

**RESISTANCE DE CIBLES AUX PYRETHRINOÏDES, CARBAMATES ET NEONICOTINOÏDES ET DIVERSITÉ
GÉNÉTIQUE DANS DES POPULATIONS DE *MYZUS PERSICAE* EN CULTURE DE BETTERAVE**

S. FONTAINE, L. CADDoux, B. BARRÈS

Université de Lyon, Anses, INRAE, USC CASPER, 69007 Lyon, France

Contact email : severine.fontaine@anses.fr

RÉSUMÉ

Myzus persicae, une espèce à fort potentiel évolutif, a développé de nombreuses résistances à diverses molécules insecticides. Le statut des résistances de cible des populations de *M. persicae* vivant en culture colza et pêcher en France est bien connu vis-à-vis des pyréthrinoides, des carbamates et des néonicotinoïdes. La situation vis-à-vis de la résistance à ces trois familles d'insecticides en culture de betterave restait à étudier. Cette étude a mis en évidence : i- l'omniprésence de divers allèles de résistance aux pyréthrinoides (mutations *kdr* et *skdr*) ; ii- l'occurrence assez élevée de l'allèle de résistance aux carbamates, *Mace*, qui reste néanmoins à une fréquence allélique modérée ; iii- l'absence de résistance de cible aux néonicotinoïdes (mutation R81T) ; iv- une assez forte clonalité des populations de *M. persicae* collectées ainsi que leur appartenance au groupe génétique inféodé aux hôtes secondaires (colza, tabac, etc.).

Mots-clés : génotypes de résistance, carbamate, pyréthrinoid, néonicotinoïde, microsatellite

SUMMARY

Myzus persicae, by its evolutionary potential, has evolved several resistances to various insecticide molecules. In France, the status of target's resistances to pyrethroids, carbamates and neonicotinoids of *M. persicae* populations in oilseed rape and peach crops is well-known but not in beet crops. So, the study of resistance to these three families of insecticides in beet crops has been performed. This report has shown four highlights: i- the omnipresence of various pyrethroid resistance alleles (*kdr* and *skdr* mutations); ii-the fairly high occurrence of the carbamate resistance allele, *Mace*, which nevertheless remains at a moderate allelic frequency; iii-the absence of target resistance to neonicotinoids caused by R81T mutation; iv- a fairly high clonality of sampled *M. persicae* populations and their affiliation of the majority of individuals to a genetic group already identified on secondary hosts (rape, tobacco, etc.).

Keywords: resistance genotype, carbamate, pyrethroid, neonicotinoid, microsatellite

INTRODUCTION

Myzus persicae (Sulzer, 1776) fait partie des pucerons les plus problématiques en agriculture. Réputé extrêmement polyphage, il est capable de coloniser un grand nombre d'espèces végétales ligneuses ou herbacées. Par ses piqûres pour prélever la sève, ce puceron occasionne des dégâts directs sur les feuilles (déformation, décoloration voire chute) mais aussi des dégâts indirects, en favorisant le développement de la fumagine et *via* la vécution de nombreuses viroses. Sous les climats tempérés, *M. persicae* est connu comme une espèce dont les populations réalisent un cycle de reproduction hétéroïque et holocyclique. Cela signifie que des cycles de reproduction sexuée, ayant lieu à l'automne sur les arbres du genre *Prunus*, alternent avec des cycles de reproduction parthénogénétique (asexuée) du printemps à l'automne sur un grand nombre d'hôtes secondaires herbacés. Dans les climats plus chauds et en l'absence de *Prunus*, seule la reproduction asexuée interviendrait (cycle anholocyclique). La coexistence de populations de cette espèce avec des degrés variables de ces deux types de cycle de reproduction a été mise en évidence (Vorburger *et al.*, 2003).

Son mode de reproduction par parthénogénèse dès le printemps en fait une espèce extrêmement dommageable pour les cultures qu'elle colonise. A ce jour, l'utilisation de produits phytosanitaires s'est montrée très efficace pour lutter contre ce ravageur mais l'application répétée de substances actives insecticides a conduit à des effets non intentionnels tels que la sélection d'individus résistants dans les populations. Ainsi, *M. persicae* a évolué des résistances à un grand nombre de familles insecticides impliquant différents types de mécanismes (détoxication, mutation des protéines ciblées par les insecticides) (Bass *et al.*, 2014).

En France jusqu'à leur interdiction en 2018, la lutte contre les pucerons en culture de betterave (et en particulier *M. persicae*) reposait principalement sur les néonicotinoïdes appliqués en traitement de semences. Suite à une résurgence de jaunisses, une dérogation a toutefois été accordée pour la période 2021-2023 afin de laisser à la filière un peu de temps pour trouver des alternatives aux néonicotinoïdes. Parmi ces alternatives, trois familles d'insecticides pourraient être utilisés à court terme dans la lutte contre les pucerons sur betterave. Deux anciennes familles de neurotoxiques, les carbamates et les pyréthrinoïdes ; et la famille plus récente des pyridinecarboxamides dont le seul représentant est autorisé sur betterave : la flonicamide. Ce potentiel report sur ces familles risque d'accroître les risques d'évolution de résistance au sein de ces familles. Cela est particulièrement préoccupant pour les deux plus anciennes familles : les carbamates et les pyréthrinoïdes. Chez *M. persicae*, la résistance aux insecticides a été particulièrement étudiée en France dans les populations vivant sur colza et sur pêcher et ce vis-à-vis des trois grandes familles d'insecticides neurotoxiques : les pyréthrinoïdes, les carbamates et les néonicotinoïdes. Des phénomènes de résistances ont été décrits pour ces trois familles d'insecticides. Ces mécanismes de résistance impliquent notamment des résistances liées à la modification de la cible de l'insecticide (Fontaine *et al.*, 2011 ; Fontaine et Caddoux, 2013). Concernant les pyréthrinoïdes, plusieurs mutations affectant le gène de la protéine ciblée par cette famille, le canal sodium, ont été identifiées. Elles sont toutes situées au niveau des segments 4 et 6 du deuxième domaine transmembranaire du canal sodium. L'une de ces mutations, nommée *kdr* ('knock down resistance'), affecte le codon 1014 de la protéine. Elle est responsable de la substitution d'une leucine par une phénylalanine (L1014F) (Martinez-Torres *et al.*, 1999). Une deuxième mutation située en position 918 est généralement trouvée conjointement avec *kdr*. Dans ce cas, la méthionine en position 918 est substituée par une thréonine (M918T). Ce codon peut également être concerné par d'autres substitutions, responsables d'une résistance aux pyréthrinoïdes, sans association avec la mutation *kdr*. Dans ce cas, la mutation conduit à la substitution de la méthionine par une leucine (M918L) (Fontaine *et al.*, 2011, Panini *et al.*, 2015). Les mutations affectant ce codon sont nommées *skdr* ('super knock down resistance') car elles conduisent le plus souvent à des niveaux très élevés de résistance aux pyréthrinoïdes (Eleftherianos *et al.*, 2008 ; Fontaine *et al.*, 2011). Toutes les mutations décrites sont dites dominantes et confèrent un phénotype résistant chez les individus hétérozygotes comme homozygotes. Pour les carbamates qui ciblent l'acétylcholinestérase 2, la résistance liée à une modification de la cible affecte le codon 431 de la protéine et conduit à la substitution d'une sérine par une phénylalanine (S431F ; Nabeshima *et al.*, 2003). Cette mutation, nommée *Mace* (pour 'Modified aceltychlonestérase'), est responsable d'une perte de sensibilité aux carbamates chez les individus hétérozygotes comme homozygotes (Nabeshima *et al.*, 2003). Enfin, pour les néonicotinoïdes qui se fixent sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, la résistance dite de cible affecte l'acide aminé 81 de la sous unité $\beta 1$ du récepteur et se traduit par la substitution d'une arginine par une thréonine (R81T ; Bass *et al.*, 2011). Il a été démontré que l'allèle de résistance R81T est partiellement récessif. C'est-à-dire que les individus hétérozygotes présentent une baisse de sensibilité aux néonicotinoïdes à un niveau moindre de celui attendu pour un allèle co-dominant (Mottet *et al.*, 2016).

En France, des suivis dans le cadre du plan de surveillance des résistances ont mis en évidence l'existence d'une diversité d'allèles de résistance à ces familles d'insecticides très différents entre les

populations vivant dans les vergers de pêcher et celles trouvées sur les cultures de colza. Dans les populations colonisant les cultures de colza, deux génotypes résistants aux pyréthriinoïdes ont été détectés. Un génotype dont les individus étaient porteurs simultanément de l'allèle de résistance aux carbamates (*Mace*) et d'un allèle de résistance aux pyréthriinoïdes impliquant une mutation *skdr* (M918L). Ce génotype représentait la grande majorité des individus analysés (80 %) (Roy *et al.*, 2013). Le second génotype était constitué d'individus porteur de l'allèle *kdr* (L1014F) et ils étaient donc uniquement résistants aux pyréthriinoïdes. En culture pêcher, la résistance aux pyréthriinoïdes était également omniprésente avec plusieurs allèles de résistance différents affectant le codon *kdr* et/ou *skdr*. La résistance aux néonicotinoïdes liée à la mutation R81T, absente en culture colza, était quant à elle très présente chez les pucerons analysés en culture pêcher à l'état hétérozygote ($\approx 55\%$) ou homozygotes ($\approx 25\%$) (Fontaine et Caddoux, 2013).

Compte tenu d'une part du statut dérogatoire des néonicotinoïdes en enrobage de semence de betterave seulement jusqu'en 2023, et d'autre part de la réduction des modes d'action disponibles, il paraît stratégique d'étudier l'occurrence des divers allèles de résistance connus vis-à-vis des pyréthriinoïdes, des carbamates et des néonicotinoïdes dans les populations de *M. persicae* sur cette culture en France. En complément de la recherche des marqueurs de résistance aux insecticides, l'analyse de marqueurs génétiques microsatellites neutres (c-à-d non soumis à sélection) a été réalisée. Ces marqueurs sont des séquences de quelques nucléotides répétées plusieurs fois en tandem qui permettent d'analyser la structuration et la diversité génétique des populations de *M. persicae* et d'étudier d'éventuels flux de gènes entre des populations vivant sur d'autres cultures hôtes. L'ensemble de ces informations visent à apporter des connaissances pour la gestion actuelle et future des résistances aux insecticides chez ce ravageur.

MATERIELS ET METHODES

PRÉLÈVEMENTS DE TERRAIN

Chacun des prélèvements réalisés sur le terrain étaient constitués de 30 à 40 plantes ou feuilles provenant de plantes indépendantes, infestées par *M. persicae* et réparties aléatoirement dans la parcelle. En 2020, compte tenu de la situation liée à la pandémie, le protocole d'envoi des prélèvements a été modifié pour certains prélèvements : les pucerons ont été placés dans l'alcool 96° non dénaturé par les préleveurs puis envoyés au laboratoire. La Figure 1 présente la répartition des prélèvements reçus en fonction de leur origine géographique. Entre 2018 et 2020, 27 prélèvements de *M. persicae* ont été échantillonnés dans des parcelles de betteraves.

Pour tous les prélèvements, l'objectif était de collecter 30 pucerons. Cet objectif n'a pas forcément été atteint (faible infestation de certains prélèvements, mort des pucerons lors de leur acheminement). *In fine*, 592 pucerons ont été échantillonnés (en moyenne 21.9 ± 9.05 pucerons par parcelle) sur les trois années d'échantillonnage. Les pucerons vivants ont été sélectionnés après identification de l'espèce sous loupe binoculaire, puis placés individuellement dans des tubes Eppendorf de 2 ml et stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des acides nucléiques.

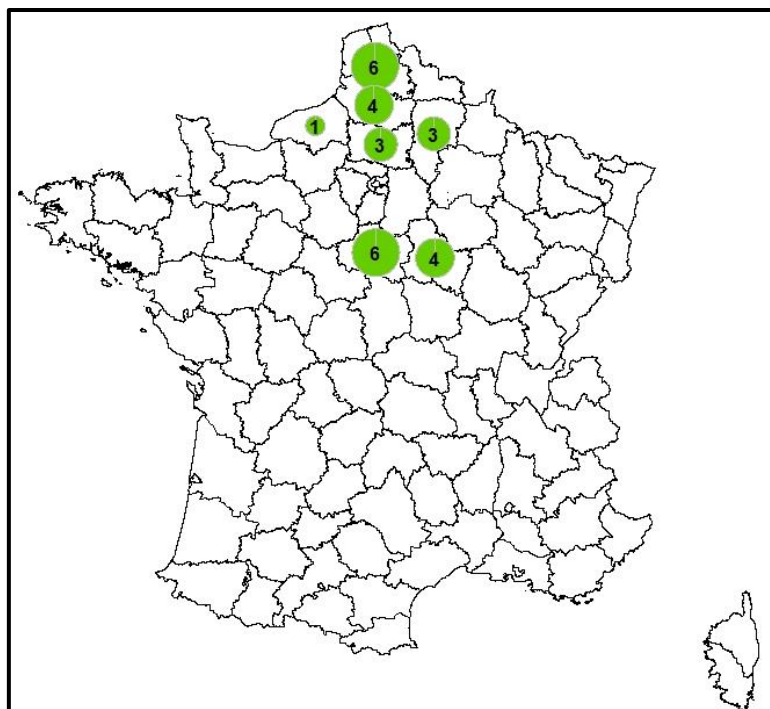


Figure 1 : Répartition géographique des prélèvements de *M. persicae* réalisés sur betterave de 2018 à 2020. Le diamètre des disques est proportionnel au nombre de prélèvements reçus par département.

Figure 1: Geographic distribution of *M. persicae* samples taken from beet from 2018 to 2020. The diameter of the disc is proportional to the number of samples received per department.

ANALYSES BIOMOLECULAIRES

Extraction des acides nucléiques

Les extractions d'ADN pour la recherche des différentes résistances de cibles aux insecticides ont été réalisées avec le kit nucleospin tissus de chez Macherey-Nagel. Les détails concernant les protocoles d'extraction des acides nucléiques sont disponibles auprès de l'auteur.

Recherche des allèles de résistance

- Recherche des mutations kdr et skdr du canal sodium voltage dépendant

Les PCR réalisées visent à amplifier une portion du gène du canal sodium, comprenant une partie des segments 5 à 6 du deuxième domaine transmembranaire, connue pour être susceptible de contenir le fréquemment des mutations impliquées dans la résistance aux pyréthrinoides. L'amplification d'une portion du canal sodium a été obtenue comme décrit précédemment à l'aide des amorces kdr-F1 and kdr-R4 (Cassanelli *et al.*, 2005). Les produits de PCR obtenus ont été séquencés avec l'amorce antisens *via* la méthode Sanger par Genewiz (Leipzig, Allemagne) ou Genoscreen (Lille, France).

- Recherche de la mutation Mace de l'acétylcholinestérase

La recherche de la mutation *Mace* (S431F) sur le gène de l'acétylcholinestérase 2 a été réalisée par PCR-dCAPS comme décrit précédemment (Fontaine *et al.*, 2011). Les analyses des produits PCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil à électrophorèse capillaire Qiaxcel de Qiagen (Venlo, Pays Bas).

- Recherche de la mutation R81T de la sous unité $\beta 1$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine

La recherche de la mutation R81T a été réalisée par PCR-dCAPS comme déjà décrit (Mottet *et al.*, 2016). Les analyses des produits PCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil à électrophorèse capillaire Qiaxcel de Qiagen.

- Génotypage microsatellite

Pour 174 des pucerons échantillonnés, un génotypage neutre à l'aide de 14 marqueurs microsatellites polymorphes a été réalisé par l'INRAE de Rennes. La combinaison de l'information obtenu pour les 14 microsatellites permet de définir des génotypes multilocus (ou MLG). Une méthode individu centrée de clusterisation Bayésienne a été utilisée afin de décrire la structure génétique des populations prélevées sur betteraves à l'aide du logiciel STRUCTURE v2.3.4. Le model sous-jacent autorisait l'admixture et la corrélation des fréquences alléliques. Le nombre de groupe choisi *a priori* varié entre K=1 à K=7. Cinq répétitions pour chaque valeur de K ont été réalisées. L'analyse a été effectuée sur un jeu de données corrigées pour la clonalité (c'est-à-dire que lorsqu'un MLG était retrouvé plusieurs fois, une seule copie de ce MLG a été retenue pour le jeu de donnée final). En plus des individus prélevés sur betteraves, des individus prélevés sur pêcher, sur colza et dans un piège à succion ont été inclus dans cette analyse à titre de référence. La valeur optimale de K a été déterminée par la méthode des delta-K (Evanno *et al.*, 2005). Un individu est considéré comme appartenant à un groupe génétique s'il est assigné à celui-ci avec un seuil supérieur ou égal à 75%.

RESULTATS

Recherche des allèles de résistance *kdr* et *skdr* aux pyréthrinoides

A partir des 27 prélèvements reçus entre 2018 et 2020, 592 pucerons ont pu être échantillonnés et analysés. Un nombre important de pucerons (environ 50 %) n'a pas donné de résultats exploitables pour l'un des deux codons ou pour les deux. Ces échecs d'analyses sont imputables à la modification en urgence du protocole de prélèvement en 2020 pendant le confinement. En effet, près de 95 % des échecs d'analyses étaient concentrés sur les pucerons collectés en 2020. Les modalités choisies n'ont certainement pas permis une conservation optimale des individus ce qui a pu nuire à l'extraction des ADN. La PCR réalisée pour le génotypage de ces mutations *kdr* et *skdr* étant plus sensible à la qualité des extraits, un taux d'échec conséquent a été observé pour ces analyses. Pour deux prélèvements, aucun puceron n'a pu être génotypé avec succès.

L'analyse des séquençages a permis d'obtenir des résultats exploitables pour 322 pucerons pour le codon *kdr*. L'allèle de résistance *kdr* (L1014F) a été détecté à l'état hétérozygote chez 39,4 % des pucerons analysés. Il est intéressant de noter que les individus hétérozygotes pour la mutation L1014F étaient dans leur grande majorité (90 %) également hétérozygotes pour la mutation L932F. Cette mutation a initialement été identifiée en association avec une autre mutation (T929I) chez le pou de tête *Pediculus humanus capitis* (Gao *et al.*, 2003). Ce déséquilibre de liaison entre L1014F et L932F observé dans notre échantillonnage avait déjà été décrit dans des populations de *M. persicae* vivant sur colza.

Pour le codon *skdr*, 259 pucerons ont donné des résultats exploitables. Parmi ces pucerons, 53,6% d'entre eux étaient hétérozygotes et porteurs de l'allèle M918L ; 43,2 % étaient homozygotes avec l'allèle sauvage pour ce codon 918 (MM) et 3,2 % étaient porteurs d'autres mutations telles que M918I et M918T, ou d'association d'allèle de résistance telle que le cumul des mutations M918L et M918T chez un même individu. La mutation M918I, elle n'a été détectée que chez un seul individu. Cette mutation a déjà été décrite chez *Plutella xylostella* Linnaeus (Sonada *et al.*, 2006 ; Sonada *et al.*, 2012), *Aphis glycine* Matsumura (Pires *et al.*, 2021) et *Cimex hemipterus* Fabricius (Zhao *et al.*, 2020) où elle était associée avec L1014F ainsi que chez *M. persicae* en présence ou non de la mutation L1014F (Singh *et al.*, 2021). Dans notre échantillonnage, l'individu génotypé M918I ne possédait aucune autre

mutation. Une validation de l'impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité vis-à-vis des pyréthréinoïdes chez *M. persicae* reste nécessaire pour statuer sur le phénotype de cet individu.

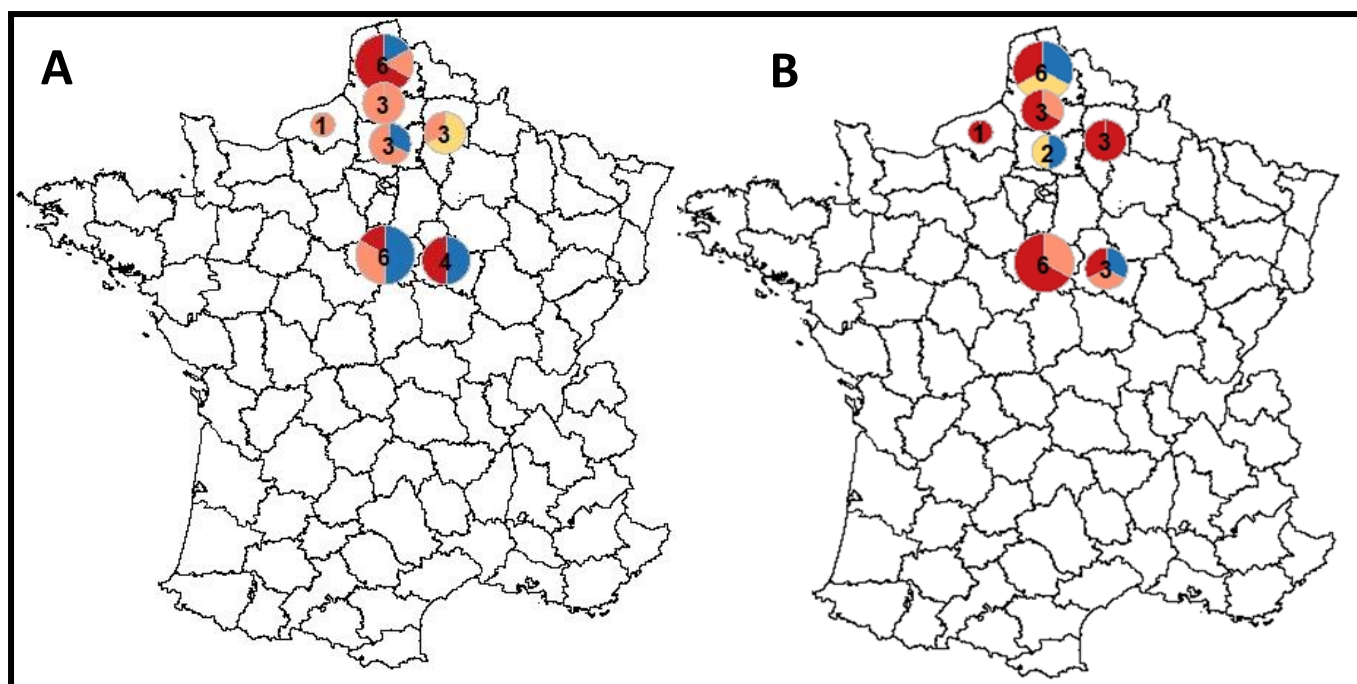


Figure 3 : Répartition des différents génotypes observés dans les populations de *M. persicae* pour les codons 1014 (A- mutation *kdr*) et 918 (B-mutation *skdr* M918L) du gène du canal sodium voltage dépendant. En jaune, saumon et rouge les prélèvements où, respectivement, moins de 25 %, de 25 à 50 %, et plus de 50 % des pucerons portent une mutation *kdr* (A) ou *skdr* (B). En bleu les prélèvements où la mutation *kdr* (A) ou *skdr* (B) n'a pas été détectée. Le diamètre des disques est proportionnel au nombre de prélèvements reçus par département.

Figure 3: Geographic distribution of the different genotypes observed in *M. persicae* populations for codons 1014 and 918 of the voltage-dependent sodium channel gene. In yellow, salmon and red are the samples where, respectively, less than 25%, from 25 to 50%, and more than 50% of the aphids present had the *kdr* (A) or *skdr* (B) mutation. The diameter of the discs is proportional to the number of samples received per department.

Concernant la répartition géographique de ces allèles de résistance, la mutation *kdr* (L1014F) a été détectée dans tous les départements échantillonnés et elle était présente dans près de 75% des parcelles prélevées (Figure 3A). Plus d'un quart des populations analysées avait une fréquence d'individus porteur de la mutation *kdr* supérieur à 50%. Pour les mutations affectant le codon 918, 83 % des parcelles possédaient des pucerons avec des mutations affectant ce codon. La mutation M918L a également été détectée dans tous les départements échantillonnés (Figure 3B). Plus de la moitié des populations analysées avait une fréquence d'individus porteur de la mutation *skdr* supérieur à 50%.

Recherche de l'allèle de résistance *Mace* (S431F) aux Carbamates

La recherche de la résistance de cible aux carbamates a pu être réalisée avec succès pour 450 pucerons (18, 98 et 342 pucerons respectivement en 2018, 2019 et 2020). L'allèle de résistance aux carbamates a été détecté dans 28 % de notre échantillonnage. Tous les pucerons sont hétérozygotes pour cette mutation. L'allèle *Mace* bien qu'à une fréquence modérée dans notre échantillonnage est présent dans plus des ¾ des populations analysées. Les pucerons porteurs de cet allèle sont majoritaires dans deux

des populations analysées et totalement absent dans deux autres populations. Enfin, 40 % des populations ont une fréquence de puceron résistant *Mace* inférieur à 25 %. En conclusion, l'occurrence de l'allèle *Mace* (i.e. : sa présence dans les populations) est importante mais la fréquence allélique (i.e. : pourcentage de cet allèle dans l'ensemble de l'échantillonnage) reste modérée (0,14).

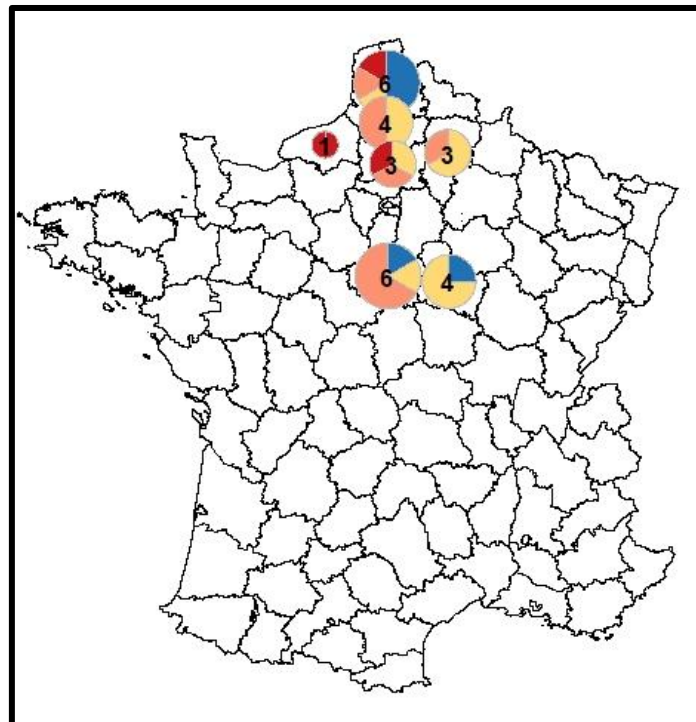


Figure 4 : Répartition géographique des pucerons porteurs de la mutation *Mace* (S431F) de l'acétylcholinestérase dans les populations de *M. persicae* en culture betteraves. En bleu les prélèvements dans lesquels l'allèle *Mace* est absent. En jaune, saumon et rouge les prélèvements où, respectivement, moins de 25 %, de 25 à 50 %, et plus de 50 % des pucerons présents avaient la mutation *Mace*. Le diamètre des disques est proportionnel au nombre de prélèvements reçus par département.

Figure 4: Geographic distribution of aphids carrying the *Mace* (S431F) mutation in acetylcholinesterase, in *M. persicae* populations in beet crops. In blue the samples without *Mace* allele. In light pink, salmon and red the samples where at less than 25 %, from 25 to 49 %, and at least 50 % of the aphids had the *Mace* mutation, respectively. The diameter of the discs is proportional to the number of samples received per department.

Recherche de l'allèle de résistance R81T aux néonicotinoïdes

La recherche de la mutation R81T affectant le récepteur nicotinique a été recherchée uniquement dans les prélèvements réceptionnés en 2020 soit dans 16 parcelles. Sur les 429 pucerons analysés, 378 ont donné des résultats exploitables. La mutation R81T n'a été détecté dans aucun des pucerons.

Génotypage microsatellite

Le génotypage de 174 pucerons, réalisé à l'aide de 14 marqueurs neutres (microsatellites), a permis d'identifier 55 MLG, c'est-à-dire 55 clones différents. 35 MLG ont été trouvés en un exemplaire unique et 20 ont été identifiés plus d'une fois. Trois MLG sont plus particulièrement fréquents. Un de ces MLG nommé ici MLG-BET42, représentant 17 % de notre échantillonnage, il avait déjà été fréquemment identifié dans les prélèvements de colza analysés précédemment (Roy *et al.*, 2013). C'est donc un MLG qui serait capable de

coloniser ces deux cultures. Le second MLG, MLG-BET33 représentent 12 % des pucerons analysés en MLG et le troisième 9 % (MLG_BET6). La diversité génotypique, c'est-à-dire, le nombre de MLG différents génotypés divisé par le nombre d'individus analysés est de 0,32. L'analyse par clusterisation Bayésienne montre que tous les MLG, à l'exception d'un, appartiennent au groupe génétique inféodé aux hôtes secondaires (colza, tabac, ...).

Combinaison des allèles de résistance et des marqueurs microsatellites

Dans notre échantillonnage, 225 pucerons ont été complètement génotypés pour les différents allèles de résistance recherchés (*Mace*, R81T, *kdr*, *skdr*). La combinaison des différents allèles de résistance a permis d'identifier 6 génotypes de résistance différents. Trois combinaisons d'allèles de résistance représentent plus de 90 % de notre échantillonnage. La combinaison majoritaire est composée des pucerons porteurs uniquement de l'allèle *kdr* associé à L932F (40,4 %), les deux autres génotypes sont constitués des pucerons porteurs de l'allèle *skdr* M918L, seul (29,3 %) ou associé à l'allèle de résistance *Mace* (21,8 %). Le reste de l'échantillonnage est composé de pucerons n'ayant que l'allèle *kdr*, ou cumulant plusieurs mutations : la mutation *Mace* avec *kdr* associé à L932F, ou l'allèle *kdr* associé à plusieurs allèles *skdr* (présence conjointe de M918L et M918T). Seul 1,1 % des pucerons de notre échantillonnage ne possédaient aucun allèle de résistance.

Parmi ces 225 pucerons, 95 ont pu être génotypés complètement à la fois pour les différents allèles de résistance recherchés et les marqueurs microsatellites. Le MLG le plus fréquent (MLG-BET42) a été identifié majoritairement (68.2%) chez les pucerons porteurs de l'association *Mace* + *skdr* M918L. Les deux autres MLG les plus fréquents MLG-BET33 et MLG-BET6 sont identifiés, respectivement, chez des pucerons cumulant la mutation *kdr* associée à la mutation L932F et, majoritairement, chez des pucerons ayant l'allèle M918L seul (Tableau 1).

Combinaison des allèles de résistance	MLG														Total
	MLG_ BET3	MLG_ BET6	MLG_ BET20	MLG_ BET21	MLG_ BET23	MLG_ BET26	MLG_ BET28	MLG_ BET32	MLG_ BET33	MLG_ BET35	MLG_ BET42	MLG_ BET44	MLG_ BET50	MLG uniques	
MACE + skdr 918ML	1										15	2	1	3	22
MACE + kdr 1014LF + 932LF											1	1			2
skdr 918ML	4	9									6	2	1	5	27
kdr 1014LF + 932LF			3	5	3	5	2	2	8	2				13	43
pas d'allèle de résistance		1													1
Total général	5	10	3	5	3	5	2	2	8	2	22	5	2	21	95

Tableau 1 : Répartition des *M. persicae* collectés en culture de betterave de 2018 à 2020 en fonction de la combinaison des allèles de résistance et de leur MLG

Table 1: Distribution of *M. persicae* collected in beet crops from 2018 to 2020 according to the combination of resistance alleles and their MLG

DISCUSSION ET CONCLUSION

La recherche de différents allèles de résistance à trois grandes familles d'insecticides neurotoxiques dans des populations de *M. persicae* vivants sur betteraves a mis en évidence d'une part, l'omniprésence de la résistance aux pyréthrinoïdes, d'autre part, la présence dans un peu moins d'un tiers de notre échantillonnage d'individus résistants aux carbamates et, enfin, l'absence de l'allèle R81T impliqué dans la résistance de cible aux néonicotinoïdes.

La résistance aux pyréthrinoïdes s'explique par la présence de deux allèles de résistance différents sur deux loci différents : *kdr* (L1014F) et *skdr* (M918L). Seul 2,2% des individus ne possèdent aucun de ces allèles de résistance et sont donc considérés comme sensibles aux pyréthrinoïdes. L'utilisation des pyréthrinoïdes dans ces populations est donc à proscrire. Il est très rare que ces deux allèles soient portés par un même individu. La quasi-totalité des pucerons sont hétérozygotes et porteurs de l'un

ou l'autre de deux allèles dominants chez *M. persicae* (*kdr* et *skdr* M918L). Cela pourrait être lié à un coût en termes de fitness de la combinaison de ces deux mutations au sein d'un même individu.

Près d'un quart de notre échantillonnage cumule à la fois une résistance aux pyréthrinoides et aux carbamates. Ce cumul de résistance avait déjà été observé à une très forte fréquence (80 %) dans des populations collectées en culture colza au début des années 2010 (Roy *et al.*, 2013) et dans une moindre mesure en culture de pomme de terre en Belgique plus récemment (33,5% - Mingeot *et al.*, 2021). Cette forte association entre ces deux allèles de résistance est principalement liée à la présence à une fréquence importante d'un clone (nommé ici MLG_BET42) qui combine ces 2 résistances de cible. Ce clone avait déjà été identifié dans les précédents monitorings réalisés au cours des années 2000 jusqu'au début des années 2010. Seule la combinaison d'allèles *Mace* + *skdr* M918L avait alors été identifiée chez ce MLG. La dominance de ce MLG doublement résistants a sans doute était favorisée par l'utilisation de Produits de Protection des Plantes combinant les deux substances actives (Roy *et al.*, soumis). Dans ce monitoring, d'autres combinaisons d'allèles sont présentes chez ce MLG indiquant une évolution du spectre de résistances au sein de ce clone qui pourrait être consécutive à l'évolution des pratiques, notamment le retrait du pirimicarbe en application en solo en plein champ en 2016. Cela pourrait avoir diminué la pression de sélection vis-à-vis de cette substance active et expliquerait la baisse de la fréquence de l'allèle *Mace* au sein de ce clone et plus largement au sein des populations de *M. persicae* vivant sur hôtes cultivés herbacés.

La résistance de cible aux néonicotinoïdes impliquant la mutation R81T du récepteur nicotinique reste absente des populations analysées en culture de betterave et ce malgré l'utilisation continue et sur une écrasante majorité des surfaces de betterave sucrière depuis plus de 10 ans de ceux-ci. L'absence de résistances de cible aux néonicotinoïdes en culture de betterave contraste avec le fait que l'allèle de résistance R81T est présent en France en culture pêcher depuis près de 10 ans et que l'occurrence de cette mutation est rapportée dans plusieurs cultures herbacées en Europe et dans le bassin méditerranéen (Charaabi *et al.*, 2018, Panini *et al.*, 2014). L'absence de détection de R81T dans les populations analysées pourrait s'expliquer en partie par le mode d'application de cette famille chimique en culture de betterave sucrière mais aussi par les différences de cycle biologique observés dans les populations issues d'hôtes primaires ou secondaires. L'enrobage des semences par rapport à des applications par pulvérisation permettrait d'avoir une meilleure efficacité et limiterait ainsi le risque de sélection graduelle d'individus résistants. De plus, l'analyse des génotypes neutres montre que l'échantillonnage appartient majoritairement à un groupe génétique déjà identifié et trouvé sur hôtes secondaires (colza, tabac, ...). L'analyse de la structure des populations échantillonnées montre une assez forte clonalité bien que celle-ci soit moindre que celle reportée précédemment en culture colza ($G/N = 0,32$ vs $0,1$ Roy *et al.*, 2013). La reproduction majoritairement clonale et la spécialisation sur hôtes secondaires des populations identifiées en culture de betterave limiteraient le brassage d'allèles, notamment avec les populations sur pêcher où la reproduction sexuée est majoritaire, et aurait ainsi empêché la dispersion de l'allèle R81T dans ces populations.

En conclusion, notre étude présente un état des lieux des résistances de cible, vis-à-vis de trois familles d'insecticides, dans les populations vivant dans les cultures de betterave. Etant donné l'importance des fréquences de génotype résistants aux pyréthrinoides dans les populations étudiées, il est très probable que l'efficacité de ce type de traitement soit fortement affectée. L'usage des pyréthrinoides sur cette culture doit donc être évité. Nous avons également pu mettre en évidence que les populations de *M. persicae* présentes sur betterave appartiennent au même groupe génétique que les populations que l'on peut trouver sur colza ou tabac, indiquant que des flux de gènes importants existent entre les populations sur betteraves et sur ces deux autres cultures. Celles-ci partagent d'ailleurs un certain nombre de clones avec des profils de résistances de cibles similaires. Cela souligne que la gestion des résistances chez *M. persicae* doit être raisonnée non pas seulement à l'échelle d'une

culture, mais plutôt pour l'ensemble des cultures herbacées sur lesquelles ces populations se développent.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Jean-Christophe Simon et Frédérique Mahéo de IGEPP à l'INRAE pour la réalisation de analyses MLG, Jacques Grosman, expert national vigne et animateur du réseau des experts nationaux de la protection des végétaux ainsi que toutes les personnes qui ont participé à la collecte et à l'envoi des prélèvements.

BIBLIOGRAPHIE

- Bass C., Puinean A.M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias, J., *et al.*, 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *Bmc Neuroscience*, 12, 1-11
- Bass C., Puinean A.-M., Zimmer C.T., Denholm I., Field L.-M., Foster, S.P., *et al.*, 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 51, 41-51
- Cassanelli S., Cerchiari B., Giannini S., Bizzaro D., Mazzoni E., Manicardi G.-C., 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing *Mace* and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 61, 91-96
- Charaabi K., Boukhris-Bouhachem S., Makni M., Denholm I., 2018. Occurrence of target-site resistance to neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae* in Tunisia, and its status on different host plants. *Pest management science*, 74, 1297-1301
- Eleftherianos I., Foster S., Williamson M., Denholm I., 2008. Characterization of the M918T sodium channel gene mutation associated with strong resistance to pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research*, 98, 183-191
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14, 2611-2620
- Fontaine S., Caddoux L., 2013. Résistance du puceron vert de pêcher (*Myzus persicae*) vis-à-vis des pyrèthroïdes et des néonicotinoïdes - Anses Lyon, 12 pp. (Lyon A, ed.).
- Fontaine S., Caddoux L., Brazier C., Bertho C., Bertolla P., Micoud A., *et al.*, 2011. Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. *Pest management science*, 67, 881-885
- Gao J.R., Yoon K.-S., Lee S.H., Takano-Lee M., Edman J.D., Meinking T.L., *et al.*, 2003. Increased frequency of the T929I and L932F mutations associated with knockdown resistance in permethrin-resistant populations of the human head louse, *Pediculus capitis*, from California, Florida, and Texas. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77, 115-124
- Martinez-Torres D., Foster S., Field L., Devonshire A., Williamson M., 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)(Hemiptera: Aphididae). *Insect molecular biology*, 8, 339-346
- Mingeot D., Hautier L., Jansen J.P., 2021. Structuration of multilocus genotypes associated with insecticide resistance of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in potato fields in southern Belgium. *Pest Management Science*, 77, 482-491
- Mottet C., Fontaine S., Caddoux L., Brazier C., Mahéo F., Simon J.-C., *et al.*, 2016. Assessment of the dominance level of the R81T target resistance to two neonicotinoid insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of economic entomology*, 109, 2182-2189

- Nabeshima T., Kozaki T., Tomita T., Kono Y., 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 15-22
- Panini M., Anaclerio M., Puggioni V., Stagnati L., Nauen R., Mazzoni E., 2015. Presence and impact of allelic variations of two alternative *s-kdr* mutations, M918T and M918L, in the voltage-gated sodium channel of the green peach aphid *Myzus persicae*. *Pest management science*, 71, 878-884
- Panini M., Dradi D., Marani G., Butturini A., Mazzoni E., 2014. Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*. *Pest management science*, 70, 931-938
- Pires Paula D., Lozano R.-E., Menger J.-P., Andow, D.-A., Koch R.-L., 2021. Identification of point mutations related to pyrethroid resistance in voltage-gated sodium channel genes in *Aphis glycines*. *Entomologia Generalis*, 41, 243-255
- Roy L., Fontaine S., Caddoux L., Micoud A., Simon, J.-C., 2013. Dramatic changes in the genotypic frequencies of target insecticide resistance in French populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) over the last decade. *Journal of economic entomology*, 106, 1838-1847
- Roy L., Barrès B., Capderrey C., Mahéo F., Micoud A., Hullé M, Simon J.-C.. Host plant species and insecticides shape the evolution of genetic and clonal diversity in a major aphid crop pest. (soumis)
- Singh K.S., Cordeiro E.-M.-G., Troczka B.-J., Pym, A., Mackisack J., Mathers T.-C., *et al.*, 2021. Global patterns in genomic diversity underpinning the evolution of insecticide resistance in the aphid crop pest *Myzus persicae*. *Communications Biology*, 4, 847
- Sonoda S., Igaki C., Ashfaq M., Tsumuki H., 2006. Pyrethroid-resistant diamondback moth expresses alternatively spliced sodium channel transcripts with and without T929I mutation. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36, 904-910
- Sonoda S., Shi X., Song D., Zhang Y., Li J., Wu G., *et al.*, 2012. Frequencies of the M918I mutation in the sodium channel of the diamondback moth in China, Thailand and Japan and its association with pyrethroid resistance. *Pesticide biochemistry and physiology*, 102, 142-145
- Vorburger C., Lancaster M., Sunnucks P., 2003. Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two 'superclones' in Victoria, Australia. *Molecular ecology*, 12, 3493-3504
- Zhao Y., Feng X., Li M., Qiu X., 2020. The double-mutation (M918I+ L1014F) *kdr* allele is fixed in *Cimex hemipterus* populations in Guangxi, China. *Bulletin of entomological research*, 110, 506-511