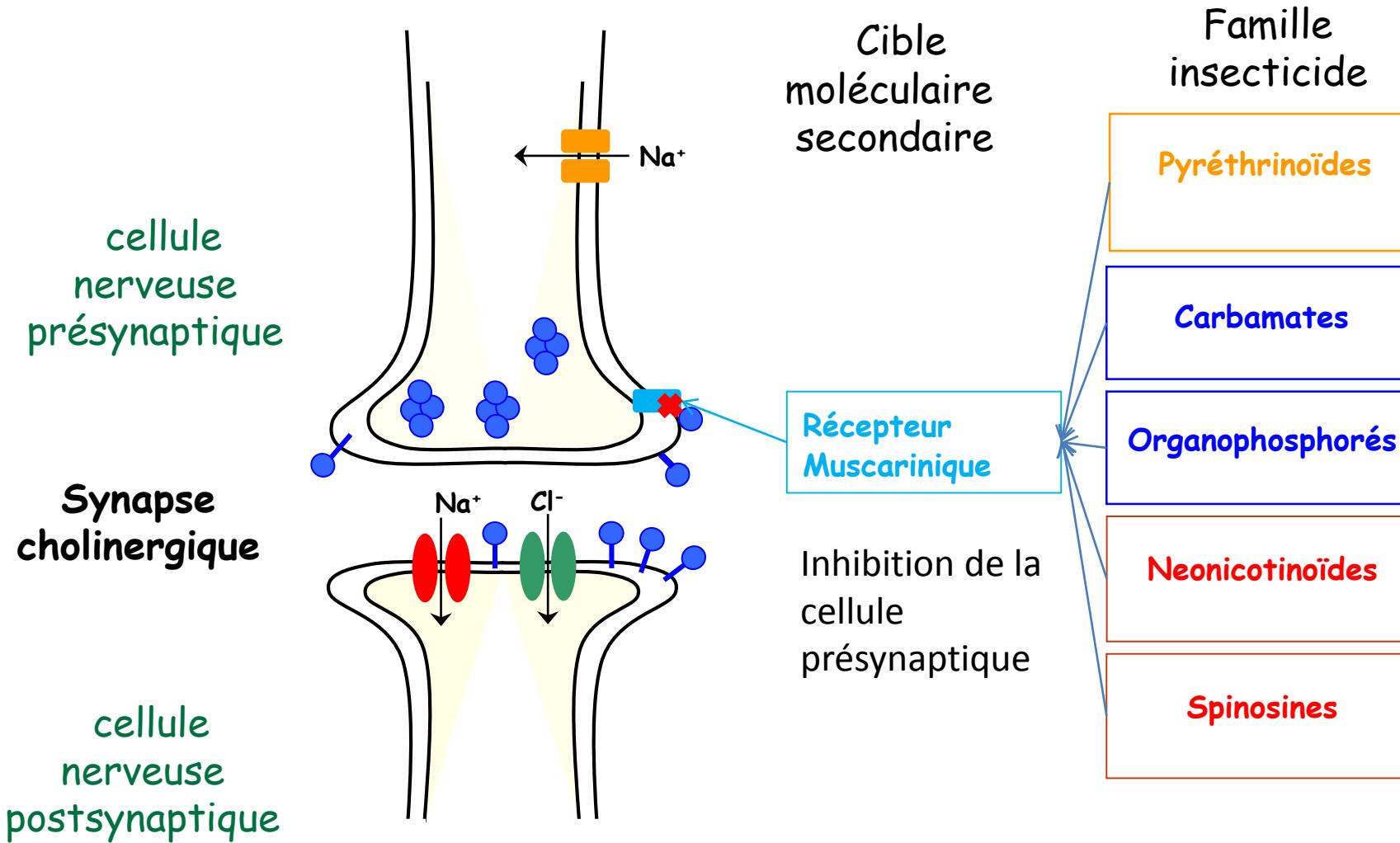
- Identifier et évaluer des leviers individuels et collectifs pour accompagner gestion territoriale des résistances (gestionnaires?)
- Co-construire l'organisation de la surveillance et du transfert des connaissances

- Projet Ecophyto2 (en réflexion)

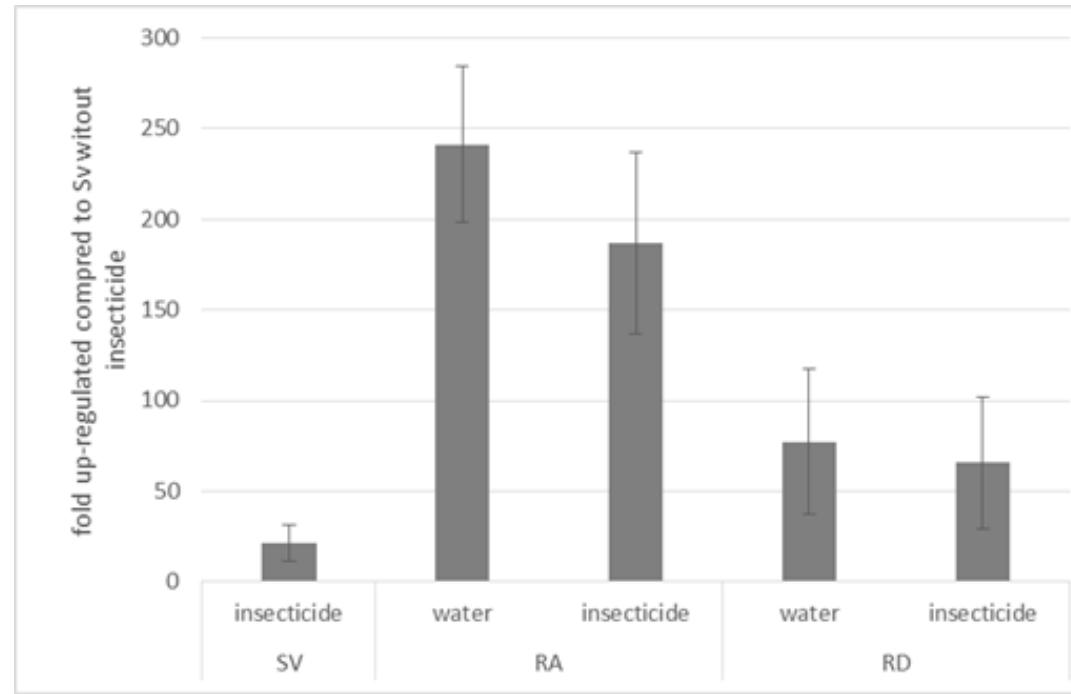
Cibles des insecticides neurotoxiques



Le récepteur muscarinique une cible moléculaire secondaire



Une oxygénase fortement surexprimée dans nos souches résistantes



MERCI DE VOTRE ATTENTION