

Résistances aux insecticides chez *Frankliniella occidentalis*, *Drosophila suzukii* et autres ravageurs d'intérêts

Exemples concrets de résistances en France

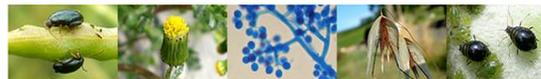
contact-r4p@inra.fr

www.inra-r4p.fr

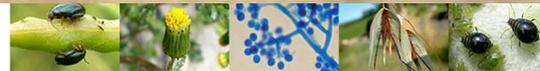
 @R4P_network

Myriam SIEGWART

Myriam.siegwart@inra.fr

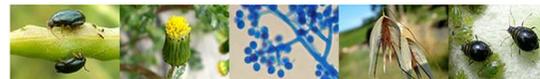
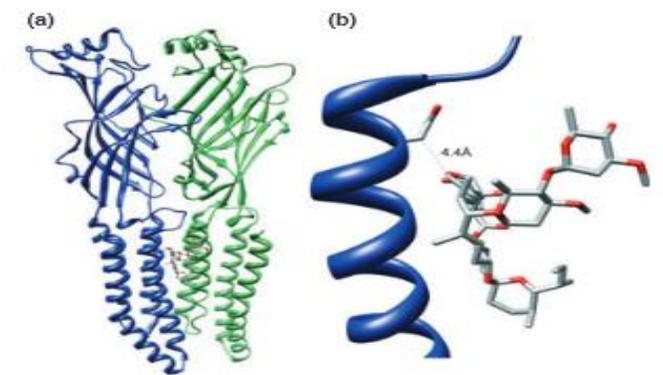


Le Thrips californien (*Frankliniella occidentalis*)



Thrips / Spinosad

- Insecte de très petite taille
- 500 plantes hôtes dont de nombreuses cultures d'arbres fruitiers et de plantes maraîchères et ornementales
- Insecte connu pour avoir développé des résistances à beaucoup de familles chimiques différentes : OC, OP, pyréthrinoïdes et spinosad
- Résistance au spinosad bien documenté en Espagne, Brésil et Chine
- Description d'une mutation (G275E) dans la cible moléculaire : nAChRs
- Grands problèmes d'efficacité de ce produit en France depuis quelques années
- Décision de la DGAL de mettre en place une méthode de détection à partir de 2014



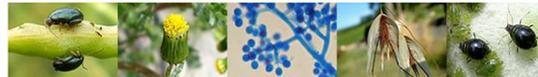
Un modèle complexe

Petite taille des individus limite les possibles:

- Difficulté à confiner -> problèmes de suivi qualité des élevages de populations
- Biotests difficiles car manipulation très minutieuse

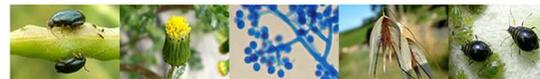
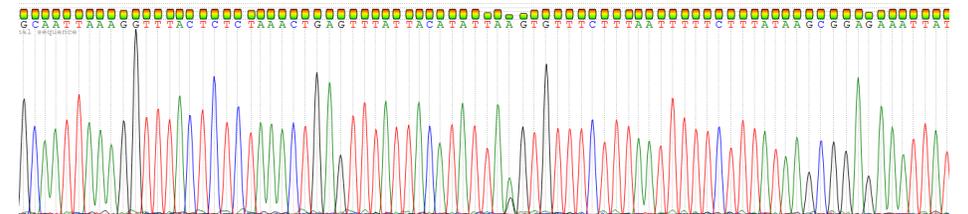
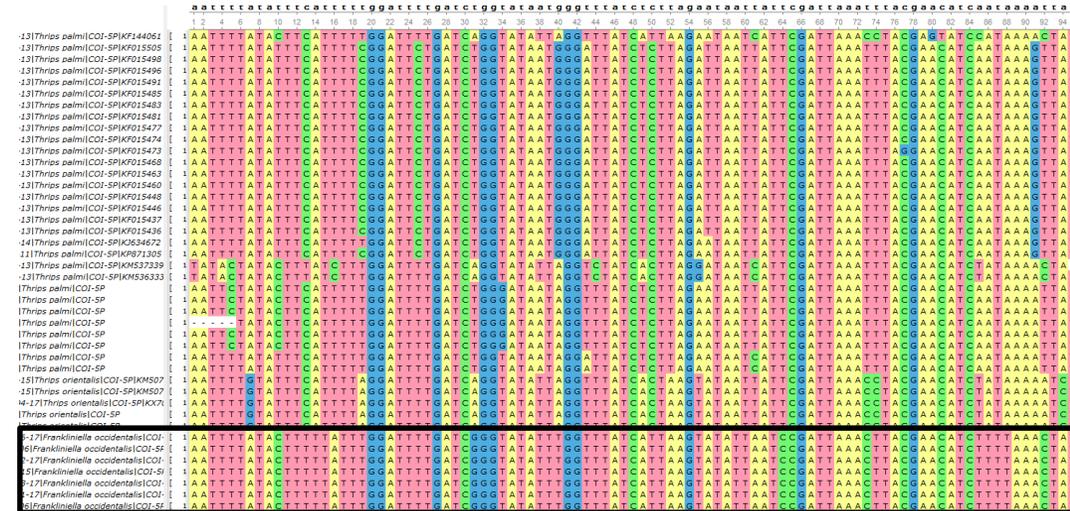
Choix de faire une recherche de la mutation de cible connue par techniques de biologie moléculaire :

- 1^{ère} étape : trouver cette mutation en France et avoir des séquences de références sensibles et résistantes
- 2^{ème} étape : choisir le bon outil moléculaire pour détecter cette mutation à haut débit
- 3^{ème} étape : mettre au point une méthode permettant de travailler à l'individu (extraction d'ADN individuelle)



Détecter la mutation en France

- Récupérer les bon échantillons :
 - Plusieurs essais dans les méthodes d'échantillonnage (panneaux bleux, phéromone, prélèvement sur fruits, frappages): choix du frappeage
 - Thrips souvent mélange d'espèces: communication sur les caractéristiques morphologiques de cette espèce – amplif COI
 - Envoi facilité par la méthode choisie : dans l'alcool
- Extraire suffisamment d'ADN pour pouvoir séquencer :
 - Premier temps pool d'individus pour tester les amorces
 - Puis extraction individuelle avec des kits commerciaux (couteux)
 - Envoie à prestataire pour obtention séquences



Détecter la mutation en France

Nos séquences de référence

Mutation G275E
Génotype mutant (49-001-12)
Génotype hétérozygote (18-45-0)
Génotype sensible (18-45-01)

```
AGTAAACCTTTAATTGCAACCTTAGAACTGGCACTACCTAAGATCGGCCA  
AGTAAACCTTTAATTGCAACCTTAGAACTGGCACTACCTAAGATCGGCCA  
AGTAAACCTTTAATTGCAACCTTAGAACTGGCACTACCTAAGATCGGCCA
```

Mutation G275E
Génotype mutant (49-001-12)
Génotype hétérozygote (18-45-0)
Génotype sensible (18-45-01)

```
CTGCCTGCGTCTGTTGTAGCAACTTACTTCAACTGCATCATGTTTCATGG  
CTGCCTGCGTCTGTTGTAGCAACTTACTTCAACTGCATCATGTTTCATGG  
CTGCCTGCGTCTGTTGTAGCAACTTACTTCAACTGCATCATGTTTCATGG
```

Mutation G275E
Génotype mutant (49-001-12)
Génotype hétérozygote (18-45-0)
Génotype sensible (18-45-01)

```
TGGCCTCCTCCG
```

Première mutation trouvée

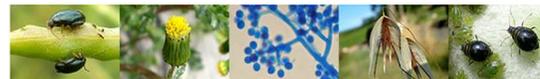
Sur culture de Chrysanthème
traitements du dernier mois :

- 4 spinosads
- 3 thiametoxame
- 3 Acrinothrine + abamectine



Difficulté de trouver un individu sensible !!!

Sur culture d'Origan
2 traitements spinosad par an

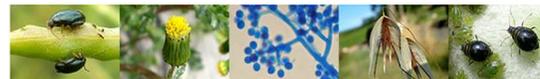
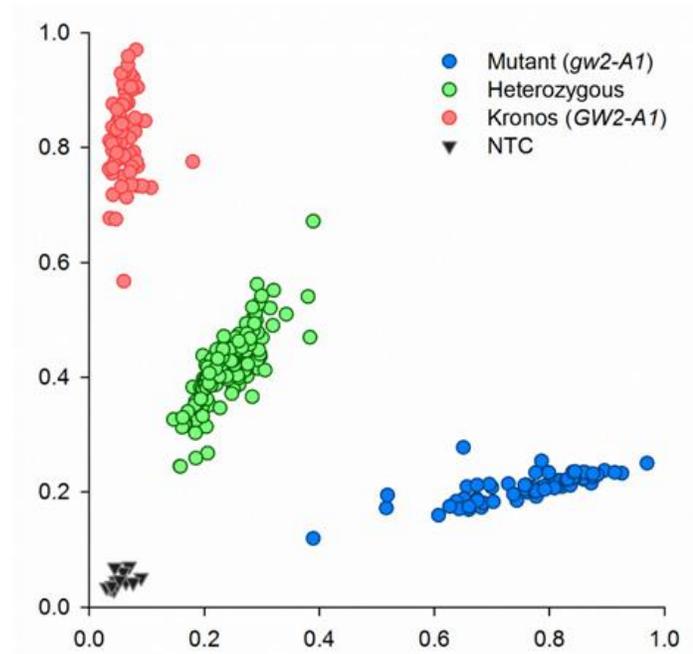


Choisir le bon outil moléculaire

Objectif : pouvoir faire de la détection haut débit à faible coût

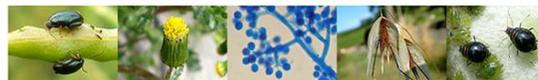
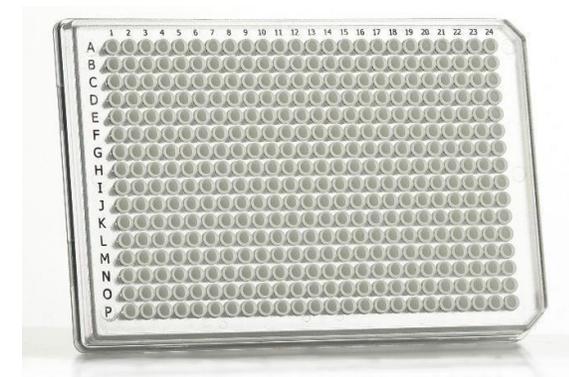
Options :

- PCR-PFLP
- PCR fluo + passage sur séquenceur
- KaspR
- NGS ?

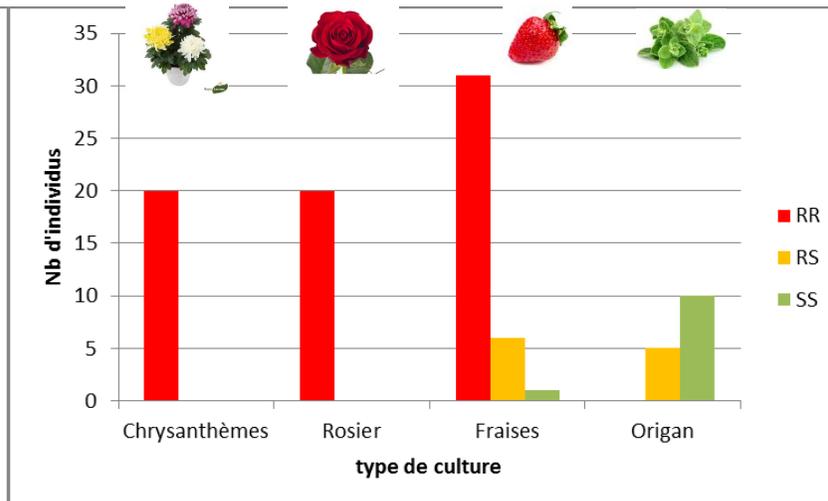
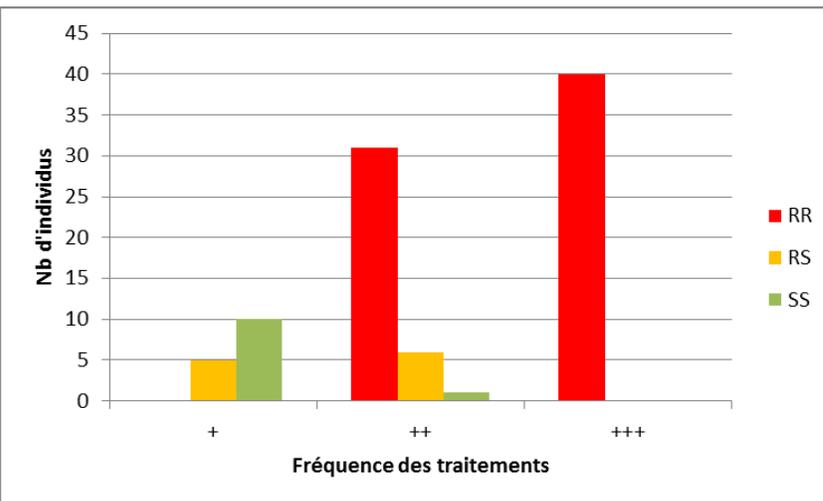


Extraction bon marché d'ADN à l'individu

- Choix de travail en microplaques 384 puits
- Avec des techniques d'extraction simplifiée : Chelex
- Concentrations obtenues compatibles avec le Kasp
- OK pour premier tests sur des populations

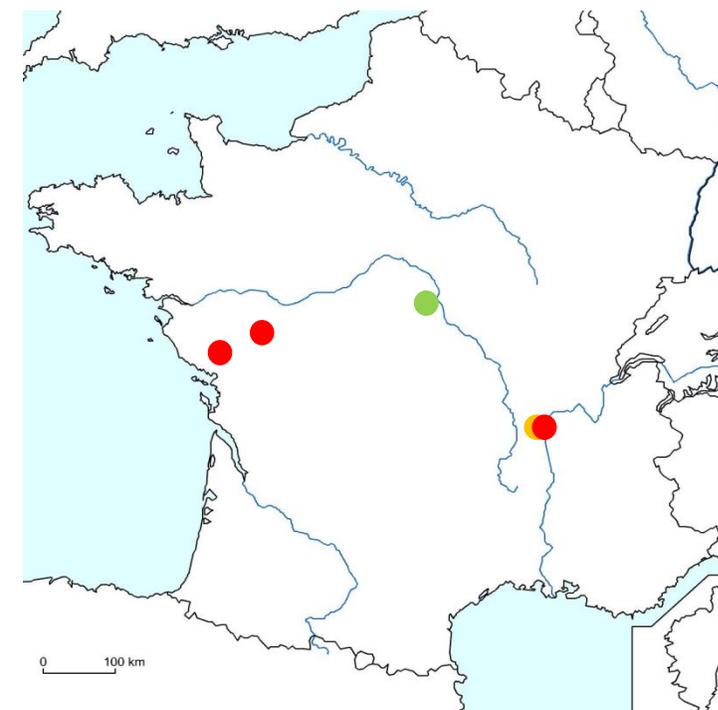


Premiers résultats

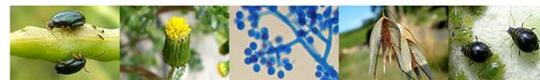


Niveau de traitements	RR	RS	SS	Tot
+		5	10	15
++	31	6	1	38
+++	40			40

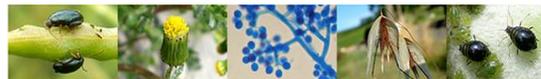
Culture	RR	RS	SS	Tot
Chrysanthèmes	20			20
Fraises	31	6	1	38
Origan		5	10	15
Rosier	20			20



Parcelle	RR	RS	SS	Tot
45220		5	10	15
49340	20			20
69440	19	1		20
69510	12	5	1	18
85430	20			20



Résistance de *F. occidentalis* dans le monde



La Drosophile du cerisier (*Drosophila suzukii*)



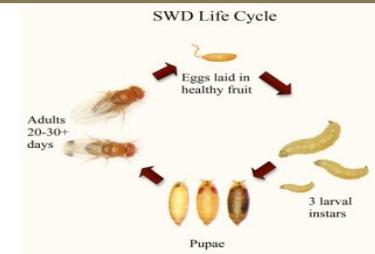


Risque d'apparition de résistance : exemple *Drosophila suzukii*

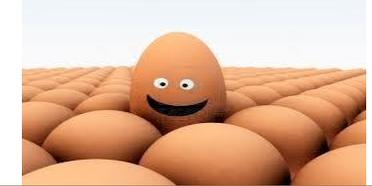
Facteurs à Risques :

- Facteurs liés aux ravageurs considérés
 - Facteurs biologiques et écologiques
 - Nombreuses générations
 - Fécondité élevée
 - Large dissémination, mobilité
 - Nombre de plantes hôtes
 - Réservoirs de génotypes sensibles

1 à 2 semaines



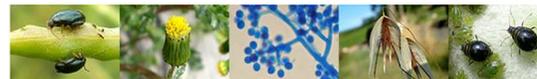
Jusqu' à 384
œufs/femelle



Dispersion rapide



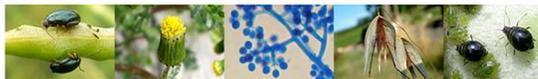
Très polyphage (fruits
rouges + Abricot + vigne)



Risque d'apparition de résistance : exemple *Drosophila suzukii*

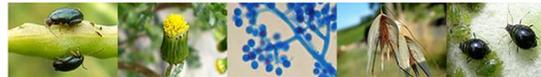
Facteurs à Risques :

- Facteurs liés à la substance active :
 - Facteurs opérationnels ou agronomiques:
 - Nombre de plantes hôtes traitées
 - Nombre de générations traitées
 - Nombre d'applications
 - Rotations courtes
 - Monoculture
 - Culture à grande échelle

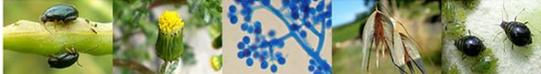
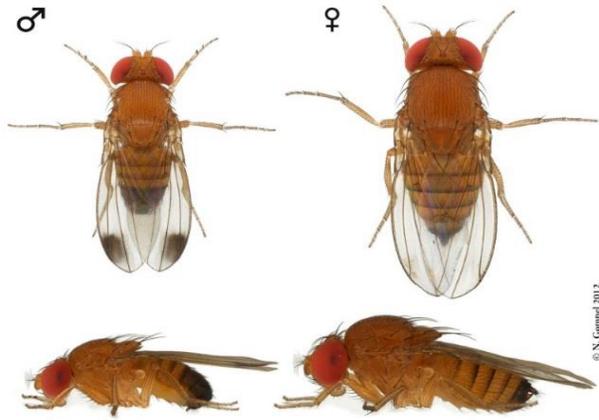


Contexte

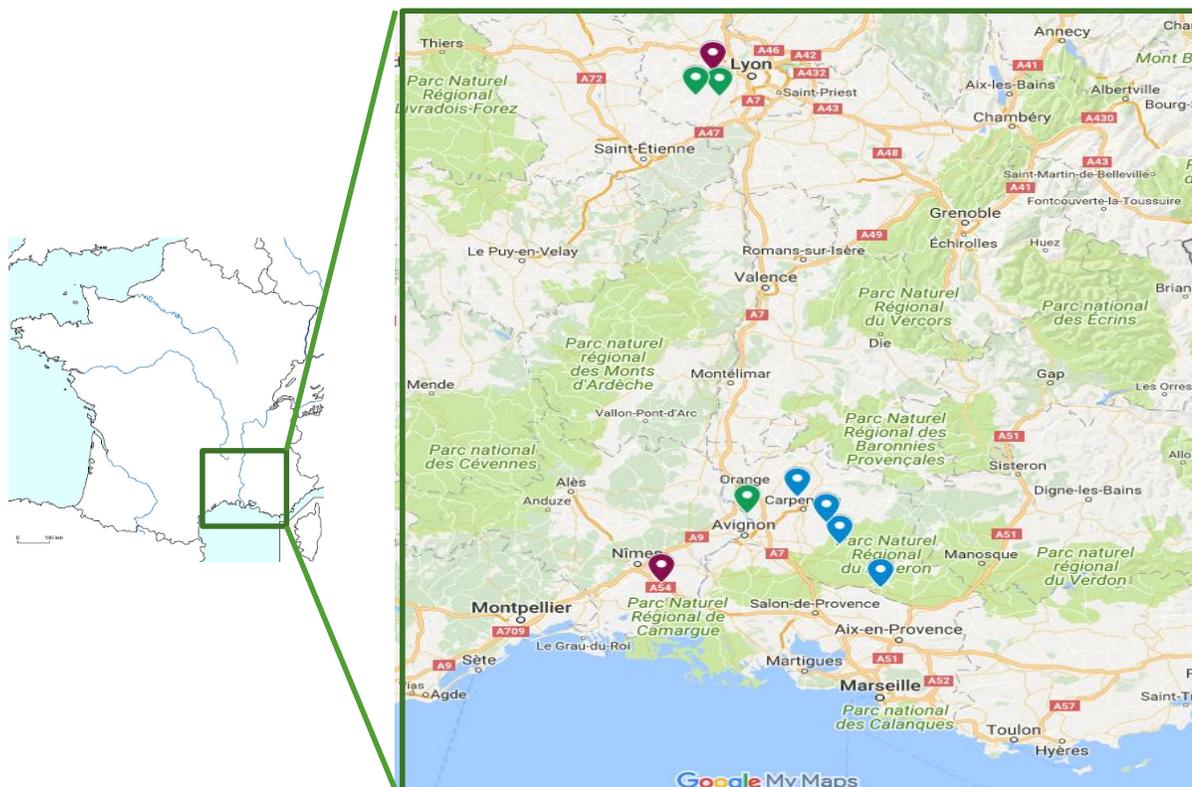
- Dans le cadre d'un **projet PPV** (Financé par la Phytopharmacovigilance) sur la surveillance des résistances
- Collaboration INRA (Myriam Siegwart) & ANSES (Benoit Barrès)
- Objectif : mettre au point des tests de résistance au phosmet et à la lambda-cyhalothrine



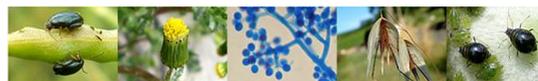
Test biologique par contact tarsal



Origine des souches testées



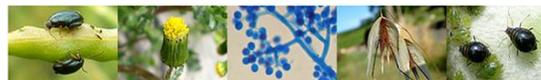
- 📍 Ste-Foy-lès-Lyon / LBBE
 - 📍 Balandran Ctifl
 - 📍 Soucieu-en-Jarrest
 - 📍 La Perrière
 - 📍 Avignon Inra
 - 📍 Gordes
 - 📍 Cadenet
 - 📍 Venasque
 - 📍 Aubignan
- 2 souches de référence
- 3 souches de terrain à tester
- 4 prélèvements non émergés



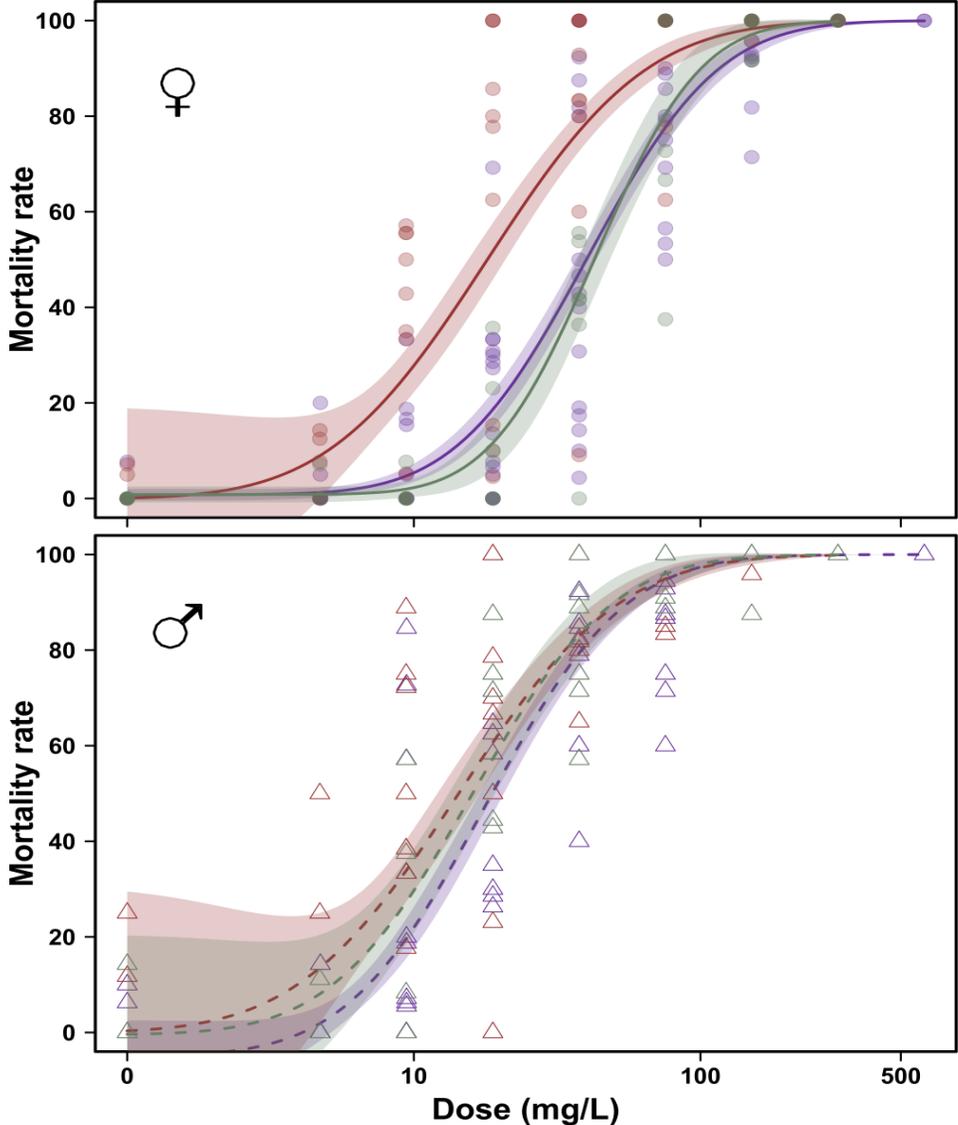
Facteurs d'erreur

Pour créer une méthode fiable et reproductible nous avons testé les facteurs suivants :

- L'âge des mouches au moment du test
- Leur sexe
- La diversité génétique au sein de la population testée
- Le nombre d'individus testés
- La durée d'exposition à l'insecticide

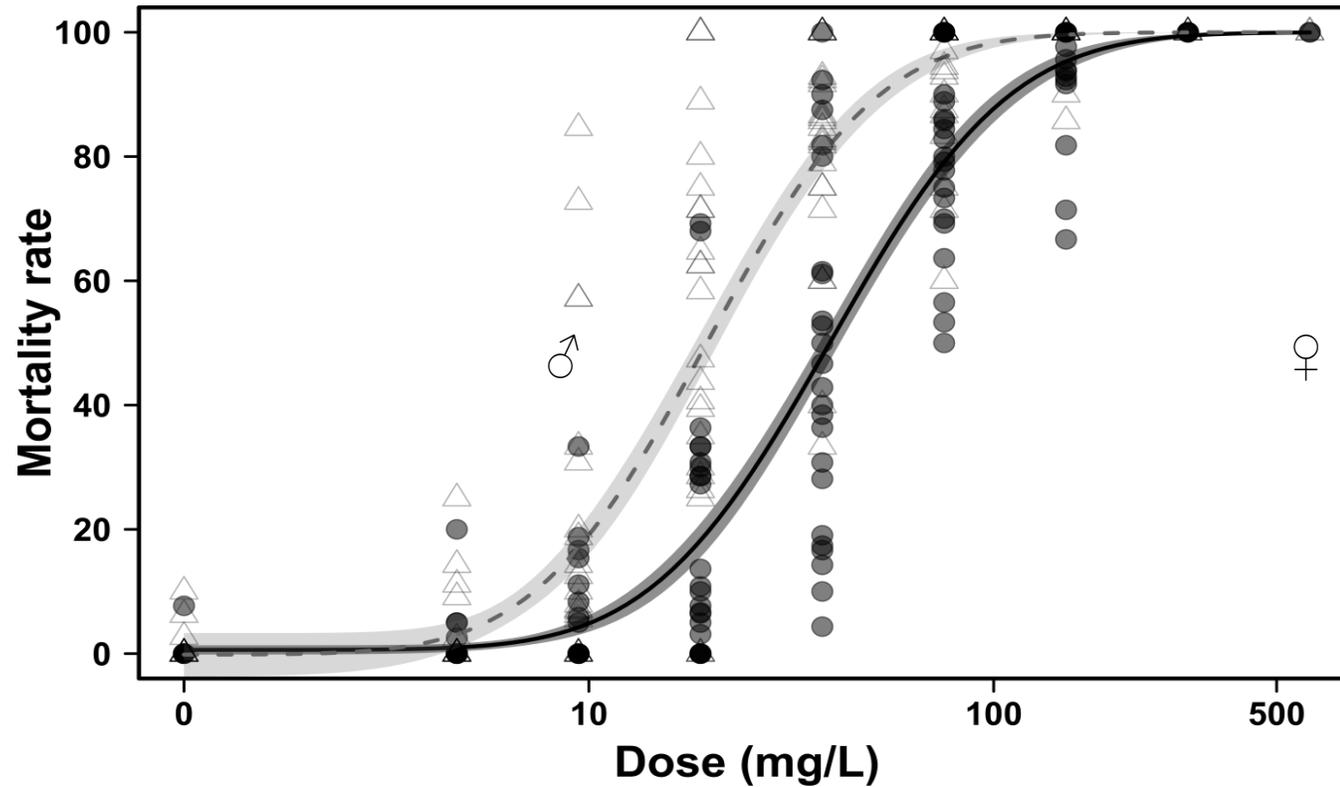


L'âge des mouches

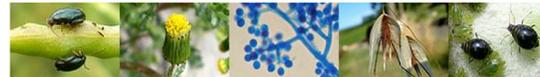


Choix âge de 24-48h

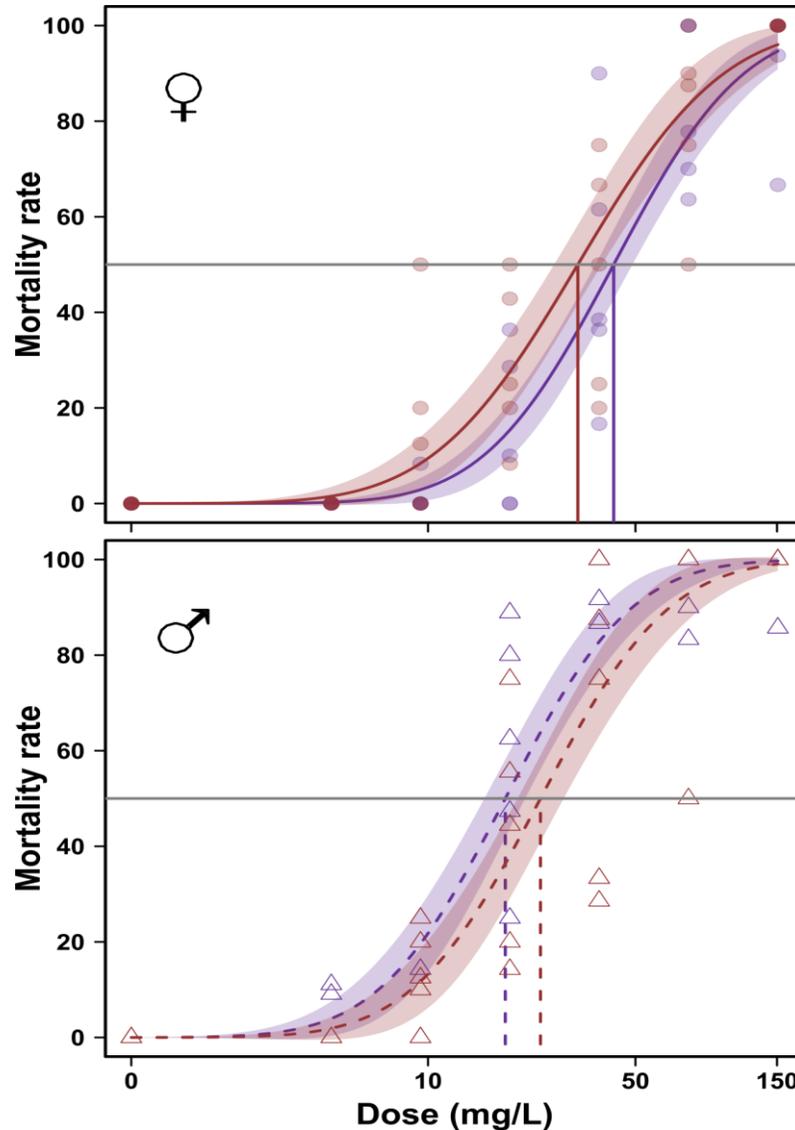
Le sexe des mouches



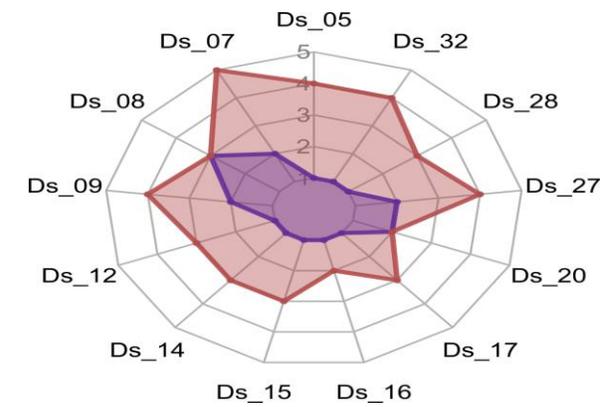
Sexage obligatoire



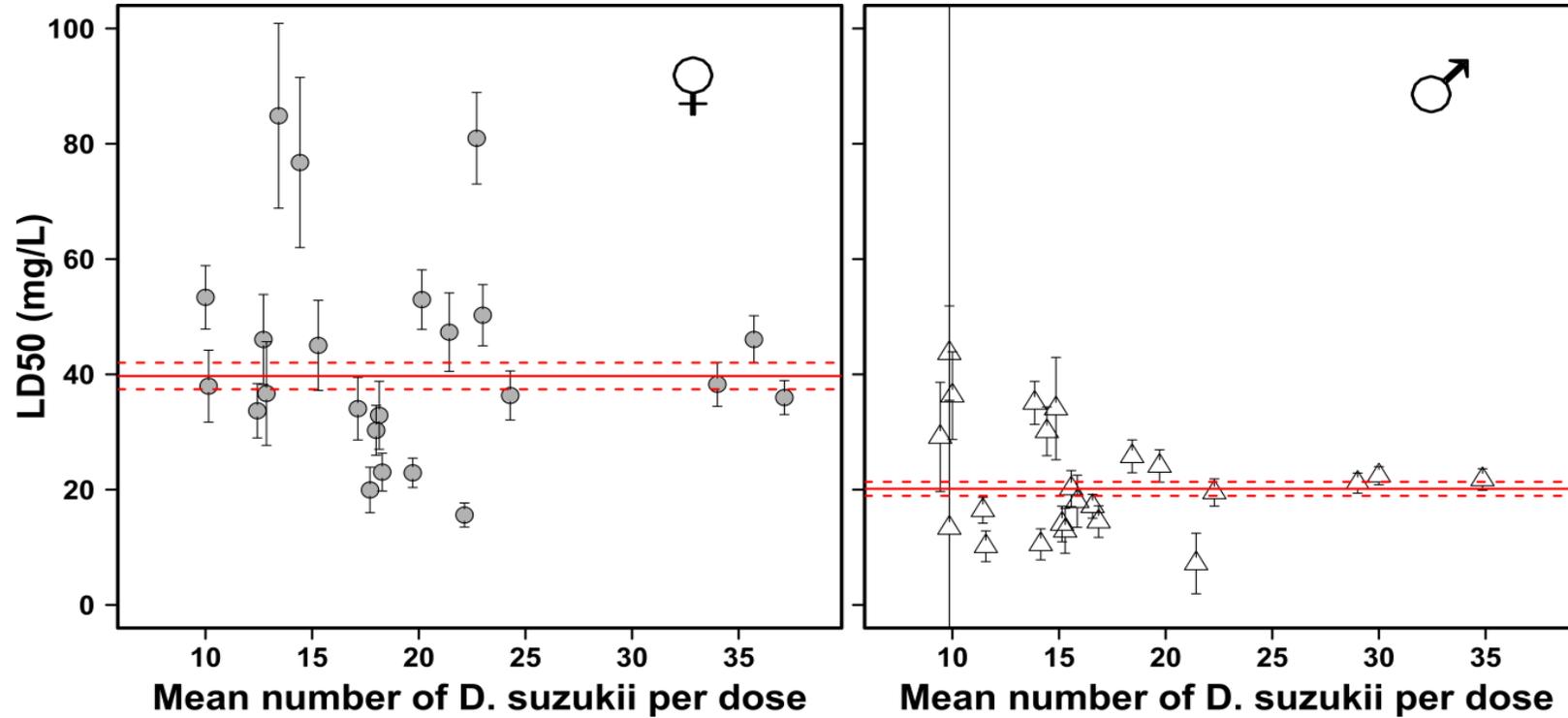
Diversité génétique au sein de la pop



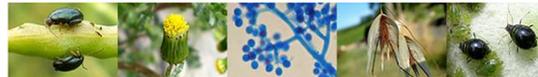
Pas d'effet de la diversité génétique ?!?



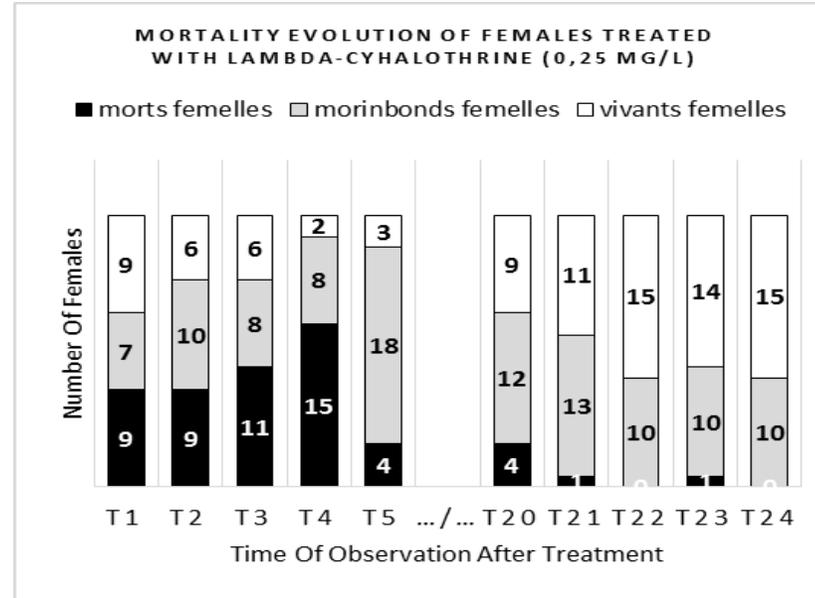
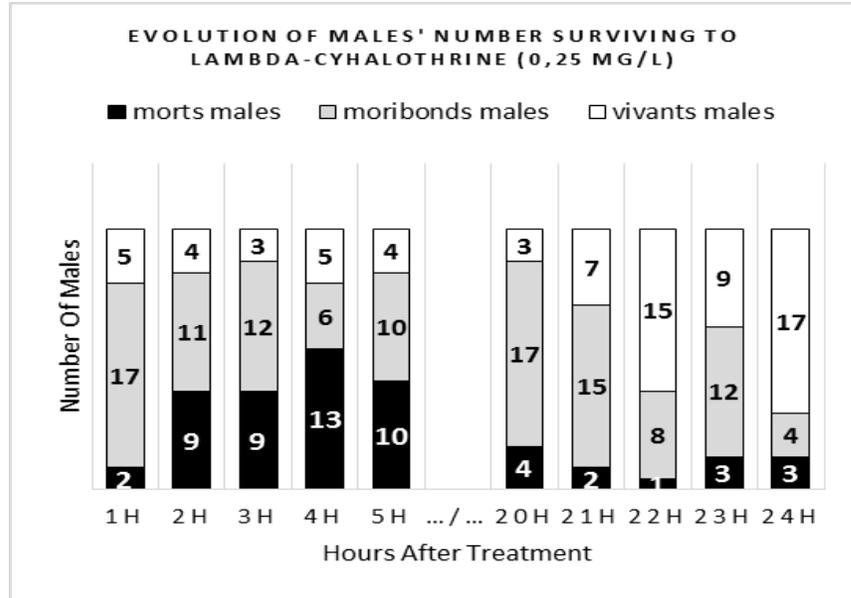
Nombre d'individus testés



Au moins 30 individus par dose



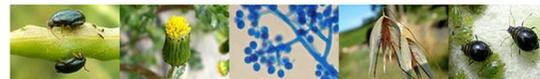
Durée d'exposition



Attendre 24h avant de faire la lecture

Pour plus de détails :

Blouquy L., Mottet C., Olivares J., Plantamp C., Siegwart M. and B. Barrès. Development of a bioassay to assess insecticide's resistance of *Drosophila suzukii*, a worldwide invasive pest. In prep.



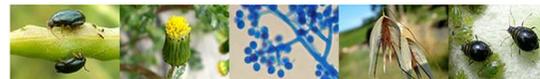
Populations testées 2018

7 prélèvements sur cerises en 2018

5 avec des drosophiles

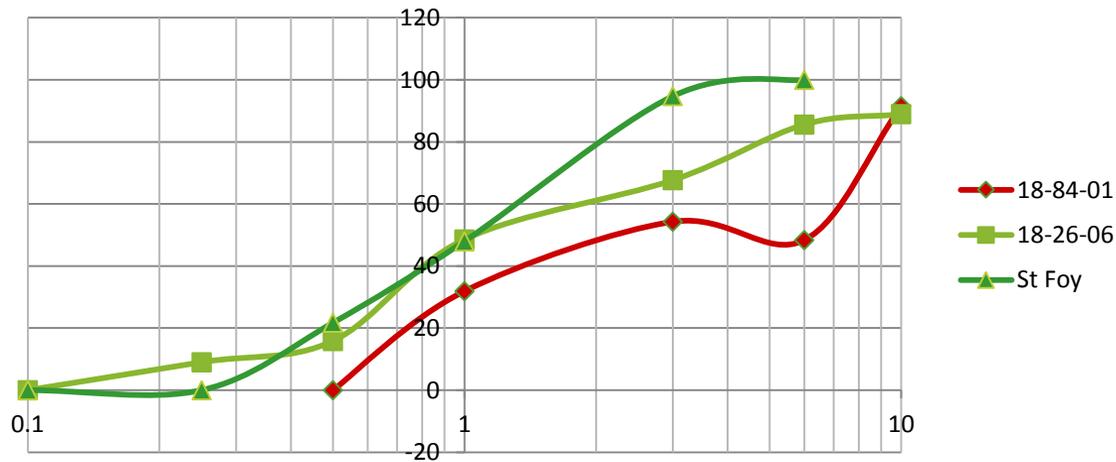
2 avec des *D. suzukii* :

- Etoile sur rhône
- Carpentras

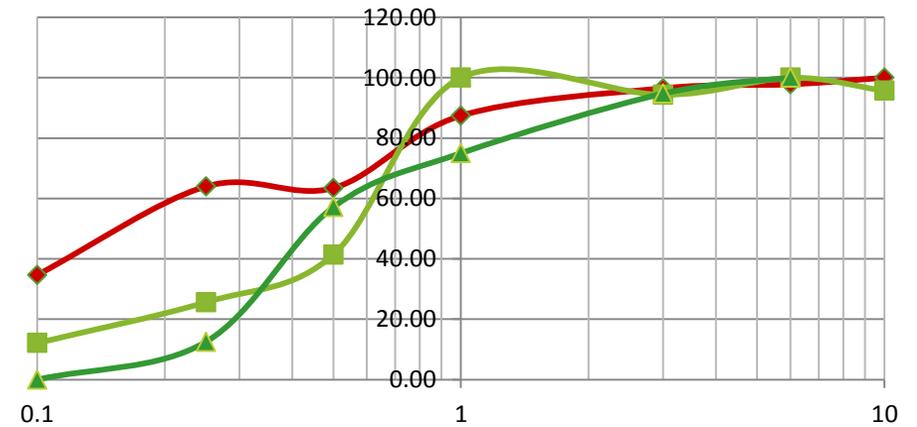


Sensibilité à la Lambda-cyhalothrine

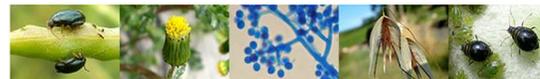
Femelles



Mâles

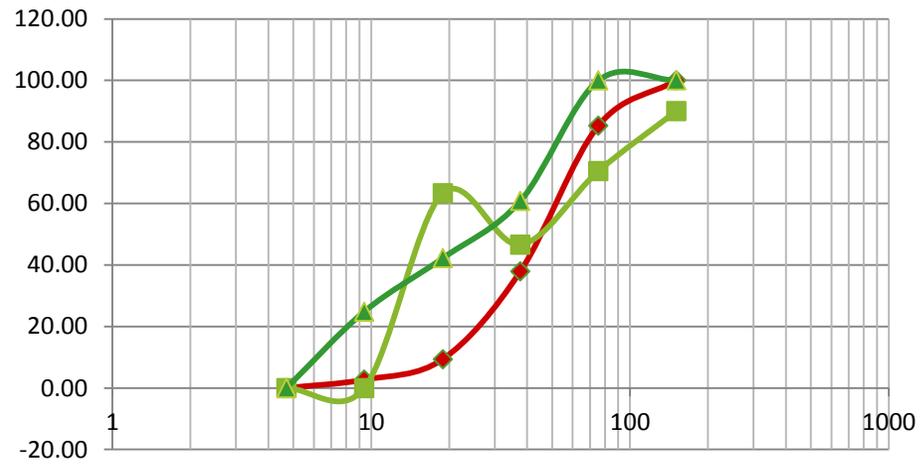


n= 588

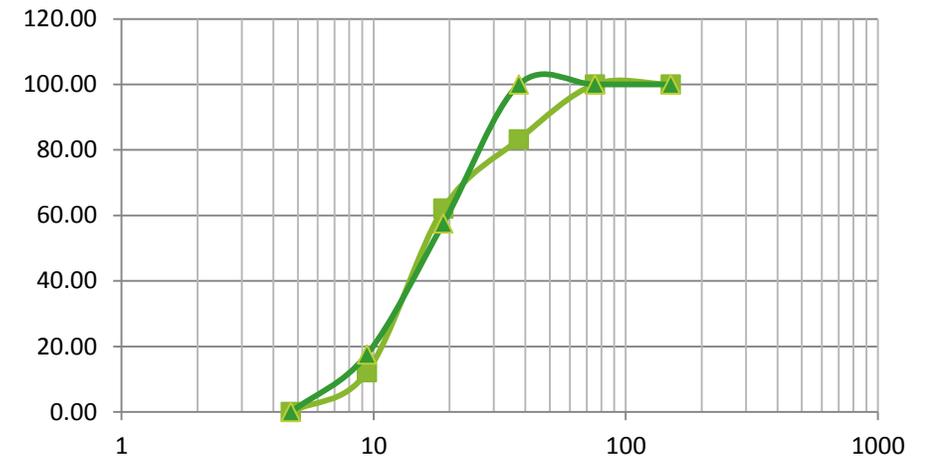


Sensibilité au Phosmet

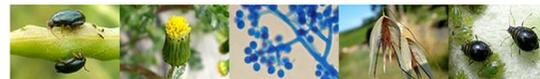
Femelles



Mâles



n= 616

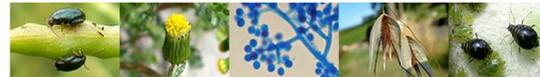


Conclusions

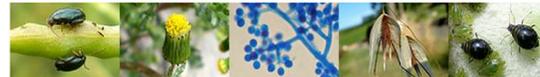
- Protocole de mesure de sensibilité en place
- Pour l'instant pas de résistances mais résultats sur deux pop
- Après discussion pas de retour sur parcelles avec baisse d'efficacité

- **Perspectives:**

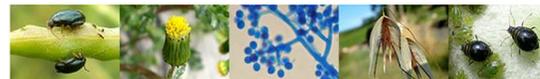
- Améliorer la collecte d'échantillons pour le Plan de surveillance
 - Bon timing pour l'envoi des populations pour avoir la bonne espèce
 - Comment faire pour limiter les déplacements donc augmenter les pop
 - Aucun échantillon sur fraises...
- Communiquer pour couvrir le territoire et détecter le plus précocement des pop résistantes (parcelle avec échec de traitement flagrant)



Résistance de *D. suzukii* dans le monde



Le carpocapse des pommes et des poires (*Cydia pomonella*)

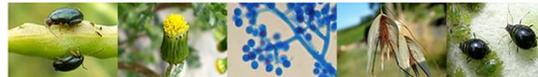


Une histoire pleine de rebondissement: le carpocapse des pommes

Devenu résistant à nombre de familles insecticides au fur et à mesure de leur mise sur le marché :

- aux régulateurs de croissance d'insectes
- aux pyréthriinoïdes
- aux organo-phosphorés
- à des biopesticides : Spinosad et le virus de la granulose

Certains individus ne sont résistants qu'à un seul mode d'action mais d'autres peuvent développer des résistances à plusieurs de ces groupes d'insecticides, on parle alors de résistance croisée et/ou résistance multiple



Début 1990's résistance au diflubenzuron (Sauphanor et al., 1994)

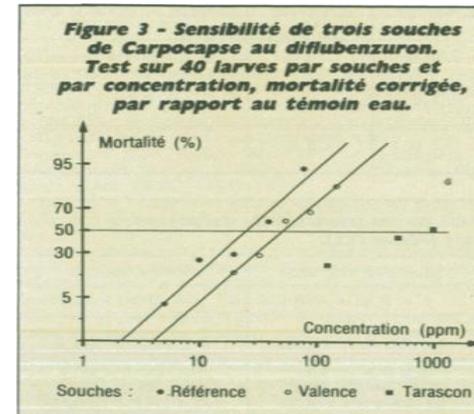
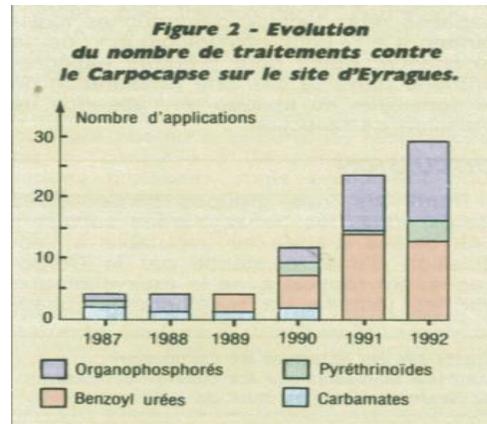


Homologué en 1975

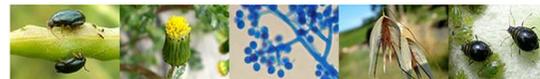
famille chimique des benzoyl-urées recommandée en agriculture raisonnée car relative innocuité sur la faune auxiliaire

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



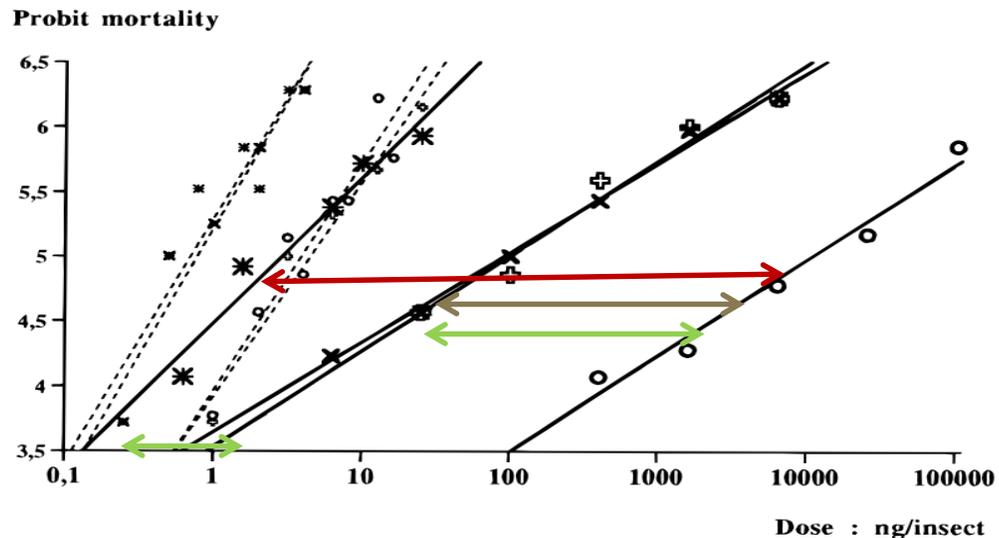
En 1995 mise en évidence que cette résistance est croisée. Elle confère des résistances au diflubenzuron, à la deltaméthrine, à la phosalone, à l'azinphos-méthyl et au dimétoate



Courant 90's caractérisation de la résistance à la deltaméthrine (Sauphanor *et al.*, 1997)

Décis

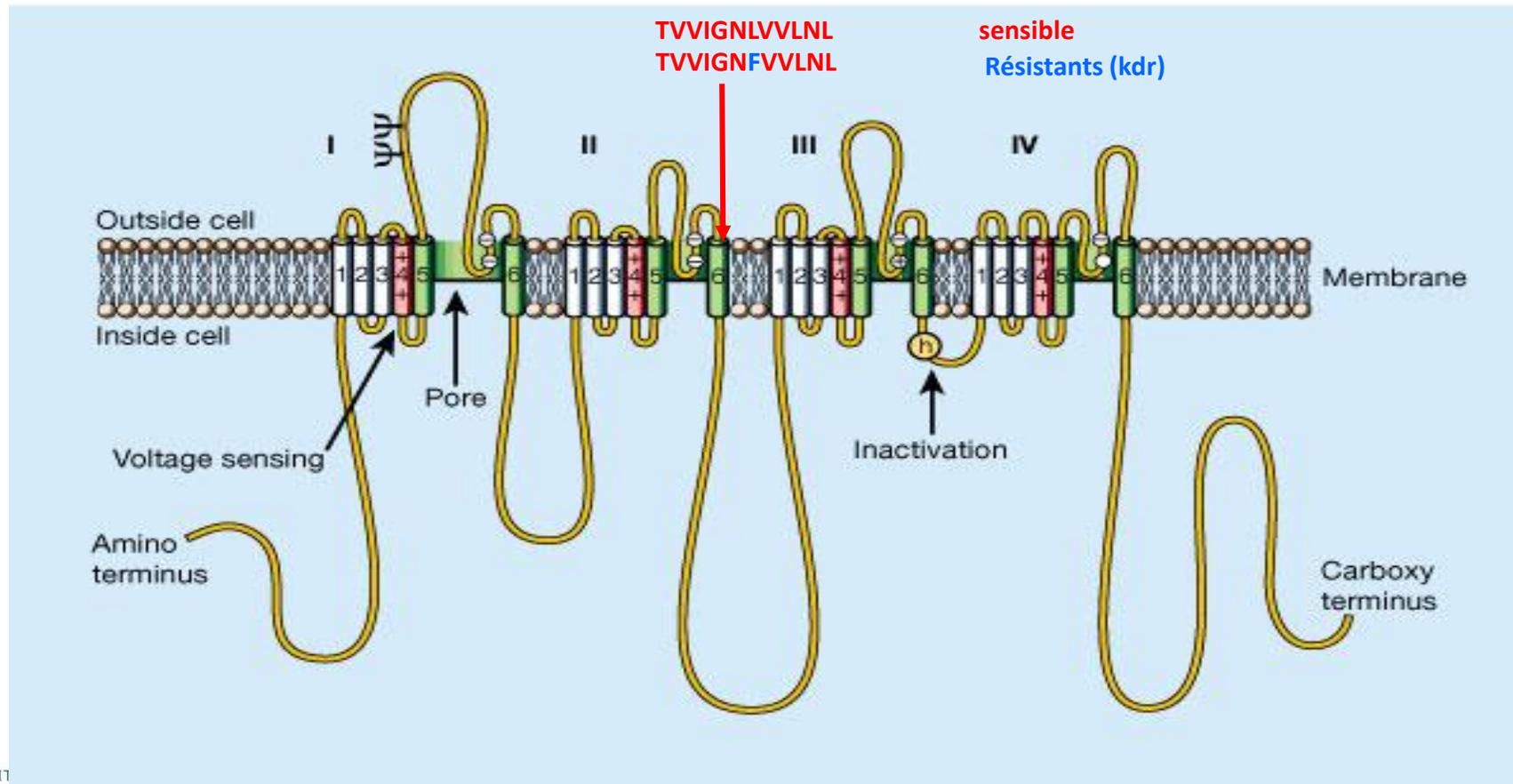
Constitution de souches de laboratoire pour étudier les mécanismes de résistances (RR=3 170)
 Etude des enzymes de détoxification : MFO, GST ou EST ?



○	S		○	R	RR = 3170
×	S + DEF	SR = 5,2	×	R + DEF	SR = 130
⊕	S + PBO	SR = 1,2	⊕	R + PBO	SR = 127
*	S+DEF+PBO	SR = 5,8	*	R+DEF+PBO	SR = 6340

Les monoxygénases sont majoritairement responsables de cette résistance

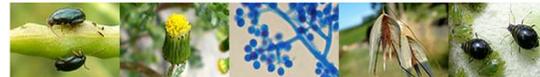
Année 2000 détection d'une mutation conférant de la résistance à la deltaméthrine (Brun-Barrale *et al.*, 2000)



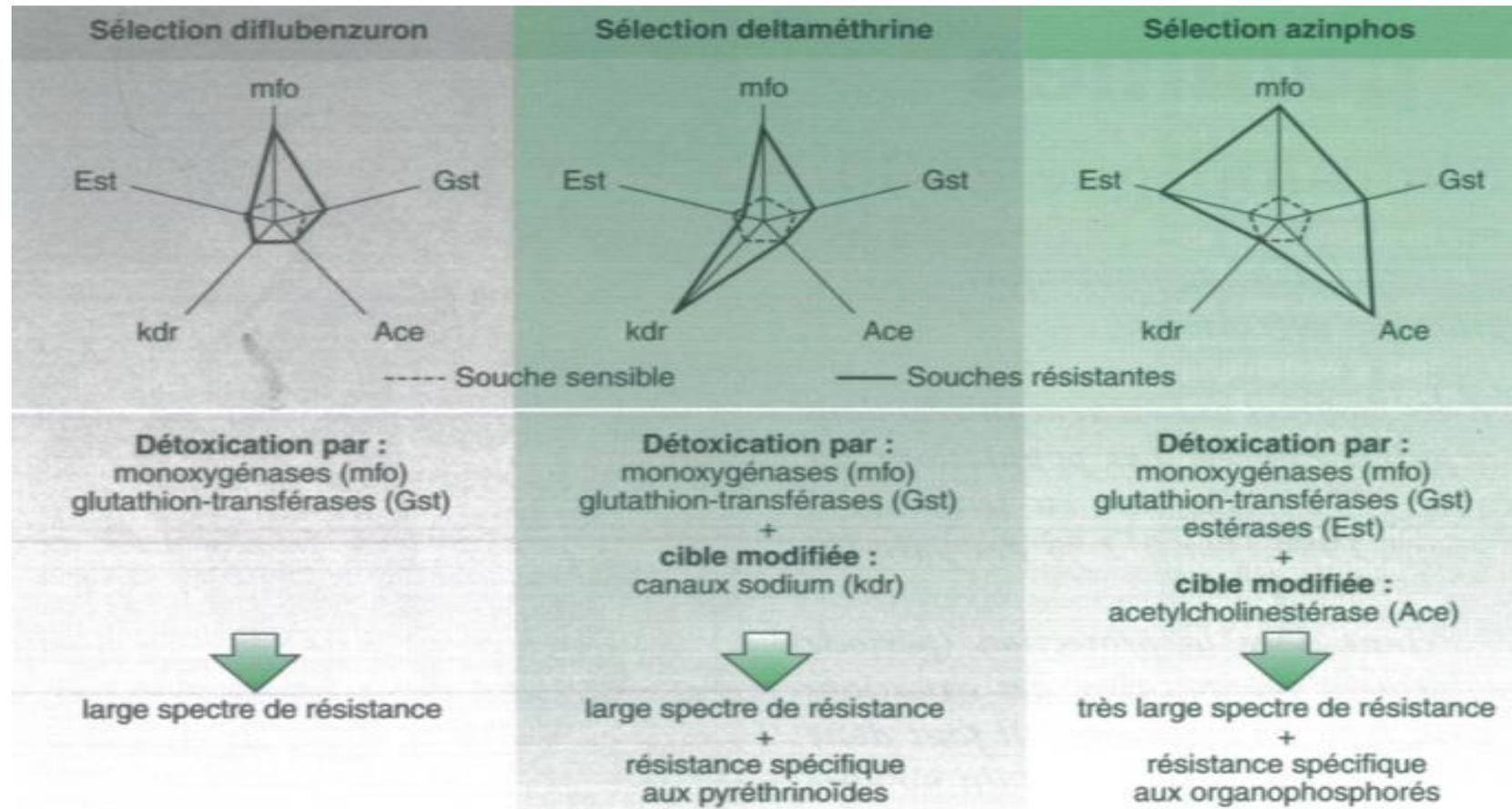
Début 2000's résistance à l'azinphos-méthyl (Sauphanor *et al.*, 2000)

Gusathion

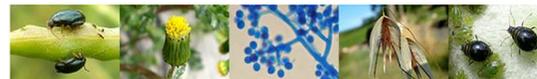
- Intensification de la lutte essentiellement au moyen d'organo-phosphorés à fortes doses due aux résistances déjà mentionnées
- Mécanismes identifiés comme responsables :
 - Monoxygénases
 - Transférases
 - Estérases non spécifiques
 - Mutation dans la cible moléculaire (possible)



Mécanismes de résistance sélectionnés chez le carpocapse par différents insecticides

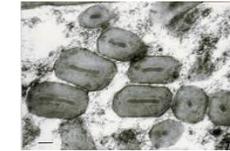


+ perte de sensibilité
au spinosad

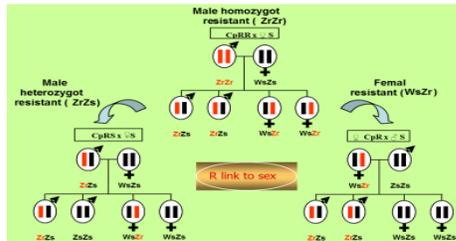


2006 résistance au virus de la granulose (Sauphanor et al., 2006)

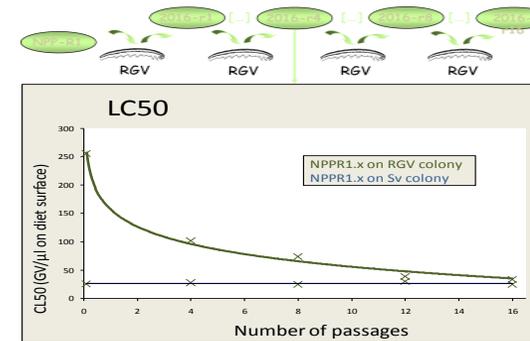
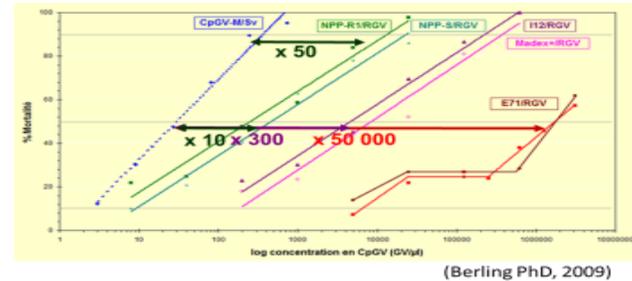
← Carpovirusine



- Homologué en 1991
- Principal moyen de lutte en agriculture biologique (12 traitements/an)
- Rapide apparition de résistance foyer à 20 km d'ici (RR 13 000)
- Pas croisée avec les insecticides chimiques



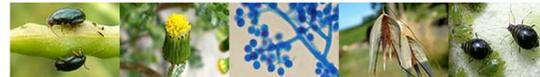
- Group 1 : x 50 000
- Group 2 : x 210-385
- Group 3 : x 7-17



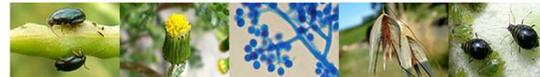
Mis sur le marché d'un nouvel isolat efficace sur insectes résistants

Importance relative des principaux mécanismes de résistance

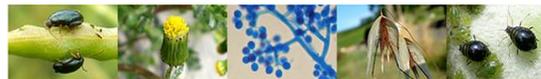
	RCI	OP	Carbamates	Pyrethrinoides	Néonicotinoides	Virus de la granulose
Pénétration	X	X	X	X	X	
METABOLISME						
MFO	XX	XX	XXX	XX	XXX	
EST		XXX	X	XX	XX	
GST	X	XX				
CIBLES						
Canal Sodium (Kdr)				XXX		
AchE (Mace)		XXX	XXX			
nAChR (Y151S)					XXX	



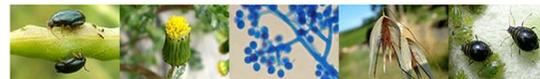
Les pucerons



Famille	Mécanisme	Résistance en pratique	Insectes concernés
Carbamates <i>pirimicarbe, methomyl</i>	modification de l'AcHé (MACE)	++	<i>Aphis gossypii, Dysaphis plantaginea, Myzus persicae, Nasonovia ribis-nigri</i>
	détoxification – monoxygénases, estérases	-/+	<i>Myzus persicae</i>
Organo-Phosphorés <i>phosmet, chlorpyrifos-éthyl</i>	diverses mutations de l'AcHé	+ / ++	<i>Aphis gossypii, Myzus persicae, Phorodon humuli, Cacopsylla pyri</i>
	détoxification – monoxygénases, estérases	-/+	<i>Myzus persicae</i>
Pyréthroïdes <i>deltaméthrine, lambda cyhalothrine, esfenvalérate...</i>	mutations kdr, super-kdr	++	<i>Aphis gossypii, Myzus persicae, Nasonovia ribis-nigri, Phorodon humuli, Cacopsylla pyri, Bemisia tabaci, Trialeurodes vaporarium</i>
	détoxification – monoxygénases, estérases	-/+	<i>Myzus persicae</i>
Néonicotinoïdes <i>acétamipride, imidachlopride, thiaclopride, thiaméthoxam</i>	mutation récepteur nicotinique	++	<i>Myzus persicae, Bemisia tabaci, Trialeurodes vaporarium</i>
	détoxification – monoxygénases, estérases	- / ++	<i>Myzus persicae</i>



Le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea*)

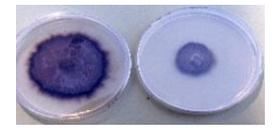


Dysaphis plantaginea

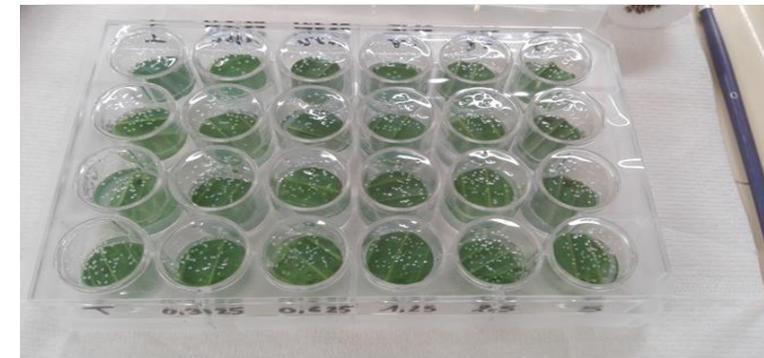
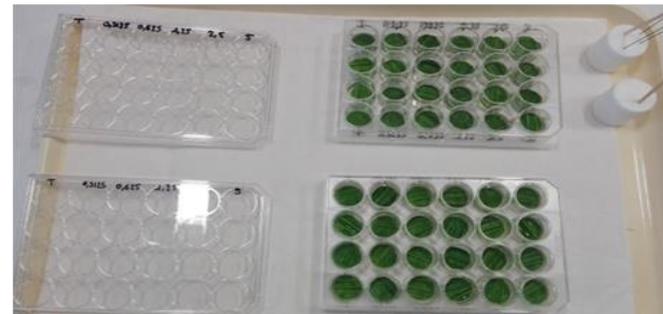
- Puceron cendré du pommier
- Dégâts sur pommier uniquement (dégâts directs)
- Hôte secondaire : plantain
- Flonicamide : inhibition de la prise alimentaire



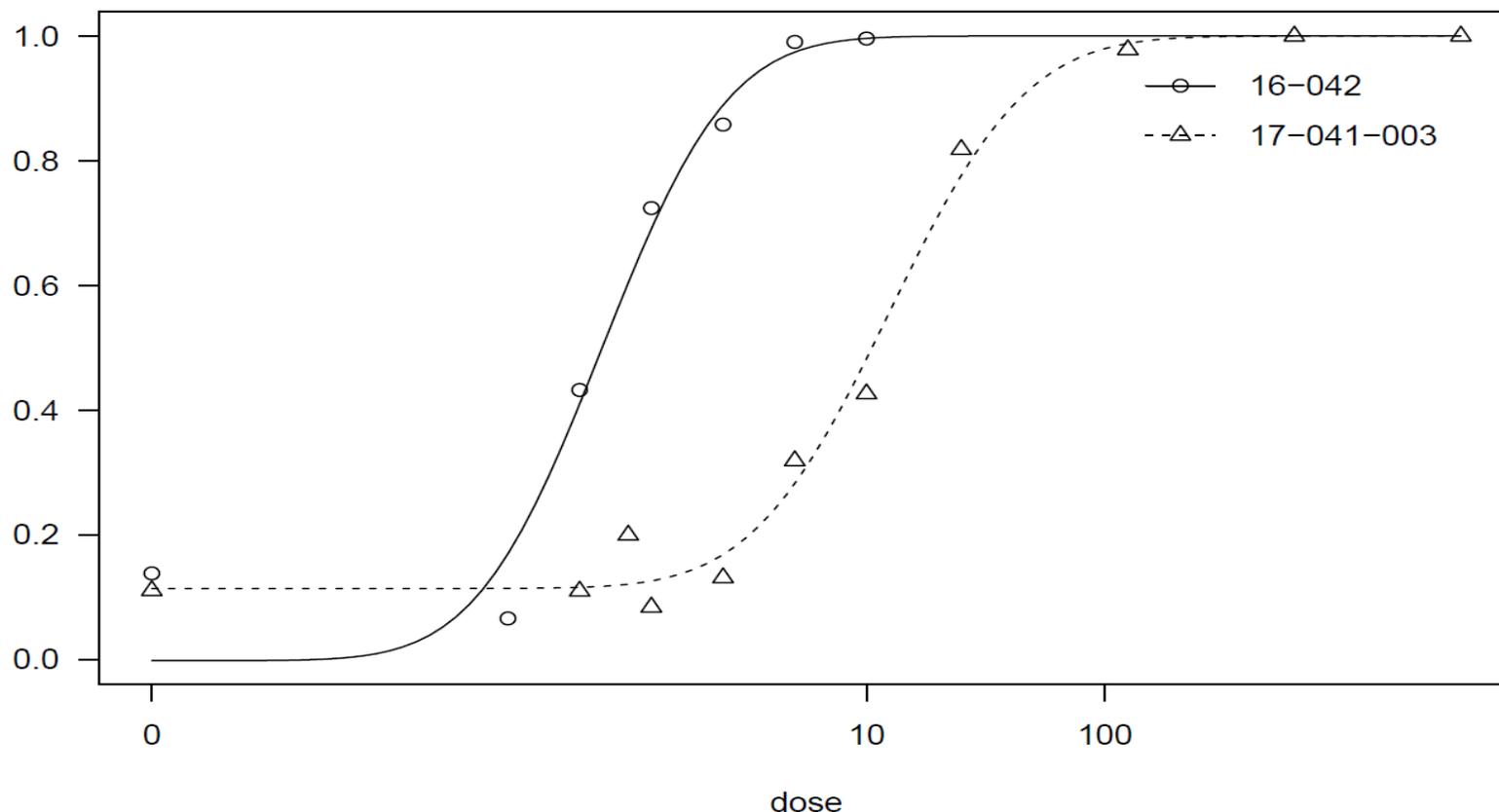
Mise au point d'un test biologique



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



Des signes de dérive de sensibilité



DL50₁₆₋₀₄₂ = 0,78 mg/L

DL50₁₇₋₀₄₁₋₀₀₃ = 6,8 mg/L

→ **FR=8,7**

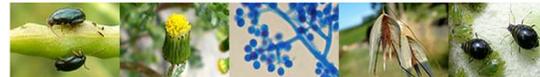
Nombre d'échantillons reçus :

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

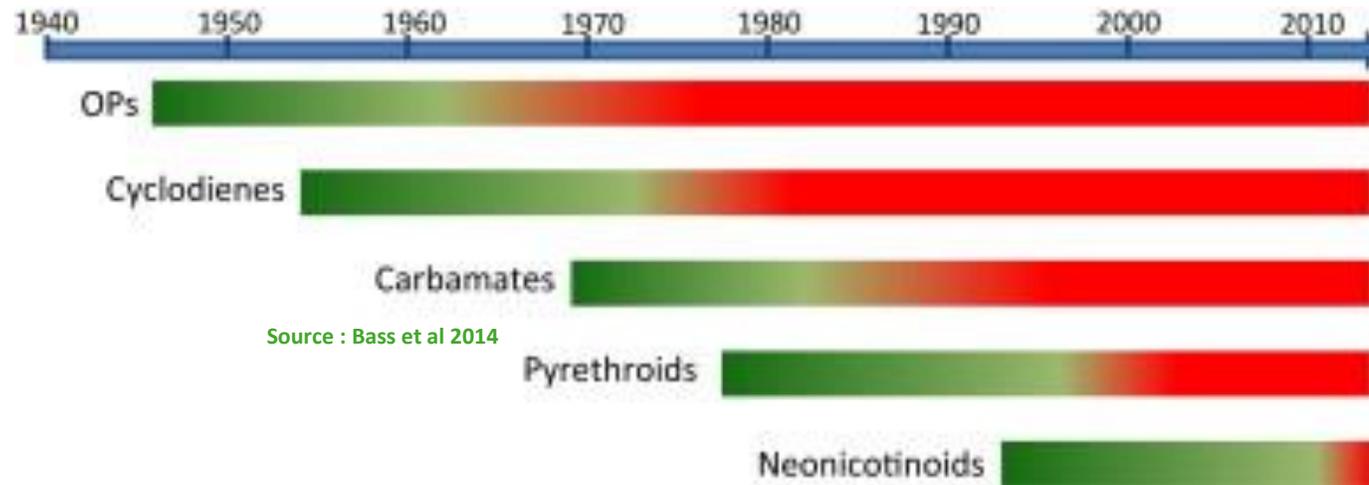
→ Un clone de 2017 en dérive de sensibilité

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

Le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*)



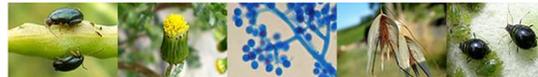
Des contournements successifs



Source : Bass et al 2014

apparition successives de résistances

perte de contrôle évitée par l'arrivée de nouvelles molécules →
faux sentiment de sécurité



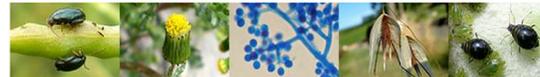
Cas des pyréthrinoïdes en France

les premières résistances aux pyréthrinoïdes décrites en 1997 en Lorraine

extension géographique les années suivantes de la résistance aux pyréthrinoïdes

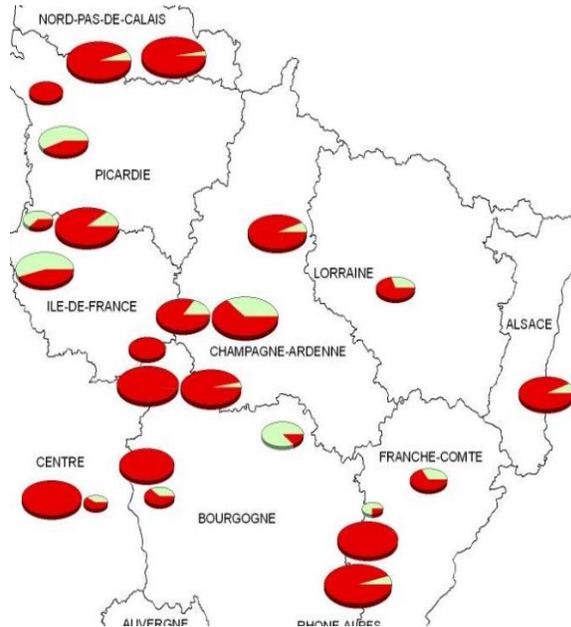
en 2005, échec de contrôle des populations sur colza

la situation est jugée préoccupante et l'évaluation des résistances est relancée

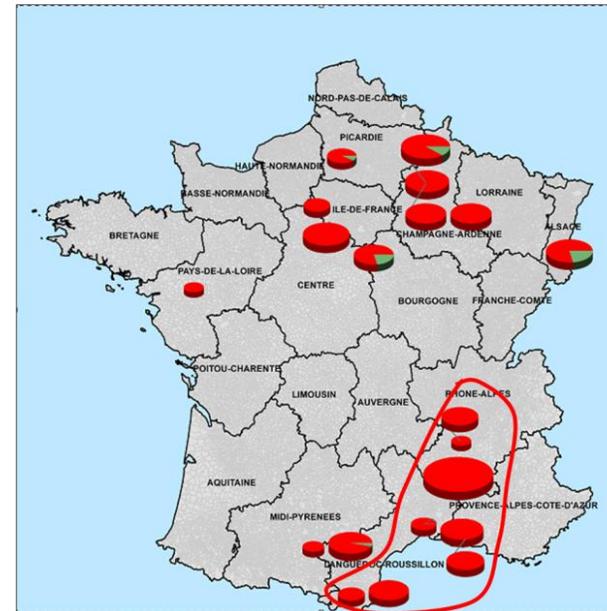


L'enquête

Résistances de cible aux carbamates et pyréthriinoïdes sont connues → étude moléculaire des populations

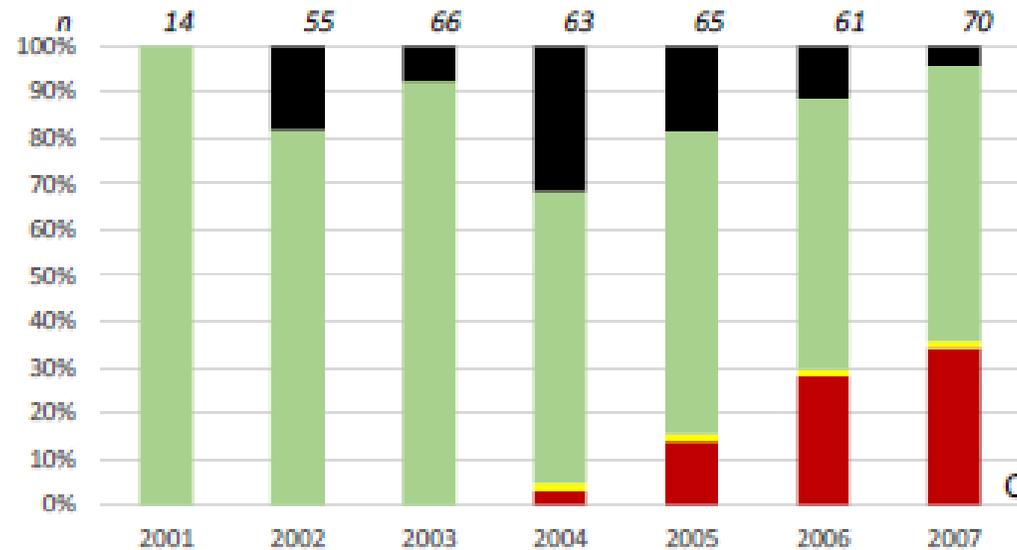


carbamate / 2009-2011
23 parcelles / (colza)



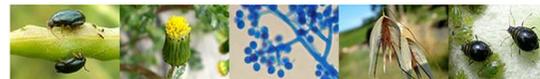
Pyréthriinoïdes / 2011-2012
20 parcelles (12 colza + 8 pêche)

Evolution temporelle dans un piège à succion



apparition en 2004 d'individus résistant à la fois aux carbamates et aux pyréthriinoïdes

Forte augmentation de fréquences les années suivantes



COLLOQUE RÉSISTANCE AUX PESTICIDES 14 ET 15 FÉVRIER 2019 À MONTRÉAL

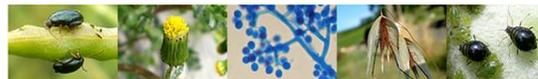
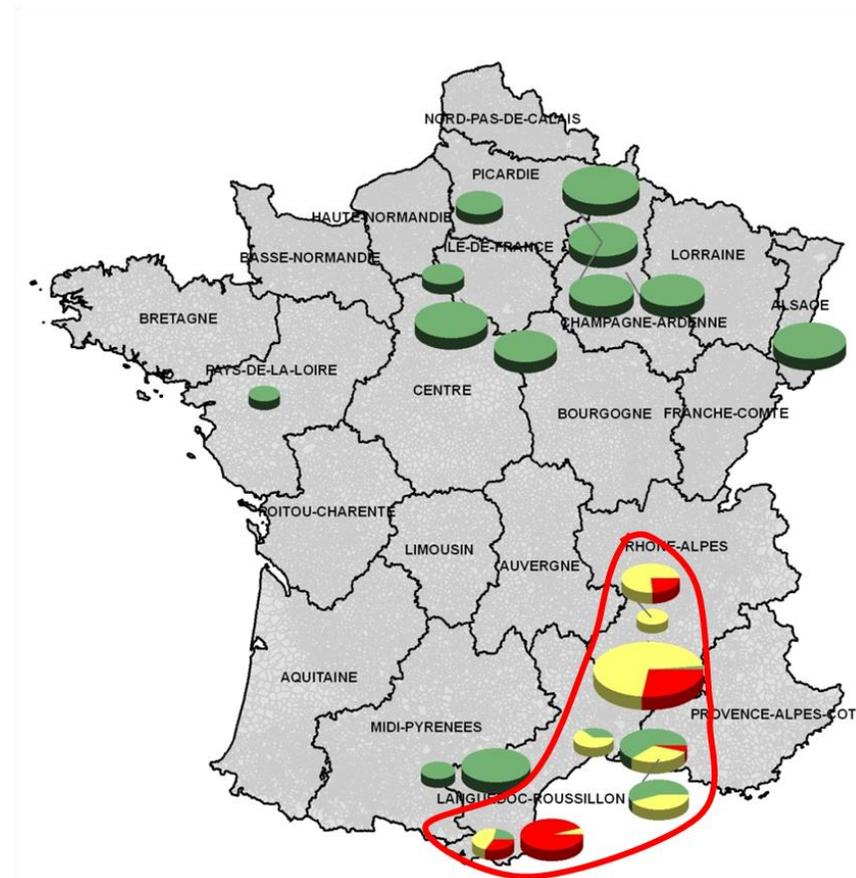
Les problèmes continus : résistances aux néonicotinoïdes

1^{er} détection en 2011 d'une
résistance de cible (R81T)

déjà répandue sur pêcher,
mais absente sur colza

existence d'une résistance
métabolique (duplication
/surexpression CYP6CY3)

2018 fin des néonicotinoïdes
(2020 fin des dérogations)



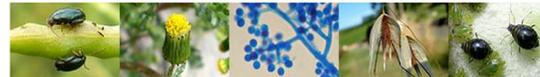
Exemple emblématique car...

évolution de résistances successives

pyramidage des résistances

résistance de cible et/ou métabolique

futur interdiction des néonicotinoïdes → problème de contrôle à envisager



Résistances Altises d'hiver (*Psylliodes chrysocephala*) et charançon du bourgeon terminal (*Ceutorhynchus picipitarsis*) aux pyréthrinoïdes, en France, en culture de colza

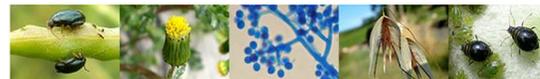
Contacts:

Céline Robert

c.robert@terresinovia.fr

Laurent Ruck

l.ruck@terresinovia.fr

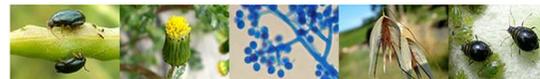
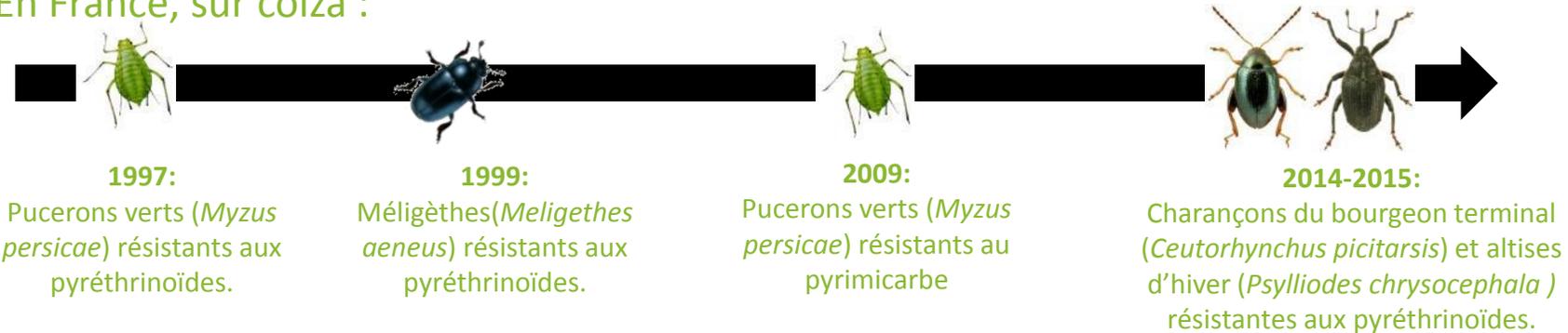


Contexte : résistance aux insecticides

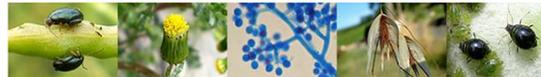
Utilisation continue et monotone d'insecticides chimiques

→ **EMERGENCE DE POPULATIONS RESISTANTES**

En France, sur colza :



La grosse altise du colza (*Psylliodes chrysocephalus*)





Monitoring grosse altise - Résultats

Symboles



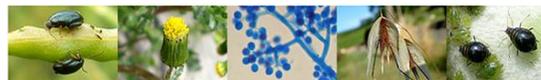
Test flacon : tout type
résistance



Test flacon : résistance
métabolique



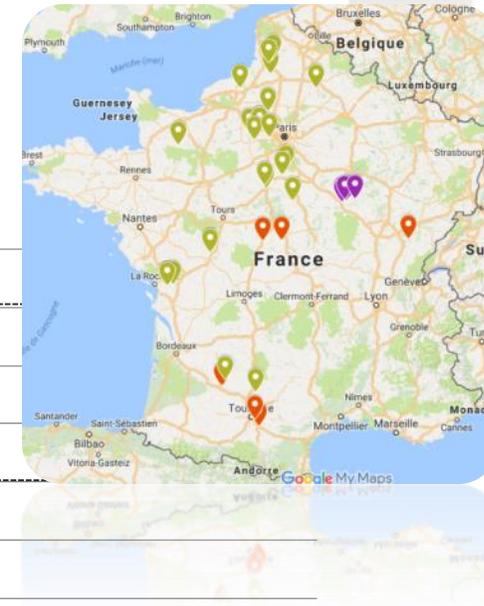
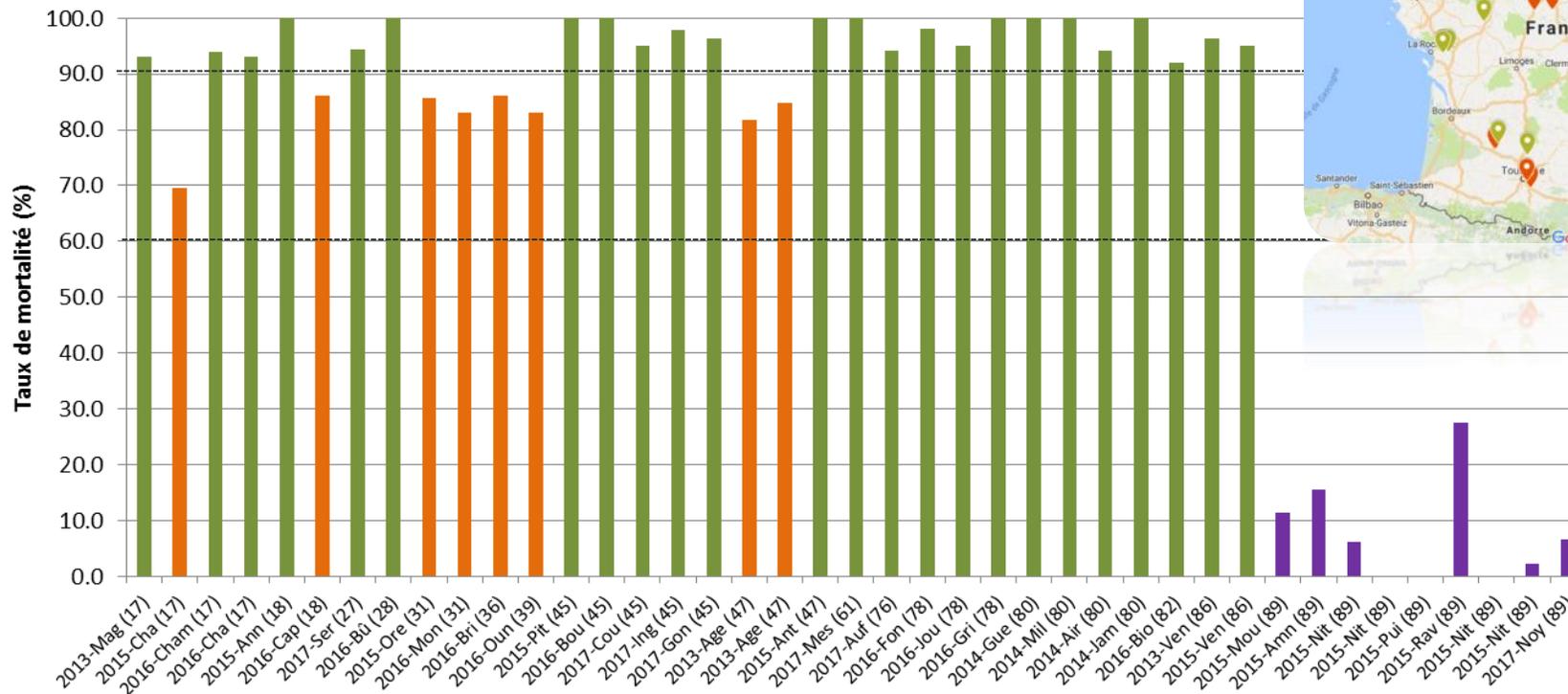
Mutation de cible



Tests flacons : un taux de mortalité très variable



Taux de mortalité après 24h d'exposition à la lambda-cyhalothrine à 15 ng/cm²



📍 % de mortalité <= 60%
📍 60% < % de mortalité <= 90%
📍 % de mortalité > 90%

COLLOQUE RÉSISTANCE AUX

CIDES 14 ET 15 FÉVRIER 2019 À MONTRÉAL



Résistances par mutation de cible



Résultats des analyses moléculaires sur altises d'hiver (prélèvements 2015-2017)

246 échantillons analysés

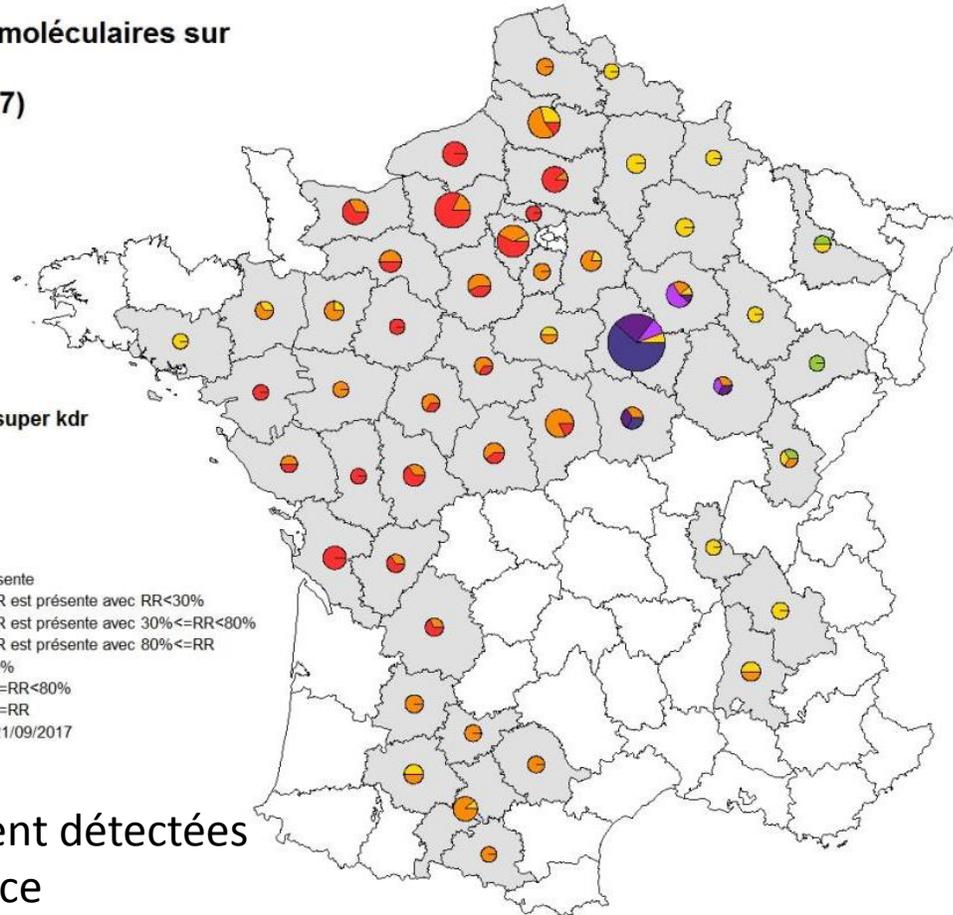
(carte réalisée le 21/09/2017)

Expression des mutations kdr et super kdr (% de populations par catégorie)

Nombre de populations



- Population où aucune mutation n'est présente
- Pop. où SKDR n'est pas présente et KDR est présente avec $RR < 30\%$
- Pop. où SKDR n'est pas présente et KDR est présente avec $30\% \leq RR < 80\%$
- Pop. où SKDR n'est pas présente et KDR est présente avec $80\% \leq RR$
- Pop. où SKDR est présente avec $RR < 30\%$
- Pop. où SKDR est présente avec $30\% \leq RR < 80\%$
- Pop. où SKDR est présente avec $80\% \leq RR$
- Populations analysées ou en cours au 21/09/2017

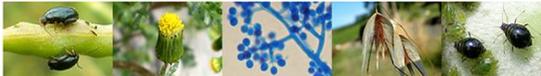
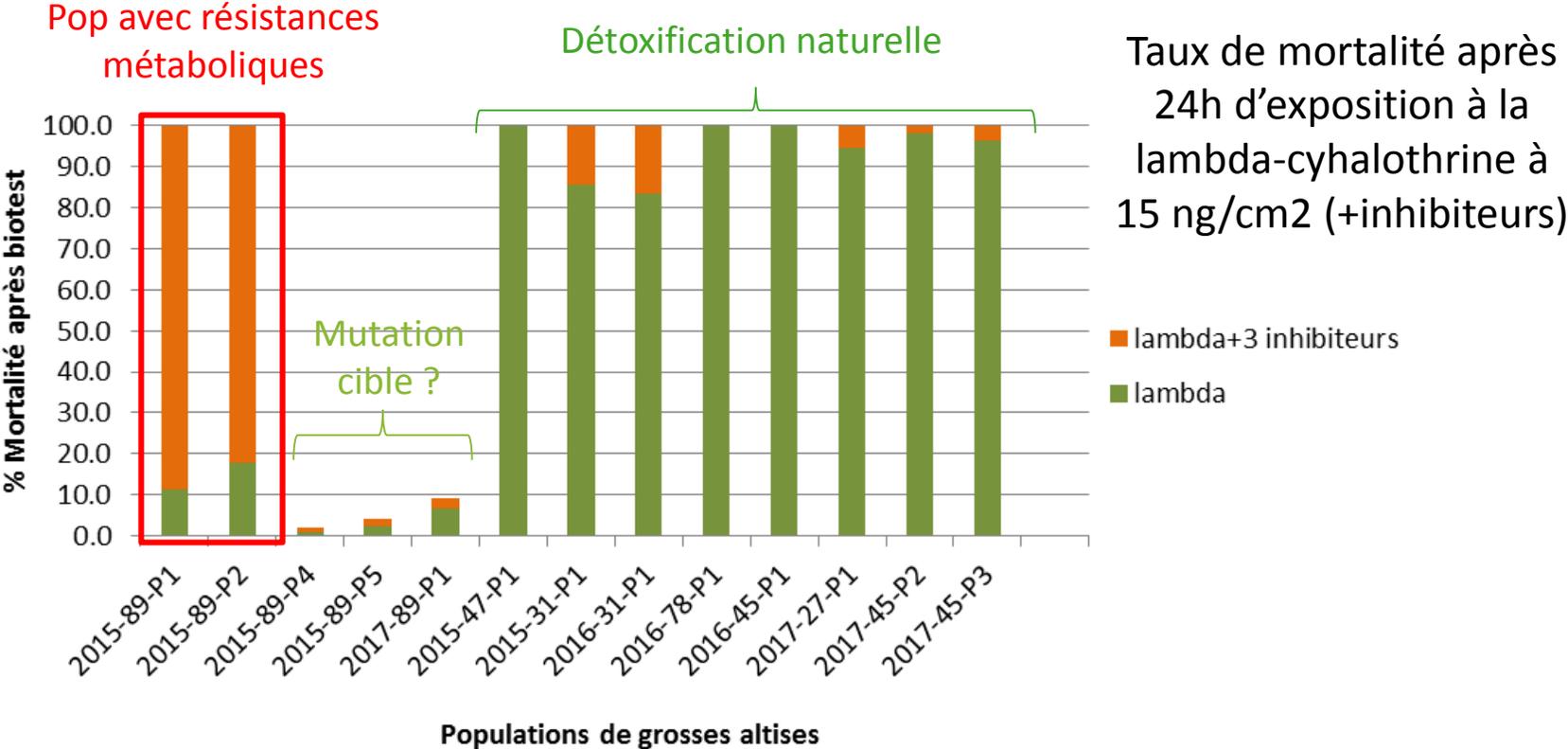


Mutations KDR (L1014F) et SKDR (M918L) sont les plus fréquentes

Mutations T929N et L925I également détectées un peu partout en France; fréquence importante dans le Sud-Ouest



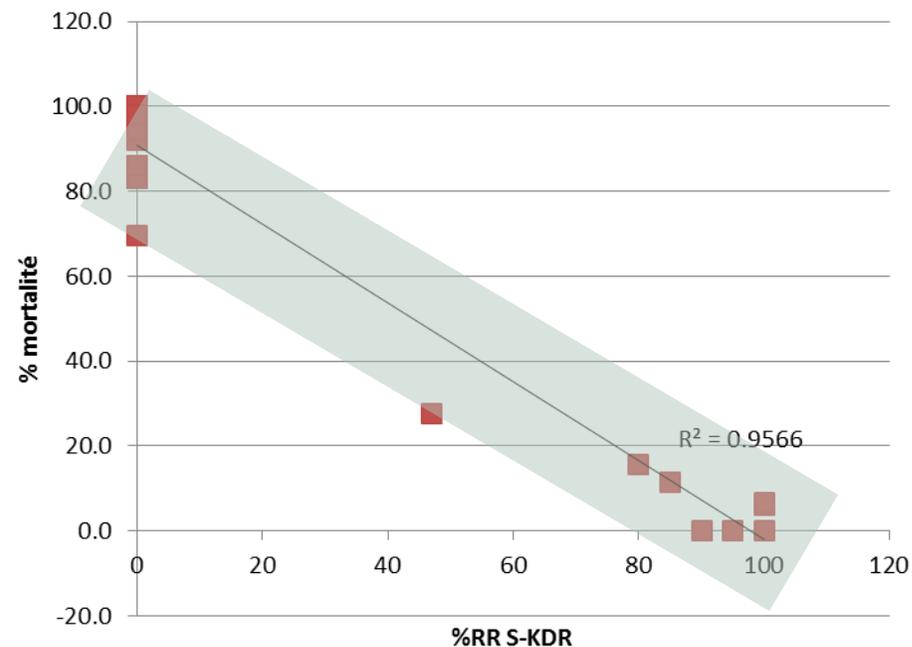
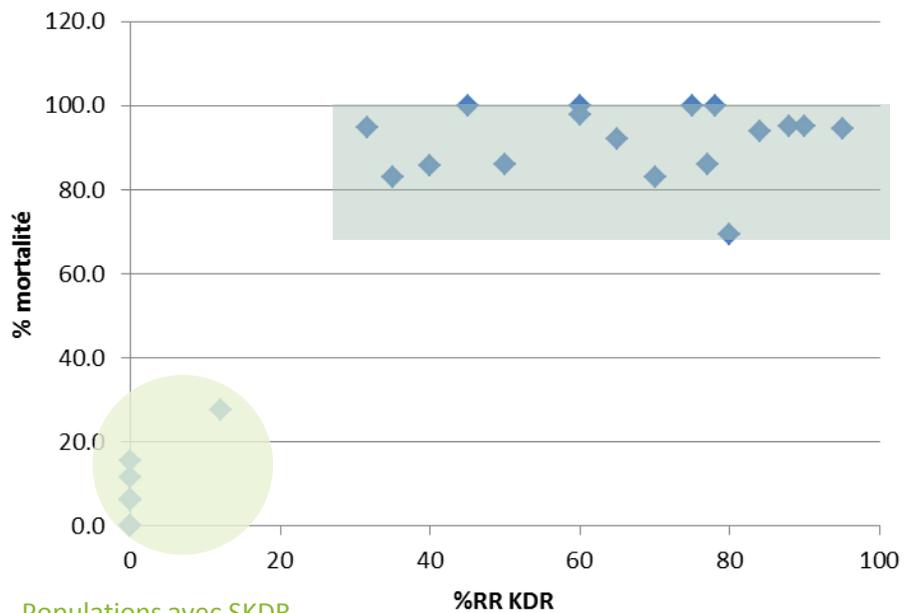
Résistance métabolique



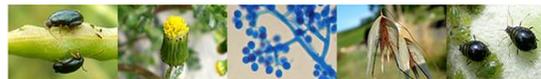


Corrélations

résultats tests flacons(% de mortalité à 15 ng/cm²) et % d'individus homozygotes KDR ou SKDR.



Les taux de mortalité dans les tests flacons semblent davantage corrélés à la présence de mutations super kdr que kdr.
Quel est l'impact de la détoxification ?





Monitoring charançon du bourgeon du bourgeon terminal - Résultats

Symboles



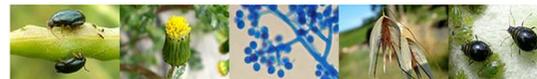
Test flacon : tout type
résistance



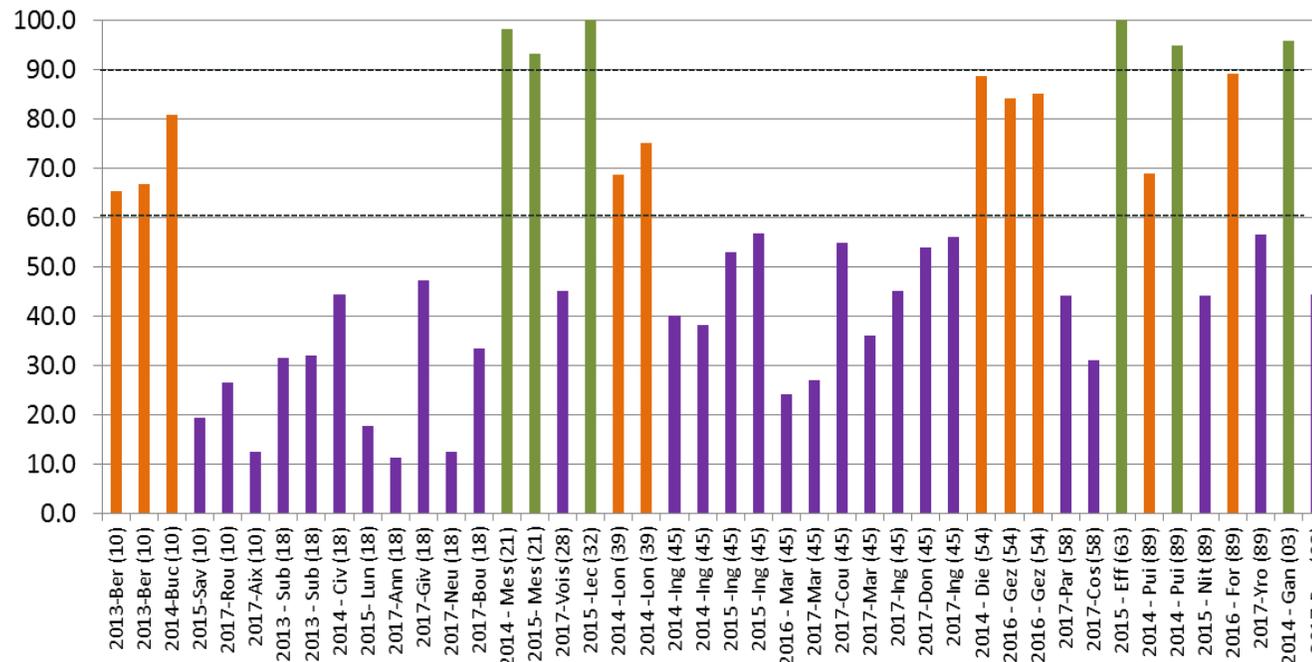
Test flacon : résistance
métabolique



Mutation de cible



Tests flacons : un taux de mortalité très variable



Taux de mortalité après 24h d'exposition à la lambda-cyhalothrine à 15 ng/cm²

- 📍 % de mortalité <= 60%
- 📍 60% < % de mortalité <= 90%
- 📍 % de mortalité > 90%



COLLOQUE RÉSISTANCE AUX PESTICIDES 14 ET 15 FÉVRIER 2019 À MONTRÉAL

Résistance par mutation de cible



Résultats des analyses moléculaires sur charançon du bourgeon terminal (prélèvements 2015-2017)

111 échantillons analysés

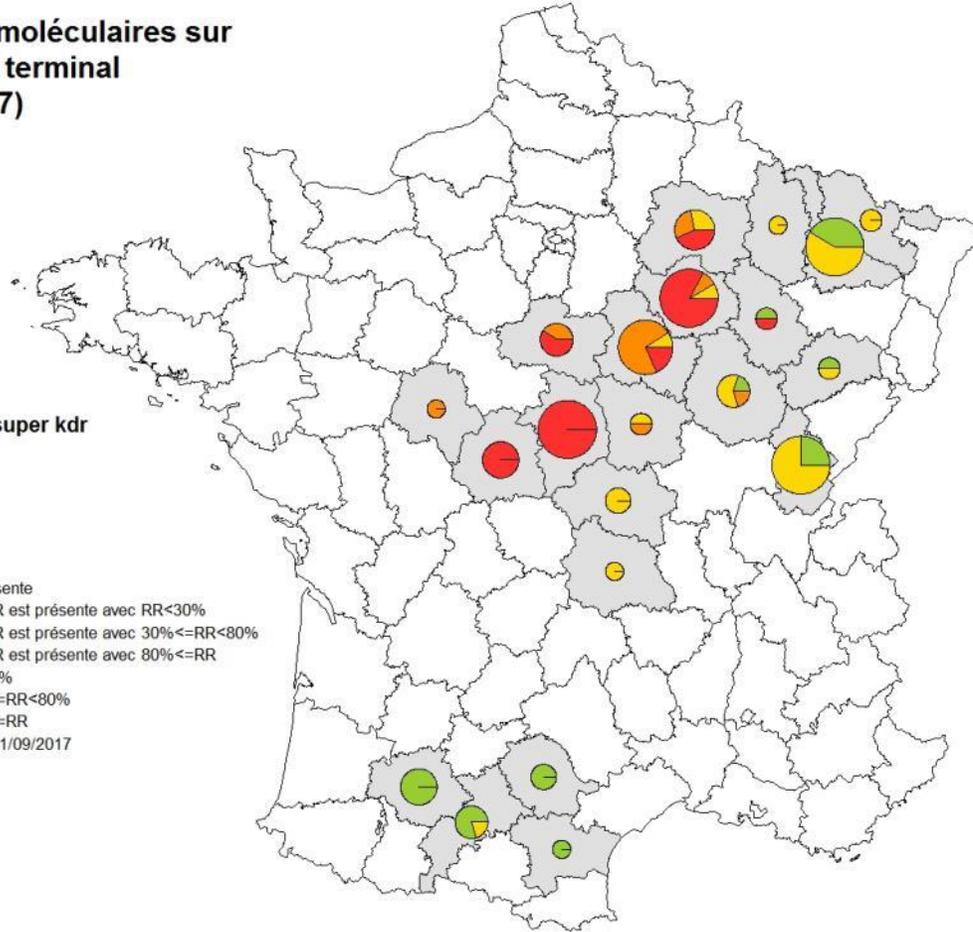
(carte réalisée le 21/09/2017)

Expression des mutations kdr et super kdr (% de populations par catégorie)

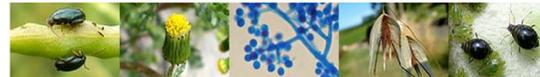
Nombre de populations



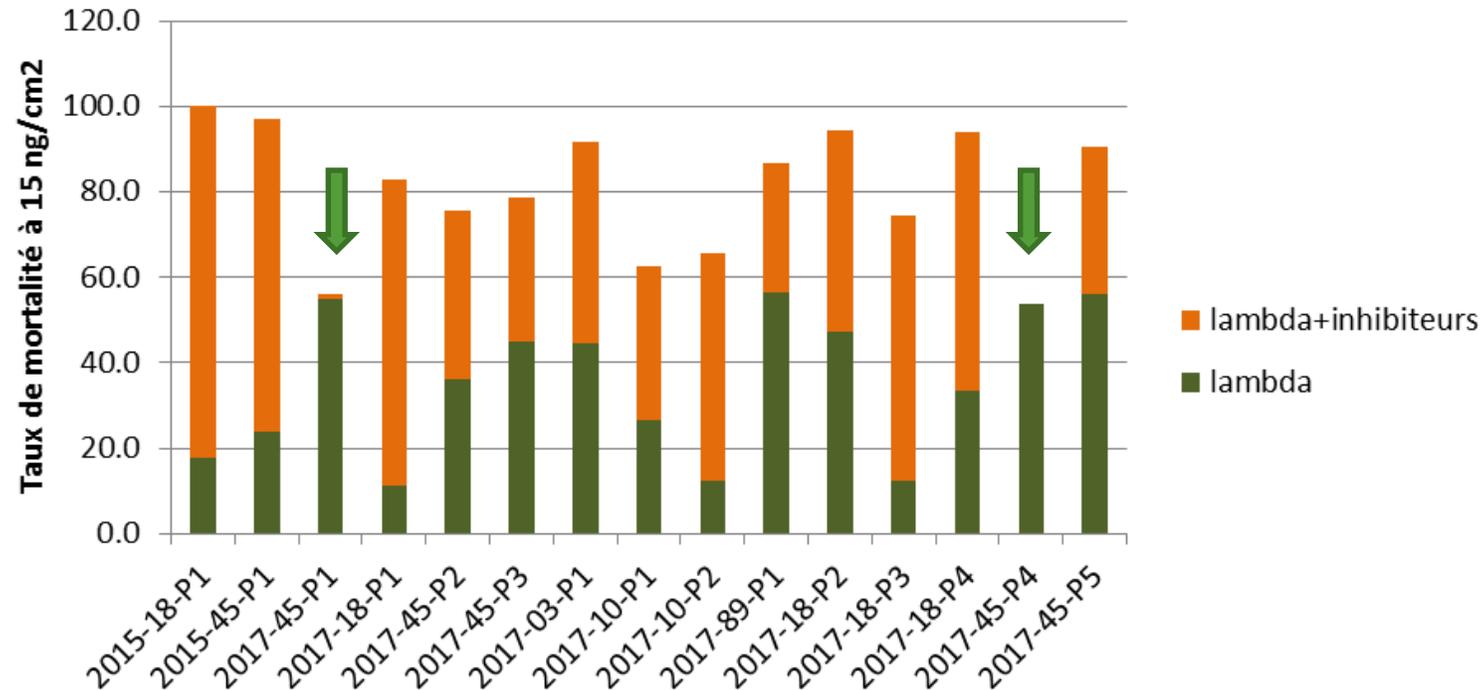
- Population où aucune mutation n'est présente
- Pop. où SKDR n'est pas présente et KDR est présente avec $RR < 30\%$
- Pop. où SKDR n'est pas présente et KDR est présente avec $30\% \leq RR < 80\%$
- Pop. où SKDR n'est pas présente et KDR est présente avec $80\% \leq RR$
- Pop. où SKDR est présente avec $RR < 30\%$
- Pop. où SKDR est présente avec $30\% \leq RR < 80\%$
- Pop. où SKDR est présente avec $80\% \leq RR$
- Populations analysées ou en cours au 21/09/2017



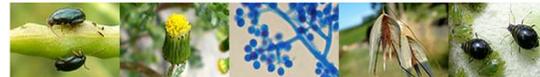
D'autres mutations pouvant conférer de la résistance ont été trouvées sporadiquement dans quelques populations
Pas de mutations SKDR détectées



Résistance métabolique



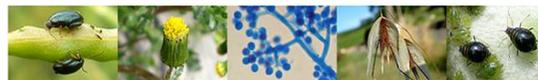
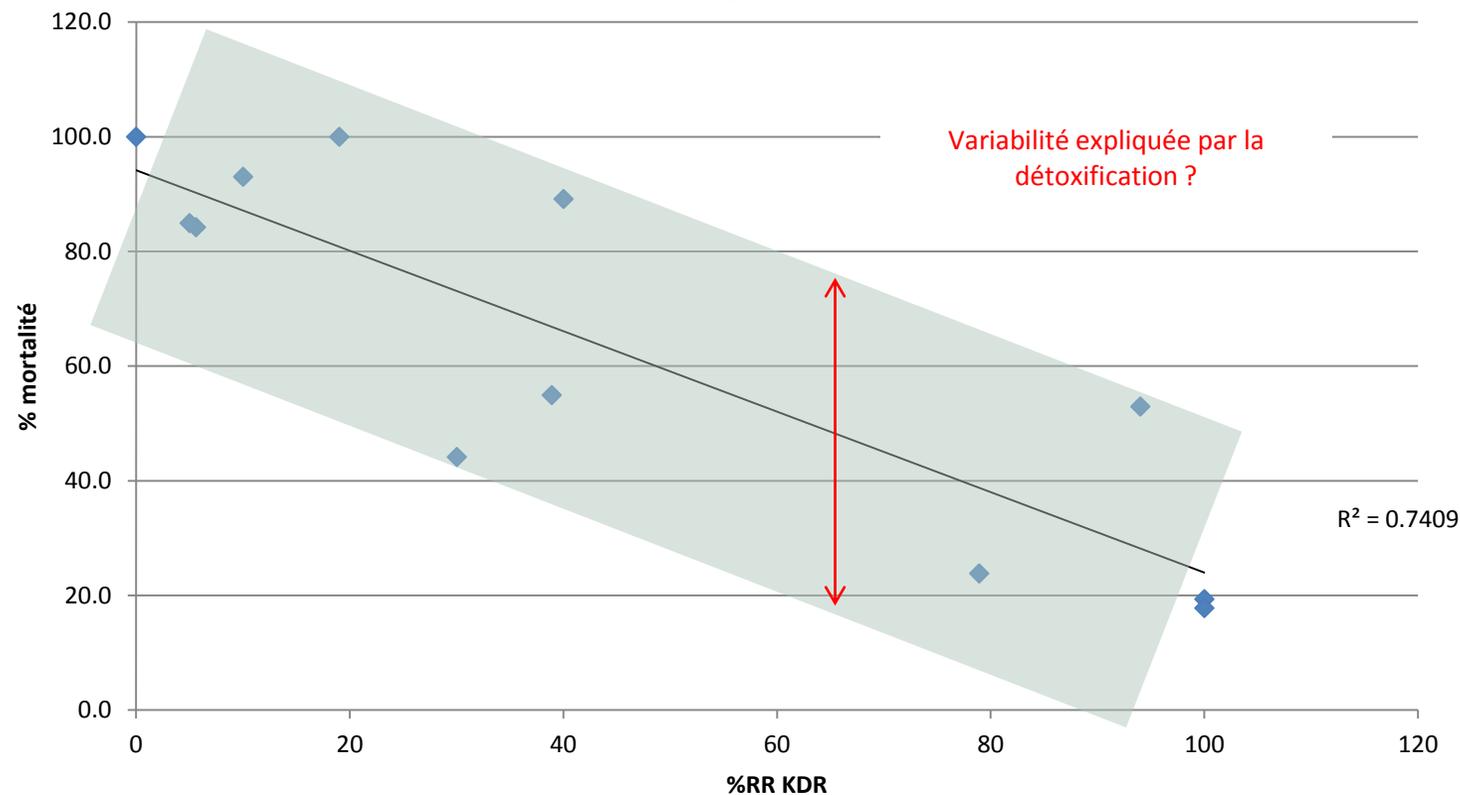
Résistance métabolique suspectée MAIS manque une courbe dose/mortalité en présence d'inhibiteurs pour pouvoir conclure de manière certaine





Corrélations

résultats tests flacons(% de mortalité à 15 ng/cm²) et % d'individus homozygotes KDR.



Conclusions

La pression de sélection importante = plusieurs mécanismes de résistance

Altises d'hiver résistantes aux pyréthrinoïdes sont présentes en Allemagne, au Royaume-Uni et au Danemark

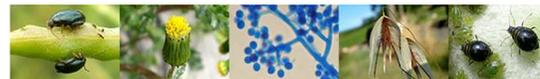
Poursuite des travaux:

Suivi de l'évolution de la résistance (mutations skdr secteur Yonne, résistance métabolique)

Lien entre résultats des tests flacons et mécanismes impliqués

Mise au point méthodologique (résistance métabolique)

TI étudie les leviers agronomiques alternatifs comme complément indispensable à la lutte chimique



Merci de votre attention

