



HAL
open science

Combinaisons, caractéristiques et origines de mécanismes de résistance aux (bio)insecticides chez des insectes ravageurs des cultures

Myriam Siegwart

► **To cite this version:**

Myriam Siegwart. Combinaisons, caractéristiques et origines de mécanismes de résistance aux (bio)insecticides chez des insectes ravageurs des cultures. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0366 . tel-03651781

HAL Id: tel-03651781

<https://theses.hal.science/tel-03651781>

Submitted on 26 Apr 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536

Agrosciences & Sciences

Unité Plantes et Systèmes de culture Horticoles (PSH)

Présentée par

Myriam Siegart

Combinaisons, caractéristiques et origines de mécanismes de résistances aux (bio)insecticides chez des insectes ravageurs des cultures

Soutenue publiquement le 15/12/2021 devant le jury composé de :

Mme Hélène Delatte, Chargée de recherche, Cirad **Rapporteuse**

Mme Lise Roy, Maître de conférences, Univ. Paul Valéry Montpellier 3 **Rapporteuse**

M Thomas Boivin, Chargé de recherche, Inrae **Examineur**

M Miguel Ferber-Lopez, Directeur de recherche, Ecole des Mines d'Alès **Examineur**

Mme Valérie Raymond, Professeure, Univ Angers **Examinatrice**

Mme Claire Lavigne, Directrice de recherche, Inrae **Directrice de thèse**

M Bertrand Gauffre, Chargé de recherche, Inrae **Invité**

Mme Gaëlle Legoff, Chargée de recherche, Inrae **Invitée**

The logo of INRAE, featuring the text 'INRAE' in a bold, teal, sans-serif font.

“Ce qui ne nous tue pas nous rend plus fort”

Friedrich Nietzsche - *Crépuscule des idoles*.

Résumé

Certains insectes lorsqu'ils sont soumis à de fortes pressions insecticides développent la capacité à survivre à ces toxiques. Ce phénomène adaptatif appelé résistance aux insecticides est un exemple de microévolution. Grâce à l'étude de divers modèles biologiques j'ai abordé des questions concernant (i) les types de mécanismes de résistance et leur importance dans élaboration de stratégies de gestion sur le terrain ; (ii) l'anticipation et l'étude de résistances à des produits de biocontrôle pour augmenter leur durabilité; et (iii) les bases génétiques des résistances. Les études menées sur deux lépidoptères ravageurs : *Grapholita molesta* (Tortricidae) et *Ostrinia nubilalis* (Pyralidae) mettent en avant des mécanismes de résistances complexes et variables entre populations, basés sur des panels de combinaisons d'augmentation d'activité d'enzymes de détoxication et de mutation de la cible moléculaire de l'insecticide. Les recherches sur la préexistence de résistance à deux extraits naturels de plantes (l'acide 3,5-dicafféoyl quinique et l'acide dicafféoyl tartrique) avec des propriétés aphicides chez plusieurs espèces de pucerons ont montré (i) de faibles différences de sensibilités entre clones ou populations de *Myzus persicae* (Aphididae) possiblement en lien avec la taille des individus (ii) une insensibilité d'un clone d'*Aphis craccivora* (Aphididae). Aucune résistance croisée entre insecticides de synthèse et ces extraits naturels n'a été détectée. Les recherches sur le coût de la résistance de *Cydia pomonella* (Tortricidae) à l'isolat M de *Cydia pomonella GranuloVirus* (CpGV-M), un biopesticide largement utilisé, ont montré un faible coût limitant les possibilités de gestion de cette résistance. Enfin, l'étude génomique des bases génétiques des résistances de *C. pomonella* à la deltaméthrine, au thiaclopride, au phosmet et au CpGV-M montre que le gène *CYP6B2* est responsable de résistances croisées entre deux molécules de synthèse et que le déterminant majeur de la résistance au virus est situé dans la zone des 53 600 000 pb sur le chromosome 1.

La complexité des mécanismes de résistance complique leur gestion sur le terrain. L'utilisation des connaissances et des techniques acquises dans l'étude des résistances aux insecticides de synthèse est pertinente et souhaitable pour améliorer la durabilité des insecticides d'origine naturelle. L'étude des bases génétiques par des techniques de génomique confirme l'existence de convergences géniques, les mécanismes de résistance étant souvent comparables entre espèces et ouvre de nombreuses perspectives de recherche.

Mots clés : Mécanisme de résistance, bases génétiques, détoxication, cible moléculaire, durabilité, extrait naturel, biotests, dosage enzymatique, génomique, Virus entomopathogènes

Abstract

Some insects, when subjected to high insecticide pressure, develop the ability to survive these toxins. This adaptive phenomenon called insecticide resistance is an example of microevolution. Through the study of various biological models I have addressed questions concerning (i) the types of resistance mechanisms and their importance in the development of field management strategies; (ii) the anticipation and study of resistance to biocontrol products in order to increase their sustainability; and (iii) the genetic basis of resistance. Studies conducted on two lepidopteran pests: *Grapholita molesta* (Tortricidae) and *Ostrinia nubilalis* (Pyralidae) highlight complex and variable resistance mechanisms between populations, based on panels of combinations of increased activity of detoxification enzymes and mutation in the molecular target of the insecticide. Research on the pre-existence of resistance to two natural plant extracts (3,5-dicaffeoyl quinic acid and dicaffeoyl tartaric acid) with aphicidal properties in several aphid species showed (i) small differences in susceptibility between clones or populations of *Myzus persicae* (Aphididae) possibly related to the size of the individuals (ii) insensitivity of one clone of *Aphis craccivora* (Aphididae). No cross-resistance between synthetic insecticides and these natural extracts was detected. Research on the cost of resistance in *Cydia pomonella* (Tortricidae) to *Cydia pomonella* GranuloVirus isolate M (CpGV-M), a widely used biopesticide, showed a low cost limiting the possibilities of managing this resistance. Finally, the genomic study of the genetic basis of resistance in *C. pomonella* to deltamethrin, thiacloprid, phosmet and CpGV-M shows that the CYP6B2 gene is responsible for cross-resistance between two synthetic molecules and that the major determinant of resistance to the virus is located in the 53,600,000 bp area on chromosome 1. The complexity of resistance mechanisms complicates their management in the field. The use of knowledge and techniques acquired in the study of resistance to synthetic insecticides is relevant and advisable to improve the sustainability of naturally occurring insecticides. The study of the genetic basis using genomic techniques confirms the existence of gene convergence, with resistance mechanisms often comparable between species, and opens up numerous research prospects.

Keywords: Resistance mechanism, genetic basis, detoxification, molecular target, durability, natural extracts, biotests, enzymatic assay, genomics, entomopathogenic viruses

Remerciements

Voici un document bien modeste à l'échelle des défis scientifiques que nous tend le XXI^e siècle mais il représente beaucoup pour moi. Merci donc à tous ceux qui l'ont compris et qui m'ont aidé à réaliser cet exercice. Comme toute variété tardive, ma route fut longue avant d'arriver à maturité et ces pages sont le fruit de nombreuses collaborations. Il me faudrait un deuxième doctorat de « remerciements » pour toutes les honorer. Cependant, j'ai choisi d'être brève en espérant que ceux qui ne trouvent pas leur nom entre ces lignes me pardonneront.

Claire, merci pour ta justesse et Bertrand ta lucidité sans faille, vous m'avez beaucoup fait progresser malgré vos emplois du temps surbookés, et ma résistance ;o). Je vous en suis très reconnaissante.

Merci Gaëlle, pour ton aide qui m'a touché par sa spontanéité et son désintéressement. Je me réjouis que ce travail nous ait permis d'échanger, et j'espère que nous aurons encore pleins d'occasions d'avoir d'autres discussions insecte centrées.

Aux drôles de dames de l'insectarium (Sandrine, Elodie, Odile, Anahi) et à Jérôme, un grand merci pour le travail technique de qualité, les fous rires, la bienveillance et les bonbons à toute heure du jour et de la nuit. Merci aussi d'avoir assuré les manips sans moi pendant la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Lise, Hélène, Thomas B., Miguel et Valérie d'avoir accepté de juger cet exercice banal de thèse mais original de VAE.

Et aux étudiants, CDD et co-encadrant bien sûr, ceux qui ont participé à l'obtention de certains résultats, Jean-Luc, Sylvie, Mathilde, Antoine, Carole, Aurélien, et ceux qui acceptent mon manque de disponibilité ces derniers temps, Marie, Sofian, Mathilda, Joffrey, Thomas D., Benoit B.

Merci à Benoit S. de m'avoir donné le gout de ce sujet de recherche, et à Christian d'avoir vu en moi le potentiel que je ne voyais pas.

Sans oublier les éditions les plus rapides de l'Est dans la correction de manuscrits même lorsqu'ils traitent de sujet aussi barbant que les pesticides et effrayant que les insectes !

Enfin et comme « la lumière de votre être vient de l'intérieur » (Yogi tea – sponsor officiel de ma thèse), merci à mon âme sœur qui m'a donné la force d'entreprendre ce travail en plus de tout le reste...

... à nos quatre lutins et notre très grande tribu

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Remerciements	5
Table des matières	6
Définitions.....	9
INTRODUCTION	12
Contexte	12
Problématique	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
A. Qu'est-ce que la résistance des bioagresseurs aux pesticides ?	17
a) Définitions et notions de biologie évolutive	17
b) Origine des résistances et théories évolutives	18
c) Rôle de la co-évolution plantes-ravageurs dans les phénomènes de résistance	20
d) Cycle de vie, dispersion et risque d'apparition de résistance	21
B. Mécanismes moléculaires des résistances aux pesticides	25
a) Modification ou amplification de cible moléculaire	26
b) Détoxification.....	28
Les monooxygénases à fonction multiples à cytochrome P450 (MFO)	30
Généralités.....	30
MFO chez les insectes, activité induite ou constitutive et résistance aux insecticides	32
Carboxylestérases (EST)	33
Généralités.....	33
EST chez les insectes et résistance aux insecticides	34
Les glutathion-S-transférases (GST)	35
Généralités.....	35
GST chez les insectes, et résistance aux insecticides	36
UGT-transférases.....	37
Généralités.....	37
UGT-transférases chez les insectes et résistance aux insecticides	37
Efflux.....	38
Régulation de l'expression des gènes de détoxification	38
c) Autres mécanismes de résistance.....	39
Modification cuticulaire	39
Mécanismes compensatoires.....	40
Résistances comportementales	40
C. Résistances et plasticité.....	40
a) Résistance multiple et résistance croisée	40
b) Coût physiologique des résistances	42
c) Outils pour détecter et comprendre les résistances.....	42
Résistances et NGS : structuration des gènes de résistance dans le génome.....	42
Outils et méthodes de détection des résistances	44
d) Epigénétique, plasticité phénotypique et résistance aux insecticides	45
Epigénétique : rôle de l'environnement dans l'expression des gènes de résistance	45
L'épigénétique	45
Epigénétique et résistance aux insecticides	47
Plasticité phénotypique.....	48

De la plasticité phénotypique, aux résistances aux insecticides	49
e) Autres déterminisme et origine des résistances.....	50
D. Insecticides	51
a) Grandes familles insecticides et modes d'actions associées	51
Généralités	51
Les toxiques neuronaux et musculaires	52
Les organochlorés (OCs)	52
Les organophosphorés (OPs)	53
Les carbamates	53
Les pyrèthres et pyrèthrinoïdes	53
Avermectines	53
Néonicotinoïdes et spinosynes	54
Anthraniliques diamides	54
Les régulateurs de croissance d'insectes	55
Inhibiteurs de la voie de biosynthèse des lipides.....	55
Inhibiteurs des organes chordotonaux	55
Virus entomopathogènes	56
Dérivés d'acides caféiques	57
Biopesticides à action physique : Kaolin, maltodextrine, huiles minérales et végétales	57
b) Les insecticides passés, présents et futurs	57
CHAPITRE 1 : Combinaison de mécanismes de résistance : deux exemples chez des	
lépidoptères ravageurs	60
Introduction	60
Premier article: Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae)	
and first assessment in Brazilian populations	61
Deuxième article: Biochemical and molecular mechanisms associated with the resistance of the	
European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>) to lambda-cyhalothrin and first monitoring tool.....	72
Discussion	81
CHAPITRE 2 : Durabilité (durée d'efficacité) des bioinsecticides	87
Chapitre 2.1 : Risques d'adaptation de pucerons aux acides 3,5-di-caffeoyl quinique et tartrique (3,5-	
diCQ et diCT) et processus de métabolisation de ces molécules par ces insectes	87
Introduction	87
Hypothèses de travail.....	89
Matériels et méthodes	89
Matériel biologique : pucerons et plantes.....	89
Méthodes.....	93
Dosage enzymatique et protéique.....	94
Evolution expérimentale.....	95
Analyse statistique	95
Résultats.....	96
Variation de sensibilité aux diCT/3,5-diCQ de différentes espèces de pucerons provenant de cultures	
riches en composés de défense contre les insectes.....	102
Adaptation expérimentale sur plante riche en 3,5-diCQ	104
Discussion.....	106
Conclusion	111
Chapitre 2.2 : Evolution des résistances du carpocapse des pommes (<i>Cydia pomonella</i>) au virus de la	
granulose (CpGV).....	112
Introduction	112
Hypothèse de travail	113
Matériel et méthodes	113
Individus sauvages	113
Souche de laboratoire.....	113
Méthode	113

Analyse de données	114
Résultats	115
Discussion	118
Discussion du chapitre 2	121
CHAPITRE 3 : En quoi la génomique modifie-t-elle l'image que nous avons de la résistance chez le carpocapse des pommes ?	123
Introduction	123
Objectifs et questions de recherche	124
Matériel et méthode	125
Insectes	125
Génome de référence	126
Annotation du génome	126
Phénotypage des souches : biotests	127
Reséquençage des souches résistantes et GWAS	127
Mesure du niveau d'expression de CYP6B2	129
Analyses statistiques et bioinformatiques	129
Résultats	130
Annotation du génome	130
Recherche des bases génétiques des résistances dans des souches de laboratoire	132
Phénotypage	132
Reséquençage et analyse de génomique	133
Résistance à des insecticides chimiques	133
Résistance au virus de la granulose	135
Niveau d'expression de CYP6B2	135
Discussion	136
Conclusions et perspectives de ce chapitre	138
DISCUSSION	140
Détection des résistances actuelles	140
Pertinence, robustesse et intérêt de nos recherches pour les agriculteurs	142
Une veille des résistances	142
Une indication des niveaux de résistances	142
Des informations pour adapter les traitements	143
Cycle de vie et gestion des résistances	143
Bases génétiques des résistances	144
Mobiliser nos connaissances pour augmenter la durabilité des bioinsecticides	145
PERSPECTIVES	147
Résistances et biologie évolutive : quelles leçons ?	147
Les 2 spécificités dans nos exemples de résistance aux insecticides	147
Des espèces avec des capacités d'évolution élevées ?	149
Epilogue	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
ANNEXES	174
Équipe d'encadrement	191

Définitions

Activité enzymatique spécifique : quantité de produit générée par une quantité d'enzymes par unité de temps et par unité de quantité de protéines totales extraites ou masse fraîche ou individu.

Bio-agresseur : organisme vivant nuisible à la production végétale humaine, pouvant être un animal (arthropodes, rongeurs ...), une plante (mauvaises herbes, syn. adventices) ou un micro-organisme phytopathogène (bactéries, champignons, virus ...).

Cible moléculaire (d'un pesticide) : protéine vitale pour un individu (enzyme, protéine de structure de la cellule...). Un pesticide agit en perturbant suffisamment la fonction de sa ou ses cibles pour tuer ou inhiber le développement du bio-agresseur.

Coût de la résistance = perte de valeur sélective : modification de la valeur sélective résultant de l'acquisition d'une résistance par un génotype et pouvant être déterminé par la modification de divers traits de vie (par exemple, nombre de descendants viables produits, vitesse de croissance...).

Dérive génétique : C'est l'évolution aléatoire de la fréquence des allèles au sein d'une population de taille finie au cours des générations successives. Elle se produit de façon plus rapide lorsque l'effectif de la population est faible. Elle peut conduire à la disparition ou la fixation d'allèles par le jeu du hasard.

Dominance/Récessivité/Codominance: La dominance est une relation entre deux allèles d'un même gène, dans laquelle le phénotype des individus hétérozygotes est déterminé intégralement par l'un des allèles, sans contribution du second. Les deux allèles sont qualifiés de dominant et récessif l'un par rapport à l'autre, l'allèle dominant étant celui qui s'exprime. Deux allèles d'un même gène peuvent s'exprimer ensemble on parle alors de codominance. Elle peut être plus ou moins partielle résultant en un panel de phénotypes.

Dose discriminante : dans des conditions contrôlées, dose de pesticide qui tue ou inhibe la croissance ou le développement de tous les génotypes considérés comme sensibles. Tout génotype pouvant croître, se développer ou survivre à cette dose correctement appliquée est considéré comme résistant. Il s'agit de la DL100 la plus basse.

Doses Létales (DL) ou Concentration Létales (CL) : Elles correspondent à la dose ou la concentration qui tue une proportion définie d'individus d'une population. Ainsi la DL50 est la dose qui tue 50% des individus d'une population. Elle est calculée à partir des données de biotest après régression probit.

Durabilité : Dans ce manuscrit, j'ai employé le terme durabilité pour signifier la durée d'efficacité d'un produit.

Enzyme : Protéine dotée de propriété catalytique.

Epistasie : Cela désigne l'interaction existant entre deux ou plusieurs gènes. Par exemple, il y a épistasie lorsqu'un ou plusieurs gènes masquent ou empêchent l'expression d'un autre.

Formulation : ensemble de composés destinés à faciliter la manipulation, l'application, la pénétration et la sélectivité des pesticides.

Etude d'association pangénomique (en anglais : Genome Wide Association Study (GWAS)) : Analyse de multiples variations dans les génomes à partir de données de génomiques acquises sur de nombreux individus dans le but de relier génotypes et phénotypes.

Mode d'action : se réfère à la cible biochimique d'un pesticide. Les pesticides peuvent être classés en fonction de leur cible. Une classification des pesticides par mode d'action est disponible sur le site internet du réseau R₄P (R4P, 2021b).

Mutation *de novo* : C'est une mutation présente chez un individu alors qu'aucun de ses parents ne la porte dans son génome.

Mortalité corrigée : Il s'agit de la mortalité observée dans un biotest en présence d'un insecticide, corrigée par la mortalité naturelle de ce même biotest. Elle est calculée selon la formule de Abbott :

$$MC (\%) = \left(\frac{Mi (\%) - Mt (\%)}{100 - Mt (\%)} \right) \times 100$$

Avec : MC = Mortalité Corrigée

Mi = Mortalité à une concentration d'insecticide

Mt = Mortalité du témoin

Rapport de résistance : rapport des concentrations d'insecticide nécessaires pour obtenir la même mortalité sur des populations résistantes que sur des sensibles de référence chez une même espèce de bio-agresseur. Il est habituellement exprimé sous la forme du rapport (DL50 résistant / DL50 sensible).

RNA interference ou RNAi : c'est un processus biologique dans lequel les molécules d'ARN sont impliquées dans la suppression spécifique de l'expression d'un gène. Il peut être artificiellement activé par injection de petits ARN doubles-brins dans un organisme, ou naturellement induite suite à une infection virale par exemple (silencing). Ce procédé est détourné par les scientifiques pour faire des études de validation fonctionnelles de gènes.

Population : les individus d'une population peuvent se croiser entre eux, ils se reproduisent moins avec les individus des populations voisines, desquelles ils sont géographiquement plus isolés. Par commodité, est aussi utilisé pour se référer à l'ensemble des individus présents sur une parcelle.

Pléiotropie : situation dans laquelle un gène ou une protéine détermine ou modifie plusieurs caractères phénotypiques

Pression de sélection : contrainte environnementale (biotique ou abiotique) influençant la valeur sélective des génotypes. Une pression de sélection favorise les génotypes ayant la meilleure valeur sélective quand elle s'exerce. Ainsi, une pression de sélection exercée par un ou des pesticide(s) favorise les génotypes les moins sensibles (ou les plus résistants).

Résistance : cf paragraphe 1.A.a

Résistance croisée : résistance à plusieurs substances actives (SA) insecticides déterminée par le même allèle. La résistance croisée peut être positive (résistance à plusieurs insecticides) ou négative (entraînant

une hypersensibilité à d'autres substances actives).

Résistance multiple : résistance à plusieurs substances actives insecticides déterminée par l'accumulation de différents allèles.

Silencing : C'est un mécanisme cellulaire, souvent observé en réponse à des attaques virales, faisant intervenir des petits ARN qui reconnaissent des gènes grâce à leur homologie de séquence et inhibent leur expression au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Transposon : Séquence d'ADN capable de se déplacer de manière autonome dans un génome.

Toxicité aiguë : Elle donne une idée de la toxicité rapide d'un produit à forte dose. Par exemple sur rat la durée classique d'observation des effets de toxicité aiguë est de 90 jours après contamination.

Toxicité chronique : Elle donne une image de la toxicité d'un produit sur toute sa durée de vie. Elle désigne les effets néfastes qui se manifestent après une exposition répétée sur une longue durée à une faible concentration de SA. Par exemple, sur rat la durée classique d'observation des effets chroniques est de 2 ans après contamination.

Valeur sélective (ou « Fitness ») : capacité d'un génotype à survivre et à produire des descendants viables et eux même fertils. Elle englobe aussi la bonne santé globale d'un individu dans un environnement donné.

Variation cryptique : cela implique des interactions entre gènes. Les variants d'un gène affectent un autre gène avec ou sans interaction directe.

INTRODUCTION

Contexte

Les arthropodes forment le groupe de métazoaires le plus abondant sur notre planète avec des estimations de plus de cinq millions d'espèces (Ødegaard, Diserud et al. 2000) (Figure 1) dont de nombreuses sont intimement liées à la vie humaine. Les scientifiques s'inquiètent d'une extinction massive d'espèces d'insectes, à l'origine d'une baisse importante de la biodiversité. Les causes principales attribuées à cette catastrophe sont : la perte d'habitat, la pollution, le changement climatique, la surexploitation des terres et les espèces invasives (Cardoso, Barton et al. 2020).

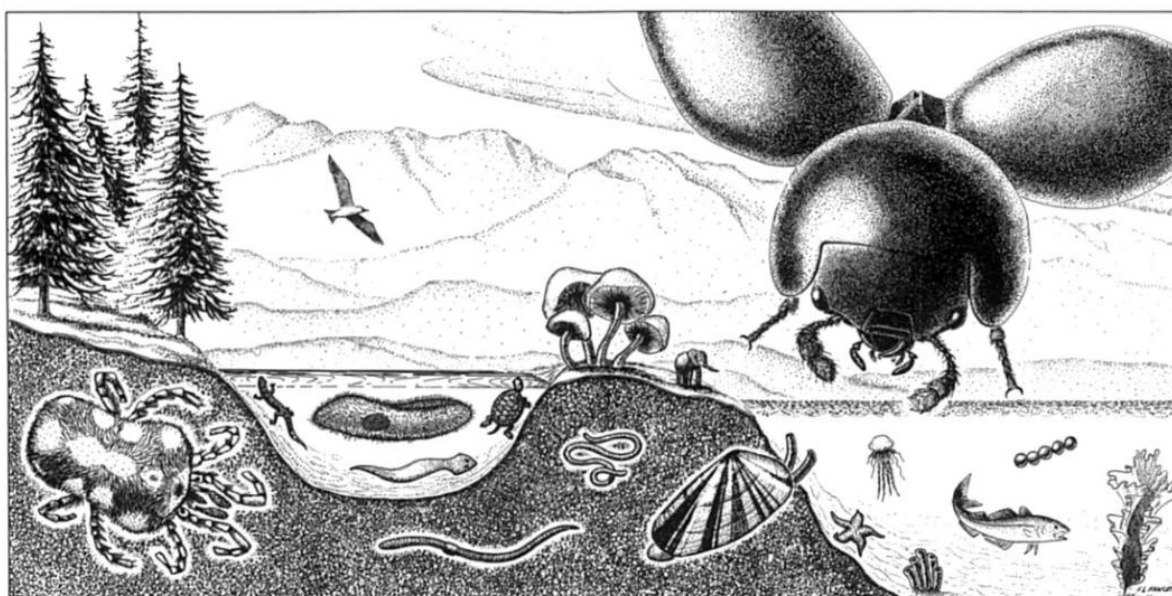


Figure 1 : Représentation des différents taxons, la taille des représentants de chaque taxon est proportionnelle aux nombres d'espèces qu'il englobe. Les insectes sont représentés par le coléoptère avec 751 000 espèces décrites en 2000 contre 4 000 pour les mammifères (représentés par l'éléphant). Cette illustration est tirée de (Wheeler 2000)

Le réchauffement climatique, l'augmentation des flux de personnes et de marchandises, provoquent une expansion d'espèces envahissantes dans le monde qui est un facteur conduisant à une perte de la biodiversité. Les effets secondaires de l'anthropisation sur notre planète vont donc se poursuivre et il devient urgent de les limiter. L'agriculture fait partie des leviers sur lesquels l'humanité peut jouer pour diminuer sa pollution, son taux d'occupation des sols et créer des paysages agricoles favorables à la biodiversité. Parmi les polluants utilisés en agriculture, les pesticides et plus particulièrement les insecticides sont à l'origine de fortes perturbations écosystémiques (Carson 1968; Cardoso, Barton et al. 2020). Réussir à les limiter est donc un enjeu important pour réduire notre empreinte écologique.

L'agriculture intensive est actuellement le système le plus répandu dans le monde. Elle est fortement dépendante de l'utilisation de produits phytosanitaires. Bien que remis en question à cause des effets non intentionnels qu'ils occasionnent, les pesticides sont encore largement employés. Nous faisons d'ailleurs le constat que le plan d'action français Écophyto visant à réduire le recours à ces produits de 50% entre 2008 et 2018 a eu du mal à être mis en pratique (Figure 2). Le plan Écophyto et ses objectifs

ont donc été révisés à la baisse. Dans ce nouveau plan d'action, les effets non intentionnels des pesticides sont évoqués, et plus particulièrement l'apparition de résistances des bioagresseurs aux pesticides qui est un facteur aggravant de leur utilisation.

(https://www.ecophyto-pro.fr/fiches/fiche/25/le_plan_ecophyto_ii/n:304).

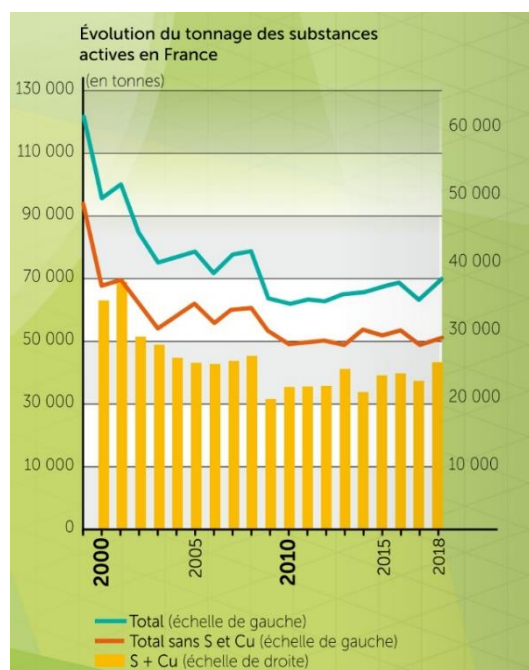


Figure 2 : Quantité de substances actives vendues en France.

<http://www.uipp.org/flipbook/index.html>

Le phénomène de résistance est à la fois une cause et une conséquence de l'utilisation massive de pesticide. En effet, leur utilisation sélectionne des individus résistants et la perte d'efficacité qui en découle conduit à une augmentation du nombre de traitements. Le retrait de la vente de certaines familles chimiques trop toxiques est bénéfique pour l'environnement. Mais, sans démarches d'accompagnement pour la protection des plantes alternatives aux pesticides, elle conduit simplement à l'augmentation de l'utilisation des produits toujours en vente. Ces derniers étant de moins en moins nombreux, la pression de sélection sur les organismes cibles devient monotone, ce qui favorise grandement l'apparition de résistances. C'est par exemple le cas pour la filière colza qui n'arrive plus à contrôler différentes espèces de coléoptères ravageurs toutes devenues résistantes aux pyréthrinoïdes, seule famille chimique efficace encore homologuée pour ces usages (Bothorel, Robert et al. 2018). C'est également le cas pour la filière betterave qui n'arrive plus à contenir les populations de pucerons (*Myzus persicae*) avec les pyréthrinoïdes et carbamates à cause de résistances. Or ces insectes transmettent des viroses qui mettent à mal la production betteravière. Face à cette impasse, le gouvernement français a choisi de réautoriser les néonicotinoïdes en septembre 2020 pour pouvoir faire face à ce problème majeur (<http://www.itbfr.org/tous-les-articles/article/news/f-a-q-betterave-sucriere-pucerons-verts-jaunisse-et-neonicotinoides/>). Enfin, le même problème a vu le jour pour le contrôle des populations de pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* devenues très résistantes aux pyréthrinoïdes (Siegwart, Thibord et al. 2017). Dans ces trois exemples, le même scénario se répète : une seule famille d'insecticides efficace disponible sur le marché se traduit par l'apparition de résistances. Si l'on compare les pesticides entre eux, les quantités d'insecticides vendues sont moindres

que les fongicides ou herbicides, mais leur toxicité sur mammifères et auxiliaires est la plus élevée. Lorsque cette pollution touche des prédateurs comme les oiseaux ou les pollinisateurs des perturbations importantes des réseaux trophiques et des fonctions écosystémiques sont observées. La réduction de l'utilisation des pesticides représente donc un enjeu important pour la santé humaine et l'environnement (Damalas and Eleftherohorinos 2011).

Ces 20 dernières années ont vu le non renouvellement progressif des autorisations de mise sur le marché des insecticides de synthèse appartenant aux familles chimiques les plus toxiques sur mammifères : Organochlorés, Organophosphorés, Carbamates. Ce changement s'est accompagné d'apparition sur le marché de nouvelles matières actives d'origine biologique souvent moins persistantes que j'appellerai ici des bio-insecticides (Anses-Ephy 2021). Le réchauffement climatique auquel nous faisons face conduit à l'augmentation des dégâts causés par les insectes ravageurs sur les cultures (Deutsch, Tewksbury et al. 2018). La pression parasitaire augmentant et le nombre de solutions de protection des plantes efficaces se réduisant, la gestion des résistances des ravageurs aux (bio)insecticides est un véritable défi pour l'agriculture moderne.

De nombreuses espèces d'insectes ont développé des résistances à des insecticides qu'ils soient les cibles des traitements ou simplement présentes dans la zone où les traitements ont lieu. C'est ainsi que le premier cas de résistance a été décrit il y a plus de 100 ans, en 1914, chez une espèce de cochenille (*Quadraspidiotus perniciosus*) devenue insensible à la bouillie nantaise (Melander 1914). L'augmentation de l'utilisation des pesticides suite à la découverte des produits organiques de synthèse dans les années 40 a provoqué une forte augmentation des cas de résistances. Depuis, chaque nouvelle famille d'insecticide révèle des phénotypes résistants chez des bioagresseurs dans les années qui suivent sa mise sur le marché (Figure 3).

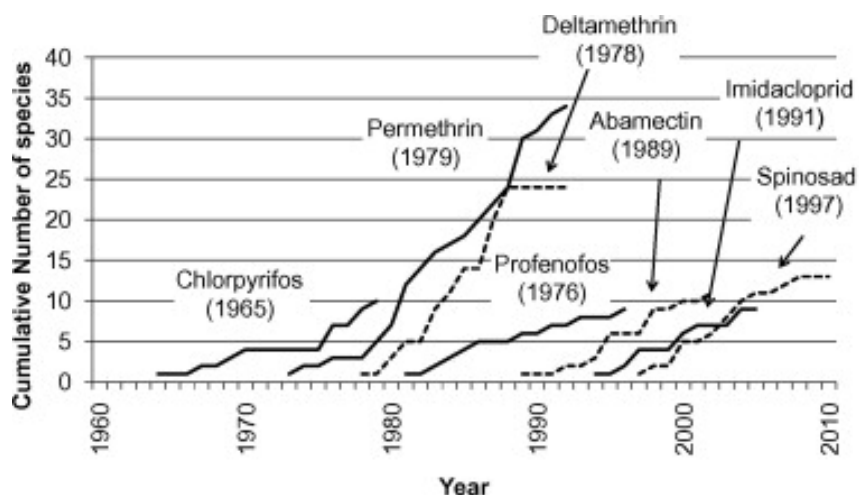


Figure 3 : Nombre cumulé d'espèces reportées comme étant résistantes à la matière active indiquée pendant les 14 ans suivant leur homologation (date d'homologation entre parenthèses). Data adapted from the Michigan State University Arthropod Pesticide Resistance Database, 2011 (Sparks, Dripps et al. 2012).

Les lépidoptères, coléoptères et les hémiptères comptent parmi eux des espèces d'insectes ravageurs de cultures abondamment ciblées par les traitements phytosanitaires en France. Cela a eu pour conséquence l'apparition de cas de résistances dans notre pays (<https://www.r4p-inra.fr/fr/statut-des-resistances-en-france/>). Ces adaptations ne sont autres que des illustrations des théories de l'évolution réduites à une échelle de temps court grâce à une pression de sélection très forte sur un nombre

d'individus important. Pour les scientifiques, c'est un phénomène original et unique pour étudier l'évolution en action. De nombreux scientifiques se sont intéressés à différents aspects de ce phénomène par exemple, les facteurs de risque d'apparition de résistances, leur origine moléculaire, leur dynamique dans l'espace et dans le temps, leurs effets sur le fitness des individus résistants, les modes de gestions efficaces sur le terrain permettant d'augmenter la durée d'efficacité d'une substance active. Cette émulation scientifique a conduit à une production de connaissance importante qui n'a cessé d'augmenter au cours du temps (Figure 4).

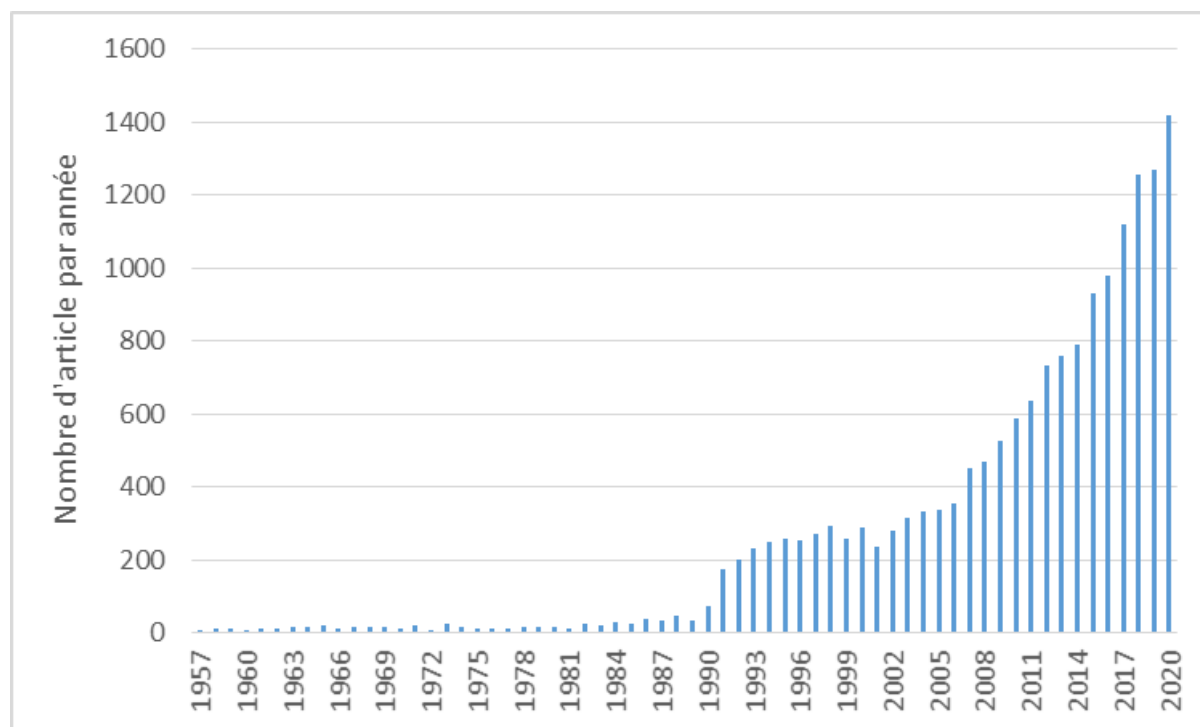


Figure 4: Nombre de publications scientifiques sur le sujet "insecticide resistance" trouvées sur le site de web of science en fonction de l'année de parution (recherche faite le 23 avril 2021).

Il existe actuellement un décalage entre la recherche scientifique en quête de solutions alternatives et l'agriculture maintenue dans un système intensif dépendant de pesticides. Le remplacement des produits insecticides de synthèses par des produits moins toxiques mais moins efficaces donc plus fréquemment épandus, substitue une pression de sélection par une autre. De nouveaux cas de résistance ont donc continué à émerger aux produits de biocontrôle (Siegwart, Graillot et al. 2015). Dans certains cas de nouvelles solutions de lutte ont pu être proposées. Dans d'autres comme pour des insectes du colza, nous observons une diminution des surfaces cultivées en France (Bothorel, Robert et al. 2018; Agreste 2020; Robert, Ruck et al. 2020) au profit d'importations de pays où les normes d'utilisation des pesticides sont moins strictes.

Problématique

L'enjeu est donc double :

- Mieux connaître et comprendre les mécanismes et l'histoire évolutive des résistances aux insecticides de synthèse pour les gérer sur le terrain et augmenter la durabilité des dernières substances actives homologuées.
- Tirer les bénéfices des connaissances et techniques expérimentales acquises sur les insecticides de synthèse en les appliquant aux bio-insecticides pour améliorer leur durabilité.

Dans ce manuscrit et dans un premier temps (premier chapitre) je m'intéresserai aux mécanismes de résistances aux insecticides de synthèse et leurs combinaisons. Les différents mécanismes connus seront détaillés dans le paragraphe B de l'analyse bibliographique. J'essaierai de déterminer si les deux lépidoptères ravageurs que sont la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) et la tordeuse orientale du pêcher (*Grapholita molesta*) ont développé des résistances à des insecticides de synthèse. Si oui quels sont les mécanismes sous-jacents à ce phénomène ? Est-ce que des phénomènes de détoxification et les mutations de cibles moléculaires sont des mécanismes des résistances qui peuvent co-exister dans une même population, dans un même individu ?

Dans un deuxième temps, je m'intéresserai à la durabilité de deux bio-insecticides. L'un des objectifs de cette section sera de déterminer si les bio-insecticides pourront être plus durables que les pesticides de synthèse. Pour cela je me suis intéressée à deux cas de résistances à des moments de leur cycle différent. L'état de nos connaissances sur le cycle de vie des résistances et leur origine sont décrites au paragraphe A.d) et A.b) de l'analyse bibliographique. Dans la première partie de ce chapitre 2, j'ai cherché à détecter la préexistence une résistance à un bio-insecticide extrait de plante encore en développement, et dans la seconde j'ai cherché à caractériser finement le coût d'une résistance déjà bien répandue. Plus précisément je répondrai aux questions suivantes : Existe-t-il une préadaptation à un bio-insecticide d'origine naturelle chez des espèces de pucerons qui pourraient avoir été en contact avec cette substance dans la nature au cours de son histoire évolutive ? Y a-t-il un risque de faire face à des résistances plus rapidement pour des bio-insecticides naturels via des mécanismes préexistants ? Les résistances aux insecticides chimiques sont souvent accompagnées d'un coût physiologique pour les insectes, est-ce aussi le cas pour une résistance à un bio-insecticide viral chez le carpocapse des pommes?

Enfin, je terminerai ce manuscrit en m'interrogeant sur les bases génétiques des résistances à travers les questions suivantes : Combien y a-t-il de gènes potentiellement impliqués dans ces phénomènes de résistance chez *Cydia pomonella*, un ravageur qui a développé des résistances la plupart des familles chimiques d'insecticides? Est-ce que cela est comparable à ce que l'on observe chez une espèce de moustique pour laquelle les bases génétiques des résistances sont assez bien connues ? Quelle perspective nous offrent les nouvelles techniques de séquençage (NGS) sur la problématique des résistances aux insecticides et leur gestion ? L'apport des NGS dans cette discipline sera présenté dans le paragraphe C.c) de l'étude bibliographique.

L'état des connaissances scientifiques sur ces différentes questions de recherche est assez avancé et nécessite d'être exposé. Avant de présenter mes travaux, je passerais en revue les connaissances actuelles sur les résistances aux (bio)insecticides.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Qu'est-ce que la résistance des bioagresseurs aux pesticides ?

a) Définitions et notions de biologie évolutive

Le concept de résistance peut sembler trivial, cependant il existe plusieurs façons de le définir, voici deux points de vue différents sur ce phénomène. La première définition a été proposée en 1957 par le professeur James F. Crow, un généticien émérite dans son article intitulé « GENETICS OF INSECT RESISTANCE TO CHEMICALS » (Crow 1957) : « *Insecticide resistance is an example of evolutionary change, the insecticide acting as a powerful selective sieve for concentrating resistant mutants that were present in low frequencies in the original population* ». Ainsi, il définit la résistance comme la marque d'un changement génétique dans la réponse d'un insecte à un insecticide, et il discute l'origine de ce changement : est-il antérieur ou postérieur à l'utilisation de l'insecticide ?

La seconde définition donnée 60 ans après apporte un éclairage plus agronomique et fait la différence entre deux types de résistances, « biologique » et « en pratique ». Elle est donnée par le réseau R₄P qui fait figure de référence sur cette question en France (<https://www.r4p-inra.fr/fr/quest-ce-que-la-resistance-aux-ppp/>). « *La résistance aux Produits de Protection des Plantes (PPP, pesticides d'origine chimique ou naturelle) est la capacité héritable d'un individu d'une espèce de bioagresseur à survivre à un traitement PPP appliqué correctement. Lorsqu'un individu est résistant à un PPP, il ne sera pas (ou peu) affecté par le traitement, et sera capable de produire une descendance viable. On parle alors de résistance biologique. Il peut exister, dans une population de bioagresseurs, des individus résistants aux PPP sans qu'il y ait échec de traitement, par exemple, lorsque la fréquence des individus résistants est faible et/ou lorsque l'intensité de la résistance est trop faible. Cependant, la sélection récurrente, génération après génération, d'individus résistants aux PPP évolue généralement vers une baisse d'efficacité des traitements concernés. On parle alors de résistance en pratique ou de résistance au champ* ». Cette deuxième définition offre également l'intérêt de ne pas réduire les changements observés à des modifications génétiques mais bien à des « *capacités héritables* ». En effet, les avancées scientifiques récentes dans le domaine de l'épigénétique apportent une vision plus complexe que celle de 1957.

L'évolution repose sur trois processus simples : la copie, la variation et le tri. La variation englobe l'ensemble des génotypes d'une espèce. Ceux-ci vont subir un tri qui peut être soit aléatoire, on parle alors de dérive, soit sélectif, il s'agit alors de sélection naturelle, la combinaison de ces deux types de tri étant bien sûr ce que l'on observe dans la nature. L'effet de dérive est d'autant plus fort et rapide que l'effectif efficace d'une population est petit, car étant le reflet du hasard d'un échantillonnage, un allèle y a statistiquement plus de chance d'être perdu. La sélection naturelle correspond au tri des individus sur leur phénotype, par un environnement donné. Elle reflète leur capacité à survivre et à se reproduire. Mutation, migration, dérive et sélection sont les quatre forces évolutives capables de modifier les fréquences des génotypes d'une population (David and Samadi 2011; Lefevre, Raymond et al. 2016). Les résistances aux insecticides ont donc été précédemment décrites comme étant liées à des apparitions de mutations permettant la survie des individus qui les portent en présence d'insecticides

suivies de leur sélection.

b) Origine des résistances et théories évolutives

Les premières réflexions sur l'origine des résistances de bioagresseurs à des produits de synthèse datent des années 50 (Crow 1957). La question première s'est portée sur la datation des événements génétiques à l'origine des résistances. Sont-ils antérieurs ou postérieurs à l'utilisation des pesticides les sélectionnant ? La résistance étant une conséquence de l'exposition à un pesticide, l'absence d'implication des pesticides dans la mutagenèse est difficile à prouver. A cette époque un consensus scientifique s'est accordé sur la version de l'antériorité de ces événements génétiques (Crow 1957). Cette conclusion était basée sur plusieurs études convergentes montrant que (i) des individus résistants ont été trouvés bien avant que les pesticides ne soient mis sur le marché, (ii) l'apparition rapide des résistances chez de nombreuses espèces ne correspond pas aux taux de mutations attendus, ces mutations devaient donc préexister à des fréquences très faibles dans la population avant l'utilisation de pesticides, (iii) plusieurs études d'évolutions expérimentales partant d'individus sensibles ne conduisent pas à l'apparition de variant résistant (Crow 1957). 62 ans plus tard, les conclusions ne sont pas tout à fait les mêmes. En effet, plusieurs études utilisant des outils de biologie moléculaire prouvent qu'une partie importante des mutations conférant des résistances apparaissent postérieurement à leur utilisation (Hawkins, Bass et al. 2019). Une des hypothèses actuellement acceptée est qu'elles ne sont pas induites par le pesticide mais simplement la conséquence du jeu aléatoire des erreurs de réplication, et étant soumises à une pression sélective très forte elles remplacent rapidement les types sauvages dans les populations de bioagresseurs (Hawkins, Bass et al. 2019), mais est-ce bien vrai que toutes les mutations sont aléatoires ? Est-ce qu'un stress peut orienter le changement ? On parle de mutation *de novo* lorsqu'elles apparaissent postérieurement à l'utilisation de l'insecticide. Ces découvertes montrent que l'origine des résistances est, chez les insectes ravageurs, une savante combinaison de ces mutations *de novo* et de variants déjà présents antérieurement par le biais de la variation permanente des génomes du vivant (Hawkins, Bass et al. 2019) (Tableau 1). Il est intéressant de noter que dans l'étude de Norris et al (2015) l'allèle de résistance (*kdr*) a été acquis par une espèce d'anophèle par hybridation avec une espèce proche. Ce phénomène de transmission interspécifique appelé transfert horizontal de gènes (HGT) est très commun chez les bactéries grâce à l'échange de plasmide mais beaucoup plus rare chez les organismes pluricellulaires. Un autre exemple de ce type d'événement a cependant été décrit chez la souris domestique (*Mus musculus domesticus*) qui a acquis un allèle de résistance grâce à une hybridation avec *Mus spretus*, suivie de son introgression sous pression rodenticide (Song, Endepols et al. 2011; Liu, Steinberg et al. 2015).

Tableau 1 : Résumé des cas de résistances à des insecticides où l'origine évolutive a été déterminée (D'après Hawkins et al., 2019)

Organism	Pesticides	Resistance mechanism	Origins	References
<i>Anopheles gambiae</i>	Pyréthroïdes	mutation de cible	<i>De novo</i> , multiples origines	(Lynd, Weetman et al. 2010)
<i>Anopheles gambiae</i>	OPs/carbamate	mutation de cible	<i>De novo</i> , origine unique	(Weetman, Mitchell et al. 2015)
<i>Drosophila melanogaster</i>	OPs/carbamate	mutation de cible surexpression	<i>De novo</i> , multiples origines	(Karasov, Messer et al. 2010)
<i>Drosophila melanogaster</i>	DDT + autre	métabolique	variation continue	(Catania, Kauer et al. 2004)
<i>Plutella xylostella</i>	Anthranilique diamides	mutation de cible	variation continue	(Trocza, Zimmer et al. 2012)
<i>Lucilia cuprina</i>	OPs	Mutation métabolique	<i>De novo</i> and variation	(Hartley, Newcomb et al. 2006)

			continue	
<i>Anopheles coluzzii</i>	Pyréthroïdes	mutation de cible	Introgression adaptative	(Norris, Main et al. 2015)

En 1859, Charles Darwin décrit dans son livre « L'origine des espèces par le moyen de la sélection naturelle, ou la préservation des races favorisées dans la lutte pour la vie » des variations héritables qui peuvent se transmettre par le jeu des pressions évolutives, sans savoir que 2 ans avant lui, Gregor Mendel a élucidé les principes fondamentaux de l'hérédité. Gènes, allèles, caractères, niveau de dominance, diploïdie et ségrégation des chromosomes au moment de la méiose sont des concepts dont Mendel dessine la première esquisse. Il faudra encore attendre un siècle avant que la molécule d'ADN et l'ingéniosité de son code soient révélées par Rosalind Franklin et publiées par James Watson et Francis Crick (Watson and Crick 1953). On sait aujourd'hui que les variations héritables dont parlait Darwin sont des changements dans la séquence de l'ADN génomique d'un individu. Or le phénomène de résistance au pesticide est régi par les mêmes règles évolutives : une pression de sélection ici le pesticide favorise fortement certains allèles en tuant les individus qui ne les portent pas. La fréquence de ces allèles augmente donc rapidement dans les populations soumises à ces insecticides. Les chercheurs étudiant ces phénomènes de résistance utilisent même le terme d'évolution en action pour illustrer cela. Cependant entre ce qu'observe Charles Darwin et les phénomènes de résistance aux pesticides il existe un différentiel d'échelle et de temps. Plus tard, les évolutionnistes ont éprouvé le besoin de différencier les termes de micro- et macroévolution. Le premier se référant à des phénomènes survenant en deçà de l'échelle des espèces à l'inverse de la macroévolution (Arthur 2003). Les résistances aux insecticides s'observant sur des populations appartenant à une même espèce, nous parlons donc ici de microévolution.

Au regard de la macro-évolution, il existe deux caractéristiques des phénomènes de résistance aux insecticides qui m'interrogent :

- Les résistances aux insecticides apparaissent très rapidement (Sparks, Dripps et al. 2012)
- Il existe une très forte convergence génétique que l'on peut observer à travers la découverte de la même mutation entre espèces, genres et même ordres (Rinkevich, Du et al. 2013)

Il y a 10 ans, l'hypothèse de mutation *de novo* pour les résistances aux insecticides était réfutée, les modèles traitant cette problématique se basaient donc sur un paramètre appelé fréquence initiale d'allèle de résistance, puisque la mutation était sensée toujours être antérieure à l'utilisation des pesticides. Dans leur revue de 187 articles présentant des modèles sur l'apparition et la gestion de résistances à des pesticides ou des médicaments, le consortium REX constate que la plupart des modèles fixent la fréquence initiale d'allèle de résistance à une valeur supérieure de plusieurs ordres de grandeur à la fréquence prédite sous l'hypothèse de l'équilibre mutation-sélection pour pouvoir être cohérent avec la réalité. La fréquence initiale des allèles de résistance n'étant généralement pas mesurée dans la nature (REX 2010). Par exemple, dans leur recherche de l'impact des diverses pressions de sélection sur des allèles à forts et à faibles effets, Groeters et Tabashnik jugent que la fréquence initiale de résistance minimale envisageable est de 0,0013 (Groeters and Tabashnik 2000). Dans le cas de mutation *de novo* la fréquence initiale d'allèle de résistance est de 0 et seul le taux de mutation et la taille des populations expliquent l'apparition d'allèle de résistance. Pour calculer la probabilité d'apparition des mutations *de novo* rapportée dans la revue de Hawkins (2019), il faut tout d'abord connaître le taux de mutation. Or celui-ci est variable en fonction de l'âge, de la population, et même de la zone du génome considérée (Baer, Miyamoto et al. 2007). Chez un lépidoptère (*Heliconius*

melpomene) il a été approximé grâce aux techniques de NGS à une moyenne d'une mutation tous les $2,9 \times 10^9$ base (Keightley, Pinharanda et al. 2015), ce qui est congruent avec les calculs menés sur *D. melanogaster* (Keightley, Ness et al. 2014). Si la localisation de la mutation est purement aléatoire, la probabilité pour qu'une mutation *de novo* ait lieu au locus précis attendu nécessite un tirage de $2,9 \times 10^9$. Une fois cette mutation apparue, elle est alors présente à une fréquence très faible dans la population de 1 sur $2,9 \times 10^9$ soit plus d'un million de fois plus bas que ce qu'estiment les modélisateurs. Dans son article Karasov explique cette incohérence de vitesse évolutive en avançant l'hypothèse que c'est la taille de la population efficace qui est beaucoup plus grande que celle habituellement estimée (Karasov, Messer et al. 2010). Le même argument est avancé pour expliquer l'apparition de résistance chez des espèces invasives appauvries génétiquement par divers goulets d'étranglement, car ces dernières ont en général un fort potentiel reproducteur (Rosenheim, Johnson et al. 1996).

Une explication à la seconde caractéristique souvent rapportée dans les publications scientifiques est que la pression de sélection opérée par les pesticides est très souvent ciblée sur un gène : sa cible moléculaire. Une seule et même mutation dans ce gène représente un avantage sélectif très important. La plupart des cibles moléculaires sont au niveau du système nerveux et touchent des protéines essentielles, il y a une très forte contrainte pour devenir résistant aux insecticides et maintenir une fonction endogène et ces protéines sont très conservées entre les espèces donc les possibilités de mutations sont restreintes (Daborn and Le Goff 2004). Cette hypothèse est confortée par le fait que ces mutations de cibles se retrouvent dans de nombreuses espèces. Le déterminisme génétique d'une résistance à une molécule unisite peut donc être très simple alors que dans le cas de l'évolution des espèces les pressions sélectives principales que sont la prédation, l'accès aux ressources et le succès reproducteur touchent à des mécanismes beaucoup plus complexes et régis pas de nombreux gènes (Daborn and Le Goff 2004).

Cette rapidité adaptative et convergence génique, ont été observés par d'autres scientifiques dans d'autres domaines. Ils ont poursuivi une réflexion sur la capacité des organismes à évoluer et l'ont nommée évolutivité ou adaptabilité évolutionnaire (Griswold 2006; Hendrikse, Parsons et al. 2007; Pigliucci 2008; Wagner 2013). Cette évolutivité est capable elle-même d'évoluer car l'on considère qu'elle est codée dans le génome comme un trait phénotypique « classique » (Radman, Matic et al. 1999; Earl and Deem 2004).

c) Rôle de la co-évolution plantes-ravageurs dans les phénomènes de résistance

La diversité génétique des espèces d'insectes ravageurs s'est acquise sur des milliers d'années d'évolution passées dans des environnements plus ou moins perturbés. Ces parasites de plantes ont dû développer un arsenal d'outils pour contrer les attaques chimiques de leur plante hôte. Par exemple, le carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) est capable de se nourrir de brou de noix pourtant bien connu pour contenir en grande quantité un toxique puissant : la juglone. Cet insecte a acquis cette capacité grâce à la production d'une enzyme de détoxification appartenant aux quinones réductases (Piskorski and Dorn 2011). La plupart des molécules de synthèse insecticides ont été découvertes suite à l'observation de l'effet d'extraits naturels de plantes ou de micro-organismes. Par exemple les pyrèthriinoïdes ont été créés en s'inspirant de la composition et des structures moléculaires des pyrèthres naturels, les néonicotinoïdes s'inspirent de la nicotine, les anthraniliques diamides de la Ryanodine... Les cibles moléculaires de ces extraits et des pesticides en découlant sont les mêmes. Un cas de résistance croisée a été décrit entre la substance naturelle d'origine et ses dérivés synthétiques par mutation de cible (Jongejan and Lourens 1980). Des enzymes appartenant toutes deux au groupe des CYP6 (Oxygénases à fonctions multiples à cytochrome P450) ont été décrites comme capables de

dégrader respectivement la nicotine et un néonicotinoïde (Li, Bai et al. 2012). Il est donc hautement improbable que de nouveaux mécanismes complexes d'efflux ou de détoxification aient été entièrement créés à partir de rien durant la courte période d'utilisation des pesticides. Par contre, l'amélioration de l'affinité d'une enzyme pour une substance active et/ou sa surexpression grâce à une mutation ponctuelle *de novo* sous sélection de pesticide peut sembler beaucoup plus probable (Hawkins, 2019).

La valeur sélective d'individus résistants, c'est-à-dire la capacité d'un génotype à produire des descendants, varie en absence de pression de sélection en fonction de ce que l'on appelle le coût de la résistance. En effet, la théorie du Trade-Off appliquée à la biologie dit que le gain d'une nouvelle capacité, ici la résistance à un insecticide, s'accompagne de la perte ou diminution d'une autre capacité exemple, dans la dispersion, l'attractivité sexuelle, la vitesse de développement... (Stearns 1989). Ce coût à la résistance a été de nombreuses fois décrit et détaillé (Kliot and Ghanim 2012).

Au cours de la longue évolution d'une espèce dans des environnements plus ou moins chargés en substances xénotiques opérant des pressions sélectives faibles voir intermittentes, il est difficile d'estimer le niveau de maintien d'allèles de résistance à faible valeur sélective. Mais on peut penser que ce processus sélectif « proche de neutre » permet cependant le maintien de nombreux allèles parfois récessifs en les préservant de la dérive génétique (Hawkins, *et al.*, 2019). On retrouve les mêmes schémas de lente co-évolution entre les insectes et leurs pathogènes (Graillot, Blachere-López et al. 2019). L'accumulation d'outils de défense chez certaines espèces de ravageurs au cours de cette coévolution leur donne un avantage sélectif dans un environnement perturbé. Dans certains cas, des doses sublétales de pesticide d'origine biologique ou non améliorent les capacités reproductives ou la santé des insectes. Ce phénomène contre-intuitif appelé l'hormèse a été décrit plusieurs fois chez des espèces de pucerons et de lépidoptères (Cutler 2013).

De plus, une partie importante de la diversité génétique antérieure à l'utilisation de pesticide peut être simplement due à des mutations entièrement neutres qui sont le fruit du hasard et qui n'ont pas disparu par le jeu de la dérive génétique grâce à une absence de coût de résistance. Dans ce cas elles seront présentes à des fréquences très faibles dans les populations.

Enfin, une hypothèse très ancienne, l'effet Baldwin, éclairée par des découvertes récentes montre que certaines mutations pourraient ne pas être seulement le fruit du hasard (cf. paragraphe de la plasticité phénotypique aux résistances aux insecticides) (Baldwin 1896).

d) Cycle de vie, dispersion et risque d'apparition de résistance

La rapidité d'apparition d'une résistance en pratique chez une espèce dépend notamment de la fréquence initiale de la mutation (quand elle existe) et du coefficient de sélection (Groeters and Tabashnik 2000). Tout l'enjeu de la gestion des résistances en pratique est d'essayer de favoriser les génotypes sensibles pour faire baisser la fréquence d'individus résistants et de complexifier la pression de sélection. L'exemple de la gestion des résistances de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) au Bt aux États-Unis est intéressant puisque la pression de sélection y est continue et forte et que l'on n'a pas de prise sur elle. En effet, la protéine insecticide est produite directement par les cultures OGM. L'idée des scientifiques fut donc de favoriser la survie et la reproduction d'un maximum de génotypes sensibles. A la mise sur le marché en 1995, les préconisations d'utilisation étaient de créer une mosaïque de parcelles à l'échelle du paysage en gardant des zones refuges avec du maïs non-OGM pour permettre aux insectes sensibles de se maintenir et ainsi de diluer la résistance. Cette stratégie a été envisagée car le mécanisme de résistance attendu au champ étant lié à un allèle récessif au vue des évolutions expérimentales, les individus hétérozygotes devraient donc être tués par le Bt produit dans les cultures. De plus, cette résistance ayant un coût cela limite aussi la proportion de génotypes

homozygotes résistants en absence de pression insecticide (Huang, Andow et al. 2011). Cette préconisation n'ayant pas été suivie dans les premières années, les scientifiques s'attendaient à voir apparaître très rapidement cette résistance en pratique, mais cela n'a pas été le cas. En 2003 pour expliquer ce phénomène l'équipe du docteur Bourguet (Bourguet, Chaufaux et al. 2003) a proposé l'hypothèse selon laquelle la fréquence initiale de l'allèle de résistance au Bt était tellement rare que cela a retardé son « apparition ». L'utilisation des variétés OGM Bt a donc continué à s'étendre et a atteint 32 millions d'hectares en 2004 sans que les pyrales résistantes n'envahissent les cultures (James 2004). En 2017 une nouvelle stratégie de gestion consistant à mélanger les graines de maïs non-OGM aux OGM et les semer dans un même champ pour augmenter les chances de croisements entre insectes sensibles et résistants s'est mise en place avec succès (Onstad, Crespo et al. 2018). Ce n'est qu'en 2019 plus de 20 ans après l'utilisation de ces plantes OGM que le premier cas de résistance en pratique aura été observé en Amérique du Nord (Smith, Farhan et al. 2019). Cet exemple illustre le fait que l'apparition de résistance en pratiques est difficile à prévoir mais qu'une politique de gestion collectivement appliquée peut considérablement repousser son apparition. Ces observations de microévolution font écho à une théorie de macroévolution considérant que l'isolement géographique facilite la spéciation, la sélection favorisant les extrêmes n'étant pas suffisante à elle seule pour vaincre les effets des flux de gènes par hybridations (Plutynski 2010).

Il existe un autre exemple intéressant de la gestion des résistances des insectes ravageurs du coton en Australie qui illustre bien l'intérêt de gérer les résistances. Contrairement au maïs les ravageurs du coton ont été soumis à une période de 30 ans de traitement avec des Organo-phosphorés (OPs) et des Organo-chlorés (OCs) suivie de l'apparition de génotypes très résistants avant qu'une stratégie de gestion n'ait été pensée. L'objectif des programmes de gestion était donc de retourner à un état de sensibilité généralisé en jouant sur : les seuils de nuisibilités acceptables avant déclenchement des traitements pour en diminuer le nombre, la prophylaxie en éliminant les hôtes secondaires, les habitats des ennemis naturels et l'alternance des modes d'action insecticides utilisés. 30 années de gestion des résistances ont permis de faire descendre la fréquence d'individus résistants en dessous d'un seuil économiquement convenable qui permet le contrôle des populations en utilisant moins d'insecticides. La réversion de résistance en pratique est donc réalisable (Herron and Wilson 2017).

La connaissance de l'origine des résistances peut nous aider à élaborer des stratégies de gestion. En effet, les résistances dues à des mutations *de novo* ont des patrons de dispersion différents de celles intrinsèquement présentes dans les populations avant utilisation des pesticides. Les premières sont d'abord localisées sur une zone délimitée (on peut alors avoir des démarches de mise en quarantaine) alors que des résistances déjà présentes depuis des millénaires sont a priori plus dispersées dans l'environnement (et il faut avoir une gestion dans toutes les régions) (Hawkins, Bass et al. 2019).

La prévision des risques d'apparition de résistance en pratique est une discipline très difficile qui se heurte souvent à des erreurs comme beaucoup de celles qui essayent de prédire l'avenir. Les facteurs qui sont utilisés pour modéliser ces risques peuvent être inhérents à l'insecte, à la substance active ou de nature agronomique. Parmi les facteurs de l'insecte, on peut différencier **les facteurs génétiques** (Roush and Tabashnik 1990) :

- Fréquence de l'allèle conférant une résistance. Plus elle est élevée, plus le risque d'apparition rapide de résistance en pratique est grand.
- Nombre de gènes impliqués dans la résistance. Plus il y en a, plus l'inertie sera grande. C'est-à-dire, plus il faudra de temps pour atteindre une accumulation de gènes suffisante et nécessaire

à la survie des individus résistants, mais le retour vers un état de complète sensibilité sera lui aussi plus long.

- Niveau de dominance des allèles de résistance. Les allèles de résistance dominants conduisent à une émergence plus rapide des résistances en pratique car les individus hétérozygotes survivent. Les mutations *de novo* qui passent forcément par un état hétérozygote au moment de leur genèse ne bénéficient d'un avantage sélectif que si elles sont dominantes. Les mutations *de novo* qui conduisent à des phénomènes de résistance en pratique sont donc préférentiellement dominantes. Les observations empiriques vont dans ce sens (Hawkins, Bass et al. 2019). A l'inverse les allèles récessifs sont plus lents à émerger, mais ils peuvent se maintenir à relativement haute fréquence dans les populations même en absence de pression de sélection car le coût de la résistance a souvent le même niveau de dominance il ne s'exprime donc pas à l'état hétérozygote (Hawkins, Bass et al. 2019).
- Coûts associés aux résistances. Plus ce coût est élevé plus la résistance en pratique va être facilement réversible et plus les stratégies de gestion (techniques alternatives aux pesticides, alternance des substances actives, mosaïque, zones refuges) aux champs seront efficaces.

Des facteurs biologiques et écologiques :

- Nombre de générations annuel et fécondité de l'insecte. Chaque génération augmente d'un facteur égal à la fertilité moyenne d'une femelle le nombre potentiel d'individus qui sera en contact avec la pression de sélection. Par exemple les femelles du légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*) sont capables de pondre jusqu'à 800 œufs au laboratoire (Johnson 1987). Si cet insecte fait 2 générations par an, une femelle hivernante pourra avoir jusqu'à 640 000 petits-enfants dans l'année. S'il fait 4 générations par an, l'effectif total de sa descendance pourra être de plus de 400 milliards d'individus. Cela augmente donc considérablement la probabilité d'avoir une nouvelle mutation au bon locus, ou simplement qu'une mutation existante se transmette rapidement.
- Les capacités de dispersion de l'insecte. Plus les insectes dispersent plus la propagation des génotypes résistants sera rapide et plus il y aura de risque qu'une grande zone soit affectée par ce phénomène avant que ça ne soit détecté et que des mesures de gestion ne soient en place. Le succès de dispersion des résistances dépend bien sûr des pressions de sélection dans la zone géographique source et dans celle receveuse mais aussi de la présence ou non de population locale dans la zone receveuse (Miller and Sappington 2017). Par exemple, *Spodoptera frugiperda* est un lépidoptère ayant développé de nombreuses résistances à des insecticides dont au Bt. Polyphage il est aussi très mobile. Il a été montré dans le Nord de l'Amérique qu'il était capable de disperser à plus de 250 km (Johnson 1987). La possibilité d'une migration saisonnière entre les tropiques et les Etats-Unis a même été avancée pour cet insecte qui est en train de coloniser le monde en transportant avec lui son lot de résistances. Une étude récente menée aux Etats-Unis sur la dispersion de ce lépidoptère devenu résistant montre que le brassage important de populations notamment entre plantes hôtes dilue l'effet de l'immigration d'individus résistants et que cela ne cause pas forcément d'augmentation systématique de la CL50, par contre cela assure la présence constante d'allèle de résistance à des fréquences relativement hautes. Ces résultats montrent qu'une stratégie de gestion des résistances doit être réalisée à l'échelle appropriée à chaque situation pour être efficace (Arias, Cordeiro et al. 2019).

- Réservoirs de génotypes sensibles. Comme détaillé au début de ce paragraphe le maintien de zone refuge permet de retarder l'apparition de résistance en pratique grâce à l'hybridation entre phénotypes.
- Degré de polyphagie de l'insecte. Le nombre de plantes hôtes de l'insecte va influencer sur les ressources qui lui sont disponibles et sur la surface qu'il va pouvoir occuper dans le paysage. Par exemple *Myzus persicae* est un puceron généraliste qui se nourrit sur plus de 350 plantes hôtes dont de nombreuses cultures, ce qui facilite son accès aux ressources et donc sa dispersion. C'est un des insectes qui a accumulé le plus de résistances depuis le début de l'utilisation de pesticides (Bass, Puinean et al. 2014). De plus comme détaillé dans le paragraphe sur les origines des résistances, le large éventail d'outil de détoxification que doit développer un insecte polyphage devrait lui donner un avantage adaptatif dont il pourra plus facilement tirer parti pour résister à des pesticides. Cependant les preuves de cette affirmation ne sont pas encore complètement avérées montrant que la polyphagie est un bon indicateur de ce que l'on appelle des insectes ravageurs mais qu'au regard des résistances ce facteur est secondaire (Dermauw, Pym et al. 2018).

Pour résumer les espèces d'insectes les plus à risque sont les plus mobiles, les plus fécondes, les plus polyphages et celles qui ont une vitesse de développement rapide. Cela correspond à une stratégie de type r (stratégie r/K). Les espèces qui développent le plus de résistances sont aussi souvent les plus envahissantes (Rosenheim, Johnson et al. 1996; Hufbauer and Roderick 2005) en effet les qualités requises pour l'une sont aussi favorables à l'autre propriété.

Les **facteurs de risque inhérents à la substance active (SA)** vont influencer sur la pression de sélection. Les principaux sont:

- L'originalité du mode d'action de la SA. Si d'autres substances ayant un mode d'action identique ont été mises sur le marché avant la SA, une pression aura pu présélectionner des allèles de résistance. Cela augmente donc la probabilité de l'apparition d'une résistance croisée par mutation de cible moléculaire ou plus rarement via des résistances non liées à la cible. Par exemple, la cible moléculaire des anciennes molécules organo-chlorées est la même que pour les pyréthriinoïdes entraînant des résistances croisées entre ces deux familles chimiques utilisées successivement l'une après l'autre (Knipple, Bloomquist et al. 1988).
- La persistance de la SA. Cette propriété, très recherchée dans les pesticides d'après-guerre, principalement des organochlorés. Une longue persistance est garante d'une bonne efficacité et donc d'un nombre de traitements (et un coût) limité. Cependant, l'utilisation de ces produits a eu des effets secondaires marqués de deux types : Un impact sur l'environnement très néfaste dénoncé à partir des années 50 (Carson 1968) et l'apparition de résistance chez de nombreux ravageurs (Knipple, Bloomquist et al. 1988). En effet, la pression de sélection étant continue et monotone seuls les insectes résistants peuvent survivre réduisant les réservoirs de génotypes sensibles à néant.
- La facilité à être métabolisé. Certaines substances notamment celle d'origine naturelle sont plus en proie à être dégradées par l'insecte à cause de leur longue coévolution lorsqu'ils sont présents dans la même niche. Par exemple des populations de *M. persicae* se développant sur culture de tabac, riche en nicotine sont insensibles aux néonicotinoïdes (Puinean, Foster et al. 2010).

Les **facteurs de risque opérationnels ou agronomiques** de l'utilisation des SA vont également fortement influencer sur la pression de sélection dans le temps et/ou l'espace. Ils jouent donc sur la taille des surfaces sous sélection ou sur la cadence des traitements :

- Le nombre de plantes hôtes traitées va influencer sur les surfaces traitées. Par exemple le spinosad est une substance entrant dans la composition de nombreux produits insecticides autorisés sur des cultures variées en France pour lutter contre un thrips (*Frankliniella occidentalis*). Des individus ont développé une résistance par mutation de cible à cette substance active (Puinean, Lansdell et al. 2013; Olivares and Siegart 2021).
- Plus le nombre de générations traitées et le nombre d'applications vont être important plus la pression de sélection va être forte. L'incidence sur l'apparition de résistance va donc être la même pour la persistance de la SA.
- Plus les rotations culturales seront courtes (voire inexistantes pour les cultures pérennes) plus le pool d'insectes ravageurs sera sédentaire et plus la pression de sélection se fera sur des lignées d'insectes locaux.
- La monoculture à grande échelle favorise l'apparition de résistance puisque qu'elle revient à limiter la diversité des paysages de traitements phytosanitaires.

B. Mécanismes moléculaires des résistances aux pesticides

Les mécanismes de résistance décrits chez les insectes ravageurs, les adventices et les champignons phytopathogènes convergent entre eux. C'est pourquoi le réseau R₄P a choisi de les classer ensemble en 11 catégories (Figure 5) (R₄P, Barrès et al. 2016). Chez les insectes, on retrouve tous les types de mécanismes, mais ceux impliquant des enzymes de détoxification (5, 6, 7) et des modifications ou amplification de cible (8, 9) sont de loin les plus fréquemment décrits comme impliqués dans des résistances allant jusqu'à de fortes pertes d'efficacité au champ. Le type de mécanisme en jeu aura des conséquences sur : (i) les spectres de résistance, c'est-à-dire le nombre de produits concernés, (ii) les niveaux de la résistance, c'est-à-dire la force de la résistance (iii) et donc sur la gestion des résistances sur le terrain.

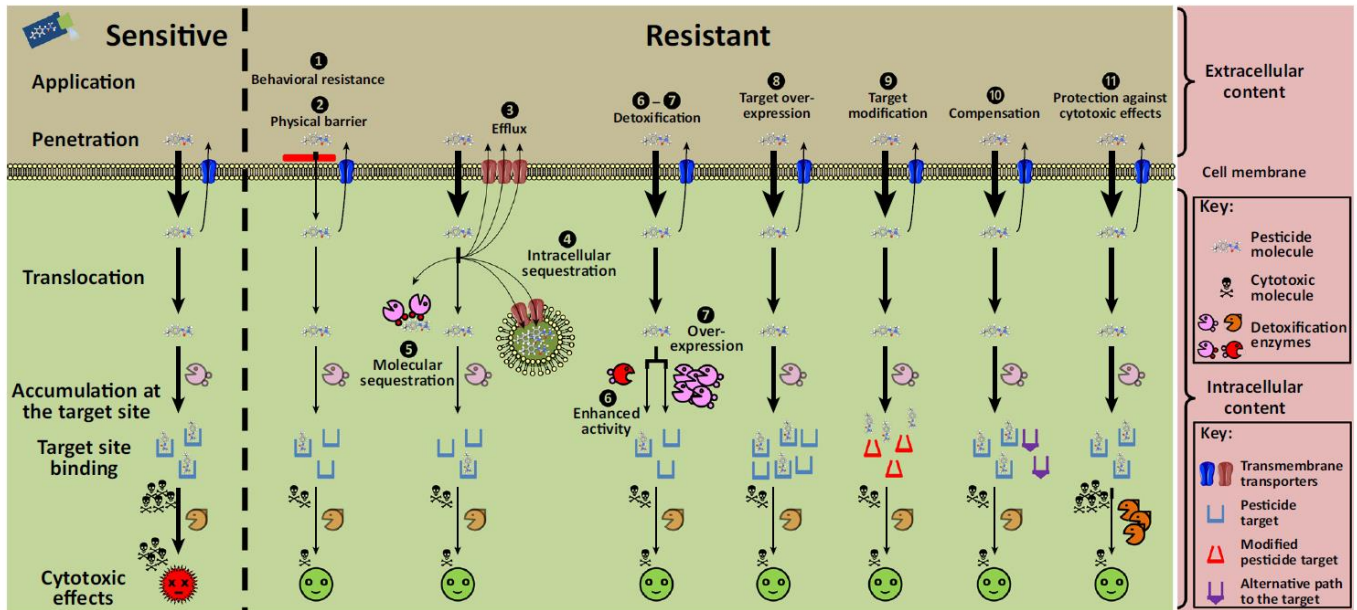


Figure 5 : Mécanismes de résistance aux pesticides. Les génotypes résistants ont des molécules ou des protéines absentes, modifiées ou dérégulées par rapport aux génotypes sensibles, cela perturbe l'action des pesticides. Les mécanismes de résistance peuvent interférer à chaque étape de l'action des pesticides, depuis son contact avec l'organisme jusqu'au déclenchement d'effets cytotoxiques suite à la liaison du pesticide à son site cible. La résistance comportementale (1) réduit l'exposition du bioagresseur à un pesticide. Cela inclut une augmentation de la répulsion ou de l'irritation lorsqu'il est exposé aux pesticides, une modification des préférences du ravageur en matière d'habitat vers des habitats non traités, une modification du cycle de vie entraînant l'absence du stade de développement du ravageur visé par le pesticide à la date du traitement. La pénétration des pesticides peut être limitée (2) par des modifications physico-chimiques de la cuticule, de l'épiderme ou du tube digestif. Plusieurs types de mécanismes peuvent réduire la quantité de pesticide arrivant sur le site de la cible : par l'excrétion via des transporteurs (efflux accru, 3), la compartimentation intracellulaire (4) ou la séquestration par liaison moléculaire (5), la détoxification accrue due à des isoformes enzymatiques plus affines pour le pesticide (6) ou la surproduction d'enzymes neutralisant les pesticides (7). Un autre mécanisme contrant les effets d'un pesticide vise à compenser l'inhibition de la cible par une voie ou une enzyme alternative (10), ou par la neutralisation des molécules cytotoxiques potentiellement générées (11). Tous ces mécanismes sont non liés à la cible moléculaire (RNLC). Ceux qui le sont (RLC) impliquent soit une augmentation de la concentration en cible intracellulaire (surexpression de la cible (8) soit des modifications structurelles diminuant l'affinité de cette protéine pour le pesticide (9). Ces mécanismes de résistance ne sont pas exclusifs et peuvent être combinés au sein d'un même génotype. (issu de R₄P, 2016)

a) Modification ou amplification de cible moléculaire

Les modifications de cible moléculaire des pesticides sont très bien documentées car elles sont responsables de nombreux cas de résistance et que le nombre de gènes impliqués est réduit donc plus faciles à trouver (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste non exhaustive des cibles moléculaires des familles insecticides et des mutations conférant des résistances associées.

Famille chimique insecticide	Cibles moléculaires principales	Noms de mutations connues
Pyréthriinoïdes, OCs	Canal sodium voltage dépendant, <i>para</i>	<i>Kdr</i> , <i>super-kdr</i>
OPs, Carbamates	Acétylcholine estérase, <i>ace2</i>	MACE
Avermectines	Récepteur GABA	Rdlc
Néonicotinides, spinosynes	Récepteur nicotinique à acétylcholine, <i>nAChR</i>	R81T
Anthraniliques diamides	Récepteur à ryanodine	G4946E, I4790M

Chez les insectes un exemple emblématique de ce type de mécanisme est la mutation '*kdr*' pour 'knockdown resistance' située dans le gène *para* codant pour un canal sodique des axones, la cible moléculaire des organochlorés, pyrèthres naturels, des pyréthriinoïdes et des oxadiazines. Les recherches sur les mutations de ce gène ont été grandement facilitées par l'identification du produit du gène *para* chez *Drosophila melanogaster* (Loughney, Kreber et al. 1989). Une partie du gène paralogue chez la mouche domestique (*Musca domestica*) a été séquencée en 1996 (Ingles, Adams et al. 1996; Williamson, Martinez-Torres et al. 1996) et a conduit à la découverte des mutations, L1014F associée au phénotype *kdr*, et M918T à *super-kdr*.

Le niveau de dominance de ces allèles dépend de l'espèce considérée, chez *C. pomonella* *kdr* est récessif (Brun-Barale, Bouvier et al. 2005), alors que chez *M. persicae* il est dominant (Bass, Puinean et al. 2014). Des exemples de ces mutations parmi 20 espèces d'insectes nuisibles ont été compilés dans une revue où 42 mutations simples ou multiples soupçonnées d'être responsables de phénotypes *kdr* sont listées (Rinkevich, Du et al. 2013). Mais plus de 200 espèces présentant des caractéristiques *kdr* ont été décrites. Chez le carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) la mutation *kdr* est associée à un rapport de résistance de 20 pour la deltaméthrine (Sauphanor, Cuany et al. 1997). La mutation *kdr* agit en modifiant les propriétés d'activation du canal ce qui favorise l'état fermé (70 à 80 % des canaux sodiques ne s'ouvrent jamais) alors que les pyréthriinoïdes ne s'y fixent que lorsqu'ils sont ouverts. Il n'y a pas de contact direct entre l'acide aminé modifié et l'insecticide contrairement aux substitutions *super-kdr* M918T et T929I qui favorisent également l'inactivation à l'état fermé, mais accélèrent le taux de dissociation des pyréthriinoïdes jusqu'à 100 fois (Davies, O'Reilly et al. 2008).

L'amplification de la cible moléculaire chez les insectes est un mécanisme beaucoup moins commun que sa modification. Il en existe cependant quelques exemples, dont un chez l'espèce de moustique *Culex pipiens* (Labbé, Berticat et al. 2007a; Labbé, Berthomieu et al. 2007b). Une modification de l'acétylcholine estérase (G119S) responsable de son insensibilité aux insecticides OPs et carbamates est très connue et répandue chez cette espèce. Cependant cette résistance a un fort coût lorsqu'elle est présente sous forme homozygote conduisant à une réduction de plus de 60% de l'activité de l'AchE (Bourguet, Lenormand et al. 1997). Plus récemment des individus porteurs de duplication du gène *ace-1* codant pour cette enzyme ont été détectés. La duplication de ces gènes n'est pas tout à fait exacte puisqu'une copie est porteuse de la mutation alors que l'autre non, ce qui crée une sorte d'hétérozygote permanent qui compense mieux les effets délétères de l'allèle résistant (Labbé, Berthomieu et al. 2007b). Le même phénomène de duplication pour compenser un coût trop important d'une résistance a été observé chez une autre espèce de moustique (*Anopheles gambiae*) (Djogbenou, Chandre et al. 2008). C'est également le cas pour d'autres cibles moléculaires. Ainsi le gène du

récepteur GABA, cible de la famille insecticide des cyclodiènes, a subi les mêmes modifications chez le puceron *M. persicae* (Anthony, Unruh et al. 1998).

L'apparition de programmes de gestion des résistances sur le terrain à partir des années 80, essentiellement basés sur l'alternance des matières actives pesticides, a changé le paysage des types de mécanismes de résistances aux pesticides. En effet, une mutation de cible moléculaire confère une résistance très spécifique à une famille chimique de pesticides. Par exemple, la célèbre mutation *kdr* limite la fixation des pyrèthres et des pyréthrinoïdes sur cette protéine mais n'apporte aucun avantage sélectif face à des néonicotinoïdes (Silva, Santos et al. 2014). La connaissance des modes d'action des pesticides et leur utilisation éclairée ont donc permis d'améliorer leur durabilité en jouant sur des paramètres opérationnels sur le terrain, comme l'alternance des matières actives ou leurs mélanges, la création de zones refuges, la modulation des seuils d'intervention (Georghiou and Taylor 1977). Mais cela a déplacé la pression de sélection vers des gènes plus ubiquistes capables de contrer les effets de plusieurs familles chimiques et biologiques comme ceux impliqués dans la détoxification (Scott 1999; Boaventura, Buer et al. 2020).

b) Détoxification

La détoxification est un terme qui regroupe un ensemble de mécanismes enzymatiques qui dégradent ou conjuguent des molécules toxiques pour l'organisme, afin de faciliter leur séquestration ou excrétion. Cette fonction est donc bien antérieure à l'utilisation des pesticides en agriculture. Elle fait partie des fonctions vitales que la plupart des êtres vivants ont développées pour se protéger des xénobiotiques. Ces voies de détoxification sont nombreuses et peuvent être complexes. Les scientifiques, afin de s'assurer qu'ils parlent de la même enzyme ou du même groupe d'enzyme les ont classifiés et numérotés en fonction de la description du type de réaction catalysée (et non leurs caractéristiques structurales). Un numéro unique leur est attribué par le Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Cette classification est disponible en ligne (<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>). Ce numéro unique commence toujours par « EC. » et est suivi d'une série de chiffres correspondant aux différentes ; familles ; sous-familles... La Figure 6 permet de situer entre elles les différentes enzymes ayant déjà été décrites comme impliquées dans des mécanismes de résistance aux insecticides chez des insectes. Par exemple les glutathion-S-transférases portent le numéro EC.2.5.1.18

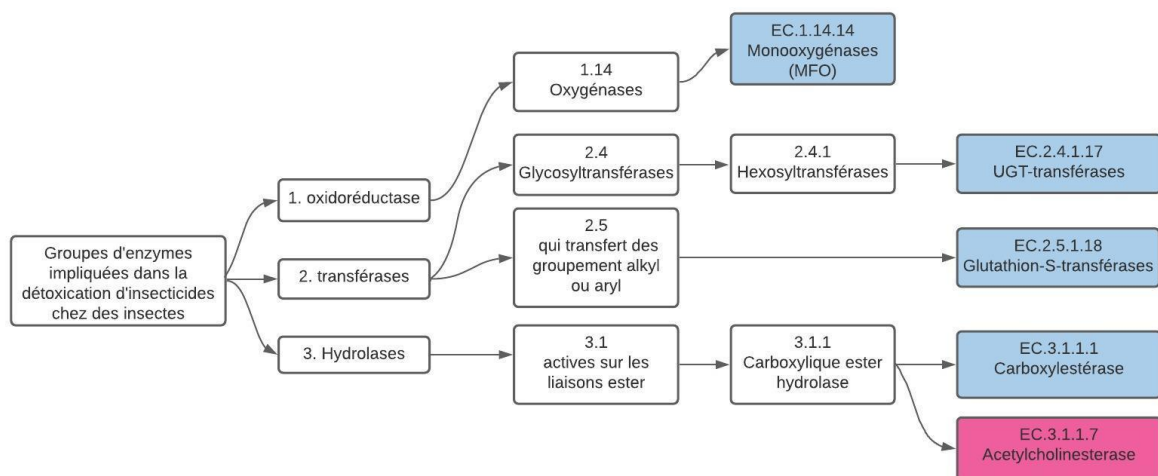


Figure 6 : Localisations au sein de la classification internationale des enzymes des 4 familles

enzymatiques (en bleu) les plus fréquemment impliquées dans des mécanismes de détoxication conduisant à des résistances aux insecticides chez des insectes. Pour information les acétylcholinestérases qui sont des cibles moléculaires des organo-phosphorés ont également été placées sur ce schéma parce qu'elles catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (en rose) (figure créée avec le logiciel Coggle en ligne).

Les systèmes de détoxication chez des plantes, des champignons et des insectes ont été découpés en trois phases. La première implique des étapes d'oxydation, réduction, hydrolyse ou déshalogénéation pouvant par exemple faire appel à des MFO ou des EST. Elle permet de transformer des composés toxiques de faible polarité en métabolites secondaires intermédiaires. Ces derniers vont alors entrer dans la phase 2 où ils subiront des étapes de glutathionylation, acétylation, méthylation ou glucuronidation faisant intervenir des GST ou UGT-transférases. Et enfin la phase 3 consiste à excréter hors de la cellule ou dans les vacuoles, les composés devenus hydrosolubles via des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) (Morel, Meux et al. 2013; Berenbaum and Johnson 2015). Toutefois, certains xénobiotiques peuvent directement subir des réactions de phase 2 sans modification préalable de phase 1 et les réactions de phase 1 peuvent être suivies directement par l'excrétion des toxiques sans intervention des enzymes de phase 2. Ainsi la Figure 7 tirée de Amezian et al 2021 illustre bien que le déroulement de ces différentes phases n'est pas toujours linéaire.

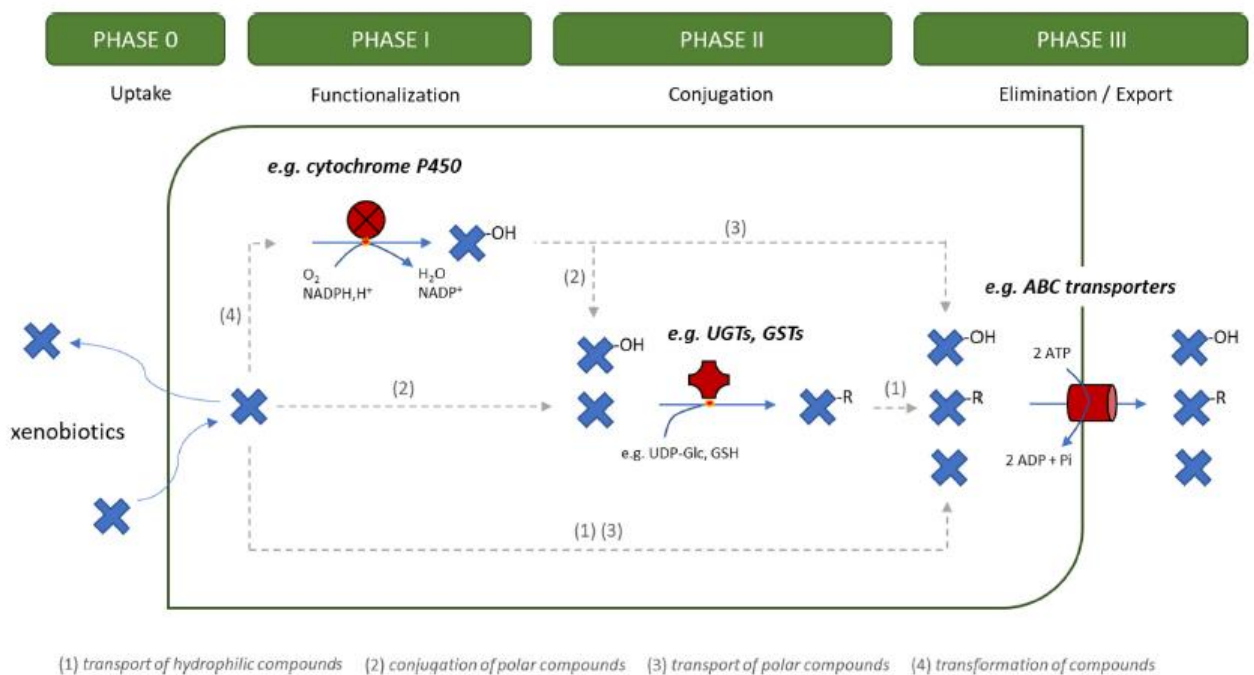


Figure 7 : Schéma général montrant les différentes voies d'élimination des xénobiotiques. La détoxication grâce aux enzymes de phases I et II (illustrées ici par des réactions catalysées par des MFO (p450) et des UGT respectivement). Toutes ces voies d'élimination peuvent fonctionner en parallèle mais certaines d'entre elles peuvent être exacerbées en fonction du xénobiotique concerné (issu de (Amezian, Nauen et al. 2021)).

L'équipe du docteur Rane a publié une étude en 2019 (Rane, Ghodke et al. 2019) portant sur l'analyse de 160 génomes d'insectes d'espèces différentes. Ils y ont recherché et dénombré les gènes appartenant aux familles d'enzymes de détoxications précédemment citées. L'analyse de ces données montre que le nombre de gènes de ces différentes familles est faiblement et positivement corrélé entre eux (Tableau 3). Cela pourrait signifier que ces enzymes fonctionnent de concert. Parmi ces 160 espèces

il y a en moyenne 2,04 fois plus de gènes de MFO que de gènes d'EST, 3,26 fois plus de gènes de MFO que de gènes de GST. Si l'on compare le nombre de gènes codant pour des enzymes de phase I (MFO+EST) à celles de phase II (GST+UGT) on obtient un rapport de 2,59. Il semblerait donc que la phase I ait une plus grande importance.

Tableau 3 : Matrice de corrélation entre les nombres de gènes appartenant à différentes familles enzymatiques de détoxification en se basant sur les 160 génomes d'insectes, publiée en données supplémentaires dans (Rane, Ghodke et al. 2019)

	ABC	EST	GST	MFO	UGT
ABC		0,205891	0,217998	0,1615	0,220636
EST			0,239709	0,25222	0,387935
GST				0,228089	0,356278
MFO					0,287845

Certaines substances sont des inhibiteurs plus ou moins spécifiques de certaines voies de détoxification. Le plus connu et également utilisé en agriculture est le Pipéronyl ButOxide (PBO), il inhibe les MFO. Il est vendu aux agriculteurs sous le terme « synergisant » car il permet de réduire les résistances en pratique lorsqu'il est mélangé à certains produits à base de pyrèthres naturels par exemple. Deux autres inhibiteurs sont souvent utilisés dans les expérimentations qui cherchent à identifier les mécanismes de résistance : le DEF (S,S,S-tributyl phosphorotrithioate) qui stoppe l'action des EST et le DEM (diethyl maleate) des GST. Cependant, d'après mon expérience, la spécificité de ces molécules laisse fortement à désirer.

Les monoxygénases à fonction multiples à cytochrome P450 (MFO)

Généralités

Cette superfamille multigénique regroupe des enzymes dites « hemo-thiolate » à propriétés redox. Elles catalysent l'insertion d'une molécule d'oxygène au niveau d'atomes de carbone, d'azote ou de soufre sur des substrats très variés. Ce faisant, elles vont soit dégrader ou activer des molécules endogènes (hormones, acides gras, composés du métabolisme secondaire comme des phytoalexines...) ou exogènes (polluants, toxiques, pesticides...). Les fonctions cellulaires qu'elles assurent sont diverses mais essentielles c'est pourquoi on les retrouve dans tous les organismes vivants à l'exception de quelques espèces primitives. La plupart des scientifiques étudiant ces enzymes les appellent les « p450 » car leur découverte en 1958 est due à l'apparition d'une couleur jaune orangé quand elles sont mises en contact du monoxyde de carbone traduisant un pic d'absorption à la longueur d'onde de 450 nm. Un « p » pour pigment a été ajouté à cette longueur d'onde pour former cette appellation (Estabrook 2003).

Pour être actives, ces enzymes doivent se lier de façon non covalente, au niveau d'un résidu cystéine spécifique, à un noyau hème constitué de protoporphyrine IX de fer. Sans ce noyau hème la protéine inactive s'appelle apoprotéine. (Nguyen 2007)

Avant la catalyse d'une oxydation, l'atome de fer doit être activé par l'apport d'un électron. Celui-ci est apporté par d'autres systèmes protéiques partenaires des MFO qui vont arracher un électron à du NADPH ou NADH (molécules servant de stockage de l'énergie cellulaire) et le transférer vers le Fer (Figure 8).

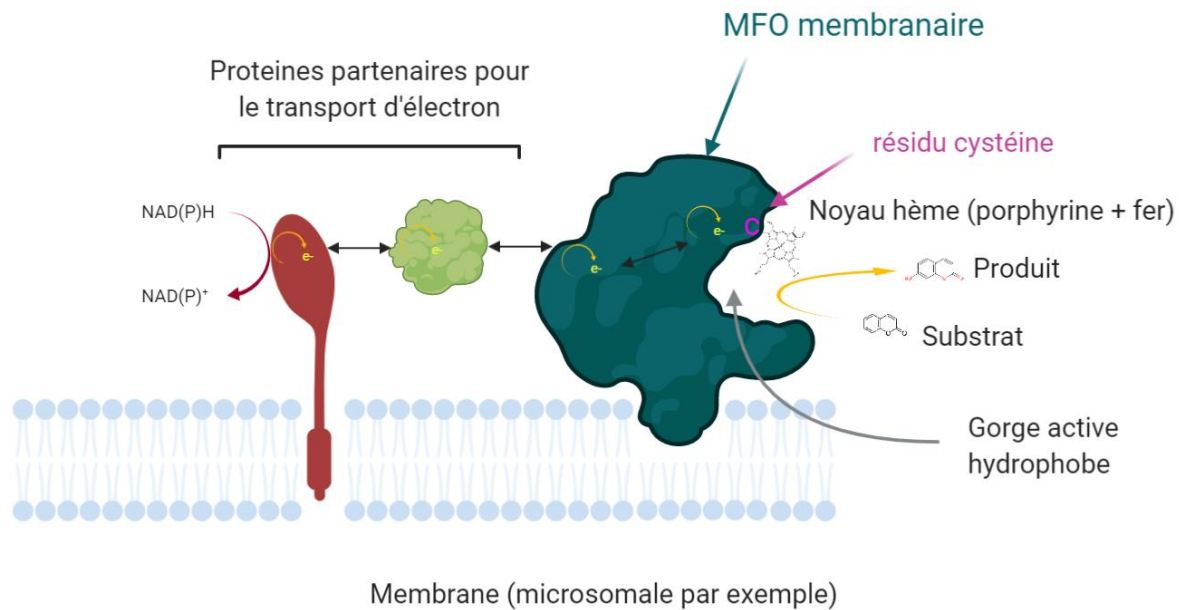


Figure 8 : Organisation schématique d'un système de fonctionnement d'une MFO membranaire (figure créée avec le logiciel en ligne BioRender.com)

La porphyrine est une molécule extrêmement stable qui a même été retrouvée dans des fossiles. Chez les insectes, elle est synthétisée au niveau des corps gras et des cellules trachéales (Kerkut and Gilbert 1985). Elle devra ensuite être transportée vers l'apoprotéine pour s'y lier. La structure atomique de la porphyrine contrôle d'état spin de l'atome central de fer quand elle y est complexée. Ce noyau hème catalyse les réactions d'oxydation en activant les molécules de dioxygène en des entités hautement réactives (ROS) et en les insérant sur toute sorte de substrats.

L'apport en électron nécessaire à cette réaction est obtenu par transfert à partir de partenaires redox. Les différentes MFO ont été regroupées en grandes catégories en fonction des types de partenaires protéiques qui leur apportent ces électrons. Les enzymes impliquées dans la détoxification des insecticides appartiennent à la classe 2. Il existe 4 classes en tout. Elles fonctionnent en binôme avec une NADPH-cytochrome p450 réductase (CPR) issue d'une fusion de trois protéines ancestrales que sont la flavodoxine à FMN, la ferredoxine réductase à FAD et la NADPH-cytochrome b5 réductase. Les apoprotéines se sont différenciées entre elles au cours de l'évolution de façon à incorporer la partie hémique et à orienter dans une position particulière les divers substrats à oxyder. En 2013, 21 039 gènes répartis entre les bactéries, végétaux, champignons, insectes et animaux étaient dénombrés sur le site de David Nelson, la personne en charge de l'attribution des noms de P450 (<http://drnelson.uthsc.deu/CytochromeP450.html>). Une nomenclature s'est donc avérée nécessaire pour les classer plus finement. Elle fut construite en 1989 en se basant sur le degré de similitude dans leur séquence primaire avec trois niveaux de précisions (Nebert, Adesnik et al. 1987; NEBERT, NELSON et al. 1991; Nelson, Kamataki et al. 1993; Nelson, Koymans et al. 1996) :

- Famille (CYP1, CYP2, ...), les protéines de MFO ayant un degré de similitude supérieur à 40%
- Sous-famille (CYP2B, CYP2C, ...), les protéines de MFO ayant un degré de similitude supérieur 55%
- Isoformes appartenant à une même sous-famille sont différenciées par un chiffre supplémentaire (CYP2C8, CYP2C9,...).

MFO chez les insectes, activité induite ou constitutive et résistance aux insecticides

Chez un insecte, les MFO vont s'exprimer différemment en fonction du stade de développement et des tissus observés. Certaines formes sont exprimées à tous les stades de la vie tandis que d'autres sont spécifiques aux adultes ou aux larves. Certaines MFO ne sont présentes que dans quelques tissus, tandis que d'autres sont omniprésentes. De même, les MFO présentent une grande variation en réponse à des inducteurs chimiques endogènes (hormones par exemple), exogènes (xénobiotiques par exemple) ou climatiques (la température) (Scott, Liu et al. 1998). Dans le système endocrinien des insectes, ces enzymes sont impliquées dans les voies de biosynthèse des deux hormones principales rythmant la cadence des mues et la métamorphose : L'ecdysone et l'hormone juvénile. Ces enzymes sont également impliquées dans l'adaptation des insectes phytophages à leur hôte. Un bel exemple de cela est connu pour des espèces du genre *Papilio* ayant des spectres d'hôtes plus ou moins larges. *Papilio polyxenes* se nourrissant exclusivement sur une plante toxique riche en xanthotoxine a développé un système de surproduction de la CYP6B1 capable de l'oxyder (Li, Schuler et al. 2003; Wen, Pan et al. 2003). Alors que *Papilio glaucus*, une espèce généraliste, qui ne rencontre que rarement ces toxines dans son alimentation utilise le CYP6B4 qui a une activité réduite sur ce substrat (Hung, Berenbaum et al. 1997), Li et al 2003). Les CYP6B25 et CYP6B26 de *Papilio canadensis*, un autre polyphage, m'ont qu'une très faible affinité pour cette toxine complètement absente de leur régime alimentaire (Li, Schuler et al. 2003). Dans le genre *Drosophila*, l'espèce *D sechellia* s'est adaptée à son environnement insulaire en développant la capacité de se nourrir sur des baies de *Morinda citrifolia*, toxiques pour les autres espèces de drosophiles. Les mécanismes impliqués sont multifactoriels : modification de récepteurs odorants et gustatifs (Matsuo 2008; Dworkin and Jones 2009) la surexpression de protéines dans le système cholinergique pour compenser l'effet sur la cible (Ninomiya and Kayama 1998), utilisation de la molécule xénobiotique comme source d'énergie et enfin l'implication de certains P450 dans sa métabolisation (Le_Goff 2014).

Des recherches récentes montrent l'implication des MFO dans les mécanismes de résistances à la dessiccation chez la drosophile. L'équipe du Docteur Feyereisen a récemment identifié le gène CYP4G1 comme essentiel dans la synthèse d'hydrocarbures à longue chaîne déposés sur l'épicuticule pour se protéger d'un dessèchement (Qiu, Tittiger et al. 2012).

Les substances actives insecticides ont pour la plupart des propriétés hydrophobes leur offrant une bonne pénétration dans les tissus. En les oxydant les MFO vont les rendre plus hydrophiles facilitant ainsi leur excrétion. Le premier cas de résistance impliquant des MFO a été décrit il y a plus de 60 ans (Eldefrawi, Miskus et al. 1960) initiant une longue série de découvertes similaires chez des insectes ravageurs ou vecteurs de maladies de toutes sortes pour des insecticides appartenant à des familles chimiques variées (Daborn, Yen et al. 2002; Puinean, Foster et al. 2010; Jousen, Agnolet et al. 2012; David, Ismail et al. 2013). La résistance médiée par les monooxygénases est due à une détoxification accrue ou une activation réduite des insecticides. Cette résistance résulte d'un changement de l'activité catalytique du CYP impliqué et/ou d'une modification dans le niveau d'expression de cette enzyme (Oppenoorth 1984). La surexpression des gènes de CYP est le mécanisme majoritaire. Il peut être dû à, une mutation ou une insertion d'éléments transposables au niveau des régions régulatrices (Daborn, Yen et al. 2002; Itokawa, Komagata et al. 2010; Wan, Yin et al. 2019), des modifications d'expression de leurs facteurs de transcription (Misra, Lam et al. 2013) ou d'une amplification génique, c'est-à-dire une augmentation du nombre de copies du gène (Puinean, Foster et al. 2010).

Carboxylestérases (EST)

Généralités

Les carboxylestérases sont des monomères cytosoliques qui présentent peu de similarité entre elles dans leur séquence protéique mais ont de fortes ressemblances dans leur structure tridimensionnelle et une disposition des résidus dans le site catalytique très conservée laissant penser qu'elles découlent toutes d'un même ancêtre commun (Nardini and Dijkstra 1999; Oakeshott, Devonshire et al. 2005). Elles sont composées d'un pli hydrolase alpha/beta et d'une gorge active dans laquelle se trouve une triade conservée contenant un résidu nucléophile (sérine, cystéine ou aspartate), un résidu acide (glutamate ou aspartate) et un résidu histidine. Ces acides aminés ne sont pas contigus dans la séquence primaire, mais se trouvent plutôt dans des régions séparées de 8 à 18 résidus d'acides aminés hautement conservés (Montella, Schama et al. 2012). Il existe une base de données très complète tenue par l'INRAE de Montpellier appelée ESTHER référençant tous les gènes codant pour la superfamille des estérases. En février 2021 elle dénombrait des dizaines de milliers de ces enzymes dont 12 240 gènes appartenant aux carboxylestérases parmi lesquelles 1 552 proviennent d'arthropodes (<http://bioweb.supagro.inra.fr/ESTHER/general?what=overallTable>). L'intérêt des scientifiques pour ces enzymes est grand car comme pour les MFO et les GST elles interviennent dans beaucoup de mécanismes cellulaires allant de la reproduction à la digestion. Elles sont capables d'hydrolyser une liaison ester créant ainsi une molécule d'alcool et une d'acide (Figure 9).

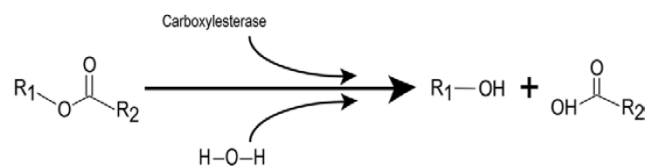


Figure 9 : Réaction basique d'hydrolyse par une carboxylestérase. Une liaison carboxylester est coupée par la carboxylestérase par ajout d'une molécule d'eau formant ainsi deux métabolites : un alcool et un acide.

Plusieurs tentatives de classification des carboxylestérases ont vu le jour sans qu'aucune ne soit entièrement acceptée par toute la communauté. Cela s'explique par la grande diversité au sein de cette famille de gènes et la pauvreté en gènes orthologues entre espèces, signe d'une évolution rapide (Ranson, Claudianos et al. 2002; Claudianos, Ranson et al. 2006; Strode, Wondji et al. 2008; Oakeshott, Claudianos et al. 2010). J'ai choisi de présenter ici la dernière proposition de classification qui m'est apparue être la plus intéressante car elle s'appuie sur le critère phylogénétique qui trouve toute sa pertinence avec la démocratisation des techniques de séquençage haut débit (Figure 10).

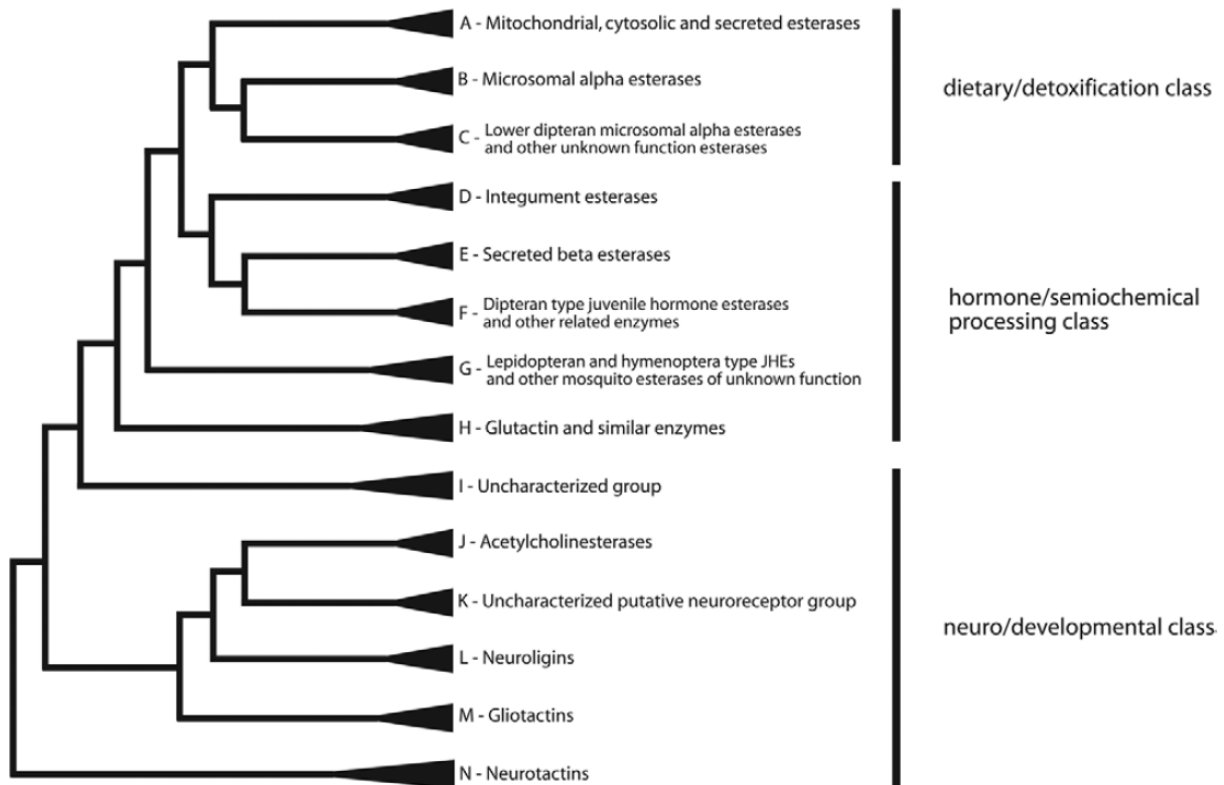


Figure 10 : Classification des carboxylestérases selon un critère phylogénétique proposé par Oakeshott *et al.* 2005. Les noms de clades ont été adaptés par Montella, *et al.*, 2012.

EST chez les insectes et résistance aux insecticides

Une large gamme d'insecticides contiennent des liaisons ester et sont donc sensibles à l'hydrolyse via des carboxylestérases (Sogorb and Vilanova 2002). Chez l'insecte la résistance via les EST peut être acquise grâce à une augmentation d'affinité entre l'insecticide et l'enzyme induite par une mutation. Le Tableau 4 donne des exemples où ce phénomène a été observé.

Tableau 4 : Liste de carboxyl/cholineestérases modifiées impliquées dans des résistances à des insecticides (tableau adapté de (Hotelier, Nègre *et al.* 2010))

Ordre	Espèce	Enzyme	Mutation
Diptera	<i>Cochliomyia hominivorax</i>	cocho-E3aest7	G137D, W251S
	<i>Drosophila melanogaster</i>	drome-EST23aes07	G137D, W251L
	<i>Lucilia cuprina</i>	luccu-E3aest7	G137D/E/H/R, Y148F, E217M, W251A/G/L/S/T, F309L, F354/W
	<i>Musca domestica</i>	musdo-EST23aes07	G137D, W251S/C
Hymenoptera	<i>Anisopteromalus calandrae</i>	anica-cxest	W220G
Hemiptera	<i>Aphis gossypii</i>	aphgo-cxest	K14Q/N354D
Arachnida	<i>Boophilus microplus</i>	boomi-este13	D374N

Comme pour les GST et les MFO les résistances impliquant des EST peuvent être causées par une augmentation d'activité due à des modifications dans les régions régulatrices de l'expression des gènes ou par simple amplification génique. Par exemple, chez le puceron *Myzus persicae* deux gènes adjacents : les carboxylestérases E4 et FE4 sont amplifiées en tandem (Field, Javed et al. 1994; Field and Devonshire 1997). La résistance aux OPs et carbamates de cette espèce de puceron est autant due à de l'hydrolyse qu'à de la séquestration moléculaire des insecticides (Bass and Field 2011). Le processus complet d'hydrolyse étant très lent pour cette famille de molécule cela inactive temporairement les EST impliquées. L'implication de la surexpression d'EST a été détectée chez des organismes résistants appartenant aux ordres des Hémiptères, Hyménoptères, Lépidoptères et Diptères (Li, Schuler et al. 2007).

Les glutathion-S-transférases (GST)

Généralités

Comme pour les MFO, la découverte des GST date des années 60 avec l'observation d'une modification enzymatique liée à la présence de glutathion qui permettait de diminuer la toxicité cellulaire de composés aromatiques halogénés, dans des cellules du foie (Booth, Boyland et al. 1961). Cette même activité de conjugaison a été observée 10 ans plus tard dans des plantes de sorgho résistantes à l'atrazine, un herbicide (Lamoureux, Shimabukuro et al. 1970). Par la suite, les enzymes partageant de fortes identités de séquence et des activités catalytiques similaires ont été regroupés dans une même famille : les glutathion transférases aussi appelés Glutathion-S-transférases. Ces enzymes impliquées dans la deuxième phase de détoxification cellulaire furent d'abord connues pour leurs capacités à dégrader des xénobiotiques. C'est comme cela qu'un grand nombre d'isoenzymes de GST ont été identifiés chez les lépidoptères polyphages contre un nombre plus restreint chez les spécialistes (Yu 1989).

Les transférases (EC 2.) désignent une superfamille d'enzymes multifonctionnelles, très répandue. Elles sont présentes dans une large gamme d'organismes comprenant des plantes, des invertébrés et des mammifères (Frova 2006). Cette présence ubiquiste laisse supposer une origine très ancienne de ces enzymes ayant des fonctions fondamentales conservées au cours de l'évolution. Pour être actifs, ces dimères portent un motif thiorédoxine et un résidu catalytique dans la gorge active qui était historiquement une cystéine puis a évolué vers une serine et enfin une tyrosine. L'équipe du docteur Frova a proposé un modèle évolutif des GST basé sur un ancêtre commun qui permet de placer l'apparition des différentes classes de GST au cours de l'évolution.

La nomenclature des GST se décompose en trois parties : le nom de l'espèce d'où elle a été isolée, sa classe et un numéro attribué suivant l'ordre de découverte ou l'homologie du génome. Par exemple, AgGSTD5-5 est une GST de *A. gambiae*, où "D" se réfère à la classe delta et le double numéro "5-5" indique une enzyme homodimère.

Malgré des spécificités biochimiques de chaque transférase, elles partagent toutes la capacité de catalyser la conjugaison de différents composés électrophiles, comme ceux produits par les MFO, avec des coenzymes endogènes hydrosolubles, comme le glutathion sous sa forme réduite (GSH), l'acide UDP-glucuronique ou la glycine, pour permettre leur métabolisation ou excrétion ultérieure (Sheehan, Meade et al. 2001). Le site actif des GST est situé à l'interface de ses deux sous-unités formant un dimère par liaison de leurs domaines N-terminaux. Ce site appelé « G » est hautement conservé et

responsable de la liaison d'un tripeptide de l'enzyme au glutathion. Les résidus les moins conservés sont situés dans les domaines C-terminaux, ils définissent la séquence du site H, qui conditionne la spécificité du substrat (Agianian, Tucker et al. 2003; Chen, Hall et al. 2003; Winayanuwattikun and Ketterman 2004) (Figure 11).

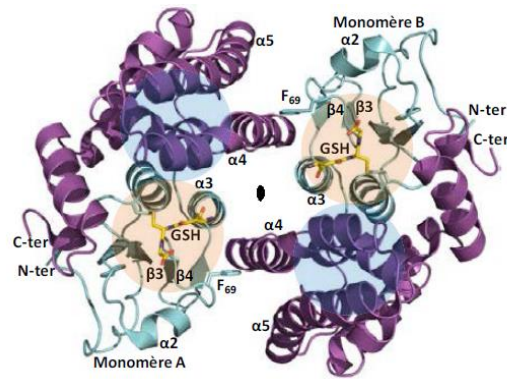


Figure 11 : Structure tridimensionnelle classique de la GSTO1-1 dimérique (code PDB : 1EEM). Les domaines N-terminaux et C-terminaux sont représentés respectivement en cyan et violet et les sites G et H par des pastilles orange et bleues. Les sous-unités s'associent selon un axe structural C2 (ovale noir), le domaine N-terminal d'un monomère interagit avec le domaine C-terminal de l'autre monomère. GSH : glutathion représenté en bâtonnets (Lallement, Brouwer et al. 2014).

GST chez les insectes, et résistance aux insecticides

Comme dans d'autres taxons, chez les insectes, ces enzymes sont codées par des familles multigéniques qui couplées à des possibilités d'épissage alternatif (Ranson, Collins et al. 1998) et la formation d'hétérodimères (Piromjitpong, Wongsantichon et al. 2007), sont source d'hétérogénéité fonctionnelle. Les recherches sur les GST des insectes se sont presque exclusivement focalisées sur leur rôle dans la détoxification des xénobiotiques et dans la désactivation des odeurs (Kostaropoulos, Papadopoulos et al. 2001). Leur implication dans des fonctions protectrices contre les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif en réponse à l'infection par des agents pathogènes (Dubovskiy, Martemyanov et al. 2008), l'exposition aux pyréthrinoïdes (Vontas, Small et al. 2002) et le vieillissement (Seong, Matsuo et al. 2001) a également été mis en évidence. Des études préliminaires sur des préparations homogènes de GST, ont confirmé la présence de multiples formes de GST se différenciant par des spécificités et affinités de substrat, en fonction du stade de vie, des conditions d'alimentation, de l'exposition aux xénobiotiques (Prapanthadara, Koottathep et al. 2000; Francis, Vanhaelen et al. 2005). En outre, les données d'annotation provenant des projets de génome et des bibliothèques d'expression disponibles confirment la diversité élevée des GST chez les insectes (Ranson, Claudianos et al. 2002). À ce jour, les GST cytosoliques et microsomiques annotées et/ou fonctionnellement caractérisées chez les insectes sont classées selon plusieurs caractéristiques : leur séquence protéique primaire, leurs propriétés structurales immunologiques, cinétiques et tertiaires/quaternaires (Chelvanayagam, Parker et al. 2001; Mannervik, Board et al. 2005). Bien que la similarité des séquences ne soit pas le seul critère de classification, en général, les GST d'un même clade partagent plus de 55 % d'identité. Les GST trouvées uniquement chez les insectes ont été attribuées aux classes Delta et Epsilon, et sont principalement impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques (Ranson, Claudianos et al. 2002). Les GST des insectes impliquées dans des voies métaboliques plus larges et présentes chez différentes taxons

appartiennent aux classes Omega, Sigma, Tetha et Zeta (Agianian, Tucker et al. 2003; Yamamoto, Zhang et al. 2005).

La flexibilité fonctionnelle de cette famille d'enzyme s'illustre également par une distribution tissulaire hétéroclite allant de l'intestin moyen au corps gras en passant par les cellules de l'hémolymphe (Konno and Shishido 1992; Franciosa and Berge 1995; Mittapalli, Neal et al. 2007). Étant donné cette complexité, la mise en correspondance des données de séquences avec les modèles d'expression dans différents tissus, le stade de développement et les conditions d'adaptation peut aider à déduire la fonction d'une GST.

Ces enzymes sont bien connues pour être impliquées dans la détoxification des composés endogènes et xénobiotiques par conjugaison du glutathion, ou simple liaison passive/sacrificielle (Hayes and Wolf 1988; Mannervik, Helena Danielson et al. 1988; Pickett and Lu 1989; Yang, Cheng et al. 2001). Le premier cas de résistance imputé à ces enzymes a été décrit en 1979 dans une population de mouche domestique (*Musca domestica*) résistante à des organophosphorés (Oppenoorth, Van der Pas et al. 1979). 13 ans plus tard, ce phénomène a été imputé à une surexpression d'une isoenzyme de GST spécifique (Fournier, Bride et al. 1992). Depuis de nombreux autres cas de résistance à divers insecticides ont été attribués à la surexpression de ces enzymes, par exemple, à des organochlorés chez *Drosophila melanogaster* (Tang and Tu 1994) à des pyréthriinoïdes chez un hémiptère, *Nilaparvata lugens* (Vontas, Small et al. 2002), ou chez des espèces de moustiques au DDT (Hemingway and Ranson 2000). Cette deuxième phase de détoxification impliquant les GST est particulièrement importante pour les insecticides appartenant aux organophosphorés, car la première phase conduit à leur activation grâce à la production de formes oxon. Les cas de résistance aux pyréthriinoïdes impliquent deux mécanismes originaux des GST : L'activité peroxidase qui permet de lutter contre les stress oxydatifs induits par ces pesticides (Vontas, Small et al. 2002) et la simple séquestration moléculaire (Kostaropoulos, Papadopoulos et al. 2001).

UGT-transférases

Généralités

Elles font partie de la famille des transférases comme les GST mais ont comme co-enzyme l'uridine diphosphate (UDP)-glucuronate à la place du glutathion. Ainsi elles catalysent l'addition covalente de sucres à une large gamme de molécules lipophiles. Cette biotransformation joue un rôle essentiel dans l'élimination d'une large gamme de produits chimiques exogènes et de sous-produits du métabolisme endogène, et contrôle également les niveaux et la distribution d'hormones (Lévesque, Turgeon et al. 2001). Chez les mammifères, la superfamille comprend quatre familles : UGT1, UGT2, UGT3 et UGT8. Les enzymes UGT1 et UGT2 sont bien connues en pharmacologie et en toxicologie humaine (Chanawong, Mackenzie et al. 2017). Ces enzymes monomériques et membranaires sont généralement localisées au niveau de l'appareil de Golgi (Chang, Singh et al. 2011).

UGT-transférases chez les insectes et résistance aux insecticides

Ces enzymes sont très peu connues en dehors de la médecine humaine. Cependant, j'ai choisi de les présenter ici car une étude récente a montré leur rôle dans la résistance à un OP d'un nématode hématophage (Kotze, Ruffell et al. 2014), et des études exhaustives des génomes et transcriptomes d'une espèce de moustique (*Aedes aegypti*) semble montrer qu'elles sont différemment exprimées dans les populations résistantes à des insecticides (Poupardin, Riaz et al. 2012; David, Faucon et al. 2014; Faucon, Dusfour et al. 2015).

Efflux

Ce mécanisme est très connu pour être responsable de résistances de champignons phytopathogènes aux fongicides (Deising, Reimann et al. 2008). Il provoque des résistances de type MDR pour « multidrogue résistance » qui ne sont pas spécifiques à un fongicide en particulier (Leroux and Walker 2013). Bien que moins connue, cette stratégie existe aussi chez les insectes ravageurs (Akbar, Aurade et al. 2014). Elle implique l'amplification ou la modification de canaux protéiques de type ABC transporteurs de la phase 3 de la détoxification cellulaire. La preuve de l'existence d'une surexpression synchronisée entre une MFO et un gène ABC transporteur chez un champignon devenu résistant a été apportée récemment par un consortium de chercheurs américains qui ont montré qu'un facteur de transcription modifié était à l'origine de ce dérèglement (Sang, Hulvey et al. 2018). Encore, peu connu chez les insectes, il existe cependant quels exemples pour qui ce mécanisme a été mis en cause (Gott, Kunkel et al. 2017). Les nouvelles technologies de séquençage offrant un point de vue plus large et exhaustif des gènes impliqués dans les différentes voies des résistances ont montrées que bien que secondaire, ils jouent un rôle dans le paysage des mécanismes de résistance qu'il faut prendre en compte surtout lorsque l'on étudie les résistances croisées (Xiao, Zhang et al. 2018).

Régulation de l'expression des gènes de détoxification

L'expression des enzymes de détoxications peut-être induite par des xénobiotiques. Les voies d'induction impliquent des facteurs de transcription et/ou des récepteurs nucléaires. Au début de l'induction, ces derniers sont maintenus dans le cytoplasme. Suite à leur liaison avec une molécule de xénobiotique elles vont se transloquer dans le noyau où elles s'apparient avec une autre protéine puis à l'ADN au niveau d'un site précis portant un motif défini. Cela provoque alors la transcription du gène se trouvant en aval (Le_Goff 2014). Les séquences régulatrices sont de courtes séquences répétées de quelques nucléotides placées en amont des gènes (Handschin and Meyer 2003) ainsi un même facteur de transcription peut activer différents gènes. Par exemple, le facteur de transcription nommé AhR pour aryl hydrocarbure récepteur peut activer les gènes de CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 (Jones and Whitlock 1990; Nelson, Koymans et al. 1996; Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007). Les voies utilisées par les facteurs de transcription, régulateurs de la détoxification, sont encore peu connues chez les insectes, mais une revue très récente recense nos connaissances sur le sujet (Amezian, Nauen et al. 2021). Cinq voies de régulation de l'expression de gènes de détoxification ont été partiellement décrites (Figure 12). Par exemple, des travaux sur *D melanogaster* ont montrés que CncC (cap 'n' collar isoform-C) était le principal facteur de transcription régulateur de l'expression des gènes de la détoxification chez cet insecte (Misra, Horner et al. 2011). Un site de liaison de ce facteur a été trouvé dans le promoteur du gène CYP6A2. Une surexpression forcée de CncC a pour effet d'induire l'expression des gènes de détoxification en absence de xénobiotiques. Une autre équipe de recherche a également montré que des souches résistantes au DDT portent le motif de fixation de CncC dans le promoteur de CYP6A2 qui est sur exprimé dans ces souches en comparaison de la souche de référence sensible n'ayant pas le motif (Wan, Liu et al. 2014).

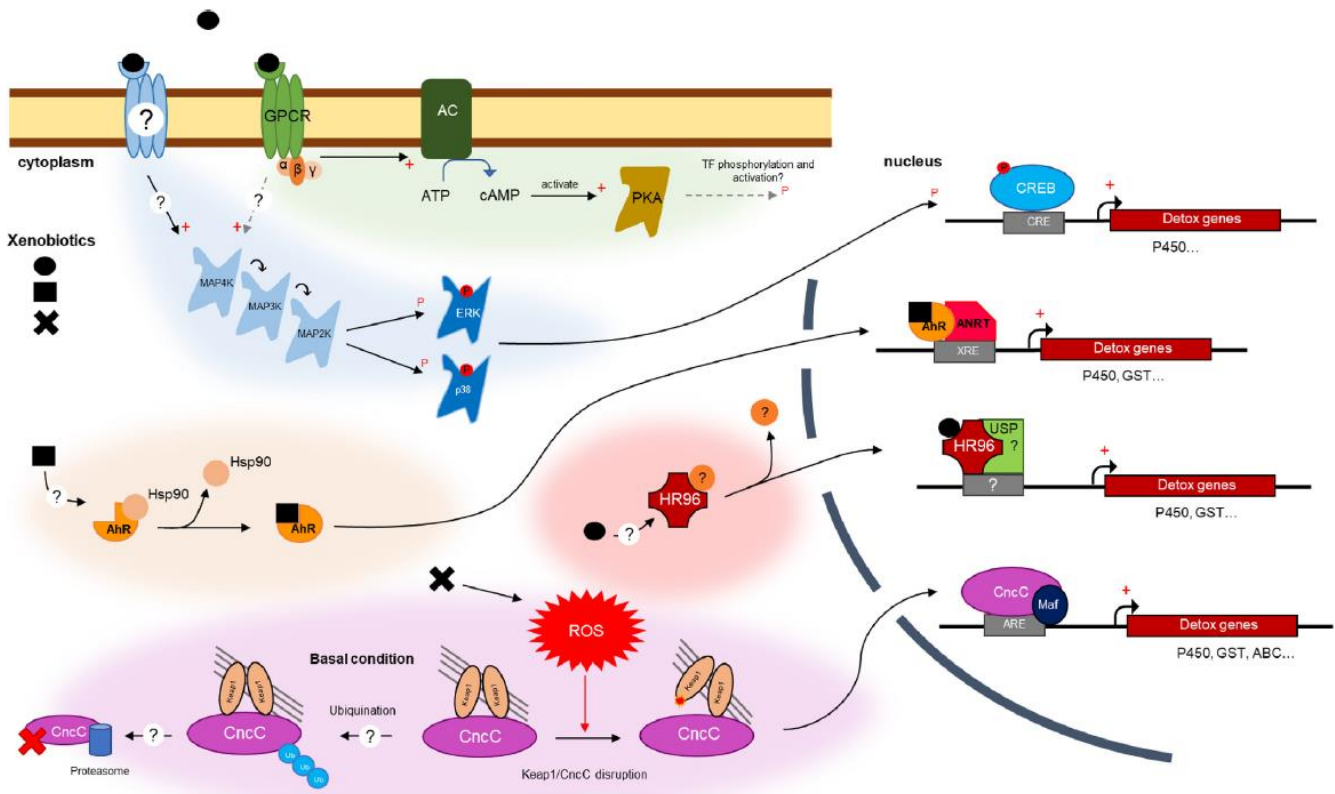


Figure 12 : Voies de régulation de l'expression des gènes de détoxification chez les insectes. A ce jour, cinq voies de signalisation de gènes de détoxification impliqués dans le métabolisme des composés végétaux et la résistance aux insecticides ont été plus ou moins entièrement décrites : la voie de signalisation GPCR (vert), la voie MAPKs-CREB (bleu), la voie AhR/ARNT (orange), la voie HR96 (rouge) et la voie CncC/Keep1 (violet). Issue de (Amezian, Nauen et al. 2021).

c) Autres mécanismes de résistance

Modification cuticulaire

La cuticule d'un insecte est constituée d'un ensemble de protéines tannées et de polysaccharides azotés (la chitine). Chez les insectes, elle est composée de l'épicuticule, l'exocuticule, l'endocuticule recouvrant une couche de cellules épidermiques. L'étude de l'épaisseur de la cuticule des insectes a été l'un des premiers sujets de recherche sur les mécanismes de résistance aux insecticides. Pour cela des insecticides radio-marqués au ^{14}C ont été utilisés pour suivre leur pénétration dans le corps de l'insecte. Différentes modifications, responsables de ralentissement de pénétration, dans le corps d'individus résistants ont alors pu être observées :

- Une augmentation de l'épaisseur de l'épicuticule
- ou de la procuticule (=Exo+Endocuticule)
- ou modification de la composition de la cuticule

Dans leur review, Balabanidou *et al.* (Balabanidou, Grigoraki et al. 2018) citent 13 études démontrant qu'un de ces trois phénomènes était responsable de résistance à des OCs ou des pyréthriinoïdes (qui sont des insecticides de contact).

Mécanismes compensatoires

Comme décrit dans le paragraphe sur les GST, certaines enzymes, qui interviennent dans le maintien de l'équilibre redox d'une cellule, peuvent compenser l'effet de la fixation d'un insecticide sur sa cible moléculaire en éliminant les radicaux libres émis qui conduiraient à la mort cellulaire s'ils n'étaient pas rapidement éliminés. Certaines études exploratoires sur les résistances de moustiques à des insecticides utilisant des NGS montrent qu'elles sont dérégulées chez des insectes résistants sans que l'on connaisse exactement leur rôle (Riaz, Poupardin et al. 2009; Faucon, Dusfour et al. 2015).

Résistances comportementales

Plus difficiles à étudier ces résistances ont cependant été décrites en 2007 au Japon chez une tordeuse du thé (*Adoxophyes honmai*) devenue résistante à la confusion sexuelle (Tabata, Noguchi et al. 2007). Elle a pour cela modifié la composition de ses récepteurs olfactifs pour se focaliser sur les composés secondaires du bouquet phéromonal. Ce changement lui confère la capacité à trouver son partenaire sexuel même dans une atmosphère saturée en phéromone sexuelle. Un autre exemple plus récent a été décrit chez la mouche domestique (*Musca domestica*) capable d'éviter les pièges empoisonnés avec de l'insecticide. Une équipe de recherche a montré que les allèles responsables de ce comportement d'évitement étaient situés sur les chromosomes 4 et 1 et avaient des niveaux de dominance intermédiaire (Hubbard and Gerry 2021).

C. Résistances et plasticité

a) Résistance multiple et résistance croisée

Les résistances croisées et multiples se définissent toutes les deux par la capacité d'un individu à survivre à une exposition à au moins deux SA, mais elles ont un déterminisme génétique différent. La première est régie par un seul évènement génétique (une mutation par exemple) et la seconde correspond à l'accumulation de plusieurs allèles de résistances conférant chacun une résistance à une substance. Cette différence peut paraître banale cependant elle va conditionner le type de protocole de gestion à mettre en place. En effet, une résistance multiple pourra être « cassée » au fil des générations par le jeu des recombinaisons modifiant ainsi le spectre de résistance chez les descendants alors qu'une résistance croisée sera transmise dans son intégralité à sa descendance. L'alternance des produits ne pourra pas limiter sa propagation. Les résistances croisées sont, chez les insectes, souvent l'apanage de la détoxification (Oakeshott, Devonshire et al. 2005; Li, Schuler et al. 2007; Nauen 2007; Carvalho, Azeredo-Espin et al. 2010; Farnsworth, Teese et al. 2010). Il existe également des résistances croisées entre pesticides ainsi chez une espèce de moustique une résistance induite par un herbicide, le glyphosate, est source d'innocuité contre de l'imidaclopride et de la perméthrine (Riaz, Poupardin et al. 2009). Cependant, un gène peut être induit par un composé mais n'avoir aucune capacité de dégradation de ce même composé (Giraud, Unnithan et al. 2010).

L'espèce de moustique vectrice de la malaria (*Anopheles gambiae*) est un exemple typique de résistance multiple. Une souche a accumulé trois gènes de résistances conférant chacun indépendamment une résistance à un ou deux insecticides (Adolfi, Poulton et al. 2019).

Les MFO offrent un exemple intéressant de ces concepts qui peuvent se combiner entre eux (Résistances multiples et croisées en même temps) chez la drosophile :

- Un gène, ici la CYP6G1 est capable de métaboliser du DDT et des néonicotinoïdes (Giraud, Unnithan et al. 2010). Il s'agit donc d'une résistance croisée simple.
- Le phénorbital induit plusieurs gènes : CYP6A2, CYP6A8, CYP6D5 CYP6W1 et CYP12D1. Parmi eux CYP6A2 est capable de métaboliser des organophosphorés (Dunkov, Guzov et al. 1997) et sa surexpression dans des souches transgéniques entraîne une résistance au nitenpyram et au diazinon. De plus, CYP12D1 confère une résistance au DDT et au dicyclanil (Daborn, Lumb et al. 2007). Il s'agit donc ici d'une combinaison entre une résistance multiple et une résistance croisée.

Il est commun de trouver des combinaisons de mécanismes de résistance dans la nature surtout quand il s'agit de détoxification. Dans leur review bibliographique, Hardstone et Scott ont synthétisé l'ensemble des résistances multiples connues afin de déterminer la proportion de cas où l'accumulation de gènes de résistance était synergique, additive ou antagoniste (Hardstone and Scott 2010). Ils montrent que lorsque les gènes sont à l'état homozygote leur effet est plus souvent synergique, même si il y a des exceptions. A l'état hétérozygote, les effets sont le plus souvent additifs. Les très rares études sur les interactions de gènes à différents états semblent montrer plutôt une synergie (même si le trop faible nombre de cas ne permet pas de conclure) (Hardstone and Scott 2010). Outre les interactions entre gènes, cet article montre que les mutations de cibles sont souvent combinées à des mutations de détoxification.

Si l'on considère que le phénotype de résistance suit une loi normale au sein d'une population, la théorie prédit que le nombre de gènes de résistance sélectionnés dépend du type de sélection. Ce nombre de gènes serait fonction de la proportion d'individus capables de survivre au traitement insecticide dans la population de départ. Une sélection douce aboutirait préférentiellement à une résistance polygénique, en combinant des facteurs de résistance communs préexistants qui ont un effet mineur, tels que la taille du corps et le taux de développement, tandis qu'une sélection forte favorise les mutations rares dans des gènes uniques qui ont un effet majeur - une réponse monogénique (McKenzie and Batterham 1994).

Dans une étude sur les résistances multiples et croisées chez une espèce de moustique utilisant des NGS l'équipe de Jean-Philippe David a fait évoluer une même population sur trois insecticides différents, l'imidaclopride, la perméthrine et le propoxur puis a observé les différences d'expression de gènes et les mutations (David, Faucon et al. 2014). Les individus exposés à l'imidaclopride présentent une forte réponse en termes de transcription différentielle avec de nombreux gènes surexprimés par rapport à la population sensible, contrairement à celle sélectionnée avec de la perméthrine qui compense avec de nombreuses mutations. Les individus sélectionnés avec du propoxur ont un profil intermédiaire. Les gènes modifiés par les traitements jouent sur la synthèse de la cuticule, sur la détoxification, le transport dans la cellule et la réponse immunitaire (Figure 13).

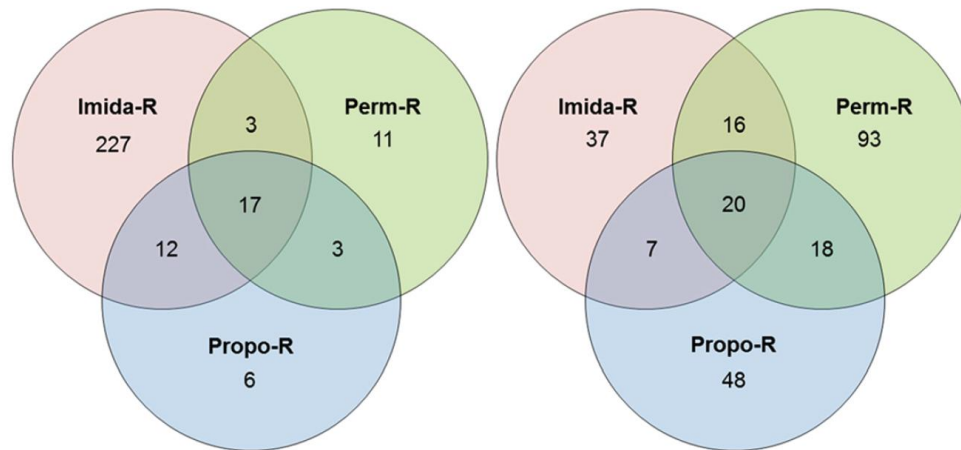


Figure 13 : Ces diagrammes représentent le nombre de transcrits différentiellement exprimés (à gauche surexprimés ; à droite sous-exprimés) dans trois souches de moustiques issus de la même population après une sélection insecticide ; Imida-R avec de l'imidaclopride ; Perm-R avec de la perméthrine ; Propo-R avec du propoxur (Tiré de (David, Faucon et al. 2014))

b) Coût physiologique des résistances

Il arrive que des gènes de résistance aient des effets pléiotropes, c'est-à-dire qu'ils affectent plusieurs caractères phénotypiques en même temps (Rose 1982; Moller, Smith et al. 1989). Comme expliqué dans le paragraphe sur l'origine des résistances ces corrélations sont souvent négatives de sorte qu'un avantage sélectif gagné est souvent accompagné d'un coût (Holloway, Povey et al. 1990). Ces effets délétères seraient la conséquence de l'impact du gène de résistance sur la physiologie de l'insecte, modifiant ainsi certains traits d'histoire de vie comme la reproduction ou le développement (Boivin, Chabert d'Hieres et al. 2001). L'origine de ces coûts est due, soit à une dérivation de l'énergie de l'individu résistant pour l'expression des mécanismes de résistance aux dépens d'autres fonctions physiologiques, soit au fait que la mutation causale de la résistance interfère avec la fonction d'origine du gène sur laquelle elle est située (Uyenoyama 1986; Coustau and Chevillon 2000). La première a été observée dans le cas de surproduction constitutive d'enzymes de détoxification (Fournier, Bride et al. 1987) et la seconde est bien connue chez la mutation MACE dans l'AchE induisant une moindre sensibilité à son substrat d'origine l'Ach (Raymond, Fournier et al. 1986). Cependant cette notion de coût est sans doute trop simplifiée par les agronomes car dans la nature elle est intimement liée à l'environnement. Ainsi, une mutation peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes par exemple en fonction de la dose d'insecticide en présence (Lenormand, Harmand et al. 2018). Cette notion fait écho à la notion de paysages adaptatifs qui dit que certains génotypes ou phénotypes vont évoluer vers des « sommets » différents où la fitness est meilleure que les génotypes/phénotypes les plus proches (McCandlish 2011).

c) Outils pour détecter et comprendre les résistances

Résistances et NGS : structuration des gènes de résistance dans le génome

La démocratisation des techniques de séquençage haut débit a révolutionné les possibilités pour les biologistes, qui ont pu passer de l'étude d'une poignée de gènes à une vision élargie de l'ensemble, ou presque, d'un génome, d'un transcriptome ou d'un épigénome. Ce changement d'échelle en est encore

à ses balbutiements et chaque année est porteuse d'une innovation technique ou analytique. Une des premières leçons que nous ont apportées ces NGS sur la thématique des résistances aux insecticides est qu'une partie des gènes de résistances est organisée dans le génome en cluster (Rose, Chapman et al. 2011; Lucas, Miles et al. 2019; Gimenez, Abdelgaffar et al. 2020). Une des explications à cela pourrait être le phénomène d'amplification génique (le fait de dupliquer des gènes). C'est un mécanisme simple qui permet d'augmenter le nombre de transcrits d'un gène sans que le jeu aléatoire des mutations n'ait à intervenir. Elle implique souvent que les différentes copies du gène soient positionnées sur le même chromosome voir à proximité. Ces amplifications géniques peuvent faire intervenir des transposons activés par des stress. Un célèbre exemple de ce phénomène a été décrit par l'équipe du docteur Mouchès (Salvado, Bensaadi-Merchermek et al. 1994) chez des moustiques (*Culex pipiens*) ayant développé des résistances à des OPs grâce à une surexpression de carboxylestérases. La duplication peut aussi être simplement la conséquence d'un mécanisme de réparation non homologue de l'ADN type crossing-over inégal ou échange ectopique. Les GST aussi sont connues pour être organisées sous forme de cluster chez l'*Anopheles gambiae* (Ding, Orтели et al. 2003). L'analyse phylogénétique des GSTs a également montré que les gènes de GST paralogues sont toujours plus abondants que les GSTs orthologues. Par exemple, *Tribolium castaneum* compte de nombreux gènes de CYP regroupés en clusters (Zhu, Moural et al. 2013). Cela traduit des événements de duplication successifs à l'origine de l'augmentation du nombre de copies de gènes (Figure 14). Ces copies évoluent, se différencient jusqu'à n'être plus régulés de la même façon c'est par exemple le cas au sein du cluster de CYP9 chez *Spodoptera frugiperda* (Le_Goff 2014).

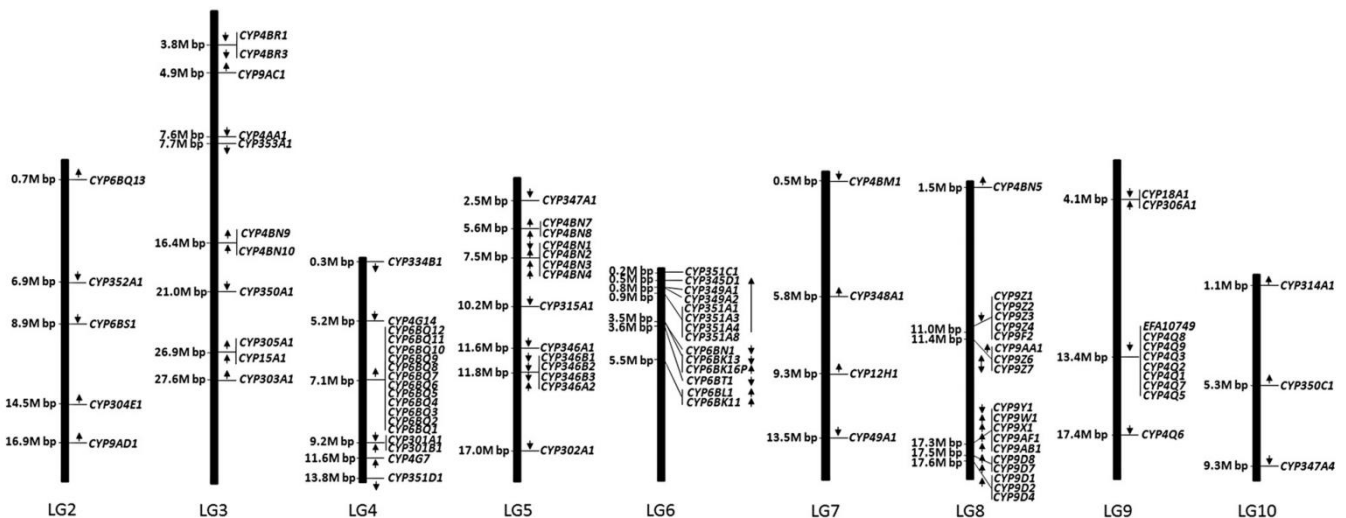


Figure 14 : Carte génétique des CYP du vers de la farine (*Tribolium castaneum*). L'emplacement physique de chaque gène ou groupe de gènes MFO sur la carte chromosomique est marqué à droite de la colonne qui représente le chromosome. Les flèches indiquent l'orientation des gènes : la flèche vers le haut est le brin inverse et la flèche vers le bas est le brin avant. Issu de (Zhu, Moural et al. 2013)

Cette organisation sous forme de cluster est d'autant plus marquée chez les espèces parthénogénétiques car elles rencontrent beaucoup moins d'épisodes de recombinaison (Hawkins, Bass et al. 2019).

Le deuxième grand intérêt des techniques NGS est de pouvoir caractériser toutes les bases génétiques d'une résistance et de mieux connaître son architecture dans le génome. Frédéric Faucon a soutenu un doctorat sur ce sujet en 2015 en prenant comme insecte modèle une espèce de moustique (*Aedes aegypti*). En combinant des techniques de DNaseq et RNAseq, il a identifié de façon robuste les gènes

responsables de résistance aux pyréthrinoïdes dans plusieurs souches résistantes. Il en ressort que les MFO et les EST sont les catégories fonctionnelles les plus surexprimées. Des gènes de GST ainsi que des enzymes impliquées dans le maintien de l'équilibre red/ox ressortent également dans ces analyses. L'amplification génique est effectivement un mécanisme qui a été fréquemment observé avec aussi des modifications entraînant une Trans ou Cis régulations de l'expression de gènes de résistance. Bien que les mêmes catégories de gènes ressortent chez des souches résistantes d'origines différentes, les gènes directement impliqués diffèrent entre eux (Faucon, Dusfour et al. 2015).

Ainsi les NGS nous aident à déterminer l'architecture des bases génétiques des résistances qui vont conditionner les stratégies de gestion des résistances (cf. paragraphe résistances croisées vs résistances multiples). Cependant l'autostop génétique limite la puissance de ces approches car les gènes avoisinant les loci sous sélections vont être entraînés par un balayage sélectif uniquement à cause de leur proximité physique sur la molécule d'ADN (Yan, Chadee et al. 1998). Dans les études par comparaison de génome il vaut mieux faire des étapes de croisements pour casser ces liaisons et rétrécir la fenêtre autour du réel gène de résistance. Lorsque plusieurs gènes sont impliqués cela peut provoquer des variations cryptiques qui interagissent avec le gène primaire de résistance et les approches de génomiques bien que très puissantes démêlent difficilement ces interactions.

Il devient alors difficile de déterminer qui est le gène à faible ou à fort effet. Certains auteurs ont donc choisi de combiner plusieurs approches pour pallier cela, par exemple l'équipe du docteur Bylesjö combine des approches de transcriptomique et de métabolomique à cette fin (Bylesjö, Eriksson et al. 2007). Les méthodes NGS utilisées pour rechercher les gènes à l'origine des résistances aux insecticides dans un génome fonctionnent sur un système corrélatif, c'est-à-dire qu'elles font la corrélation entre une fréquence d'un ou plusieurs évènements génétiques (SNP, CNV, niveau d'expression...) et des phénotypes plus ou moins résistants. Cela n'est pas suffisant pour pouvoir affirmer qu'un allèle est responsable d'une résistance, de la même manière que la quantification de l'effet de cet allèle ne peut être réellement connue que si une étape de validation fonctionnelle est opérée. Pour cela les méthodes basées sur l'ARN interférant et d'édition de génome (CRISPR-cas9) sont actuellement les plus performantes (Douris, Denecke et al. 2020). L'équipe de Victoria A Ingham, utilise des statistiques bayésiennes pour essayer de mettre en évidence les réseaux d'interaction entre facteurs de transcription suite à une exposition à des doses sublétales de pyréthrinoïdes d'une population d'*Anopheles coluzzii*. Leur résultat dresse une image très complexe impliquant de multiples voies de régulation de la transcription (Ingham, Elg et al. 2020).

Outils et méthodes de détection des résistances

Il existe trois grands types de tests de détection des résistances :

- les biotests effectués sur insectes vivants
- les tests biochimiques effectués sur des extraits protéiques
- les tests moléculaires sur des insectes morts

Les avantages et les inconvénients de ces différentes méthodes sont discutés en détail dans la revue de R₄P (R₄P, Barrès et al. 2016). Pour résumer, les biotests permettent de détecter toutes les résistances en pratique, ils sont donc les plus puissants des tests mais présentent des désavantages importants. Ils nécessitent d'avoir des insectes vivants, en grande quantité (l'élevage d'insecte est souvent indispensable), et le plus homogène possible : même stade physiologique, même sexe, ayant eu la même alimentation... De plus, ces tests sont souvent longs (le temps d'obtenir suffisamment d'insectes au bon stade) et ils ne permettent pas de connaître le niveau de résistance d'un individu, car les taux de

mortalité ne peuvent être mesurés que sur une population. Ce problème n'a pas lieu d'être pour les espèces d'insectes parthénogénétiques comme les pucerons. Les tests biochimiques sont surtout utiles pour déterminer les mécanismes de résistance et sont relativement peu utilisés en routine pour de la détection haut débit car ils nécessitent de travailler sur des extraits protéiques frais (mêmes contraintes que pour les biotests), même si le nombre d'individus nécessaires est moins important que pour les biotests. Enfin les tests moléculaires sont variés, permettent de faire de la détection haut débit à partir d'un seul individu mort mais ils nécessitent d'avoir déjà une bonne connaissance préalable des mécanismes de résistance et ne détectent pas les nouvelles résistances. Ils doivent donc être mis à jour régulièrement.

d) Epigénétique, plasticité phénotypique et résistance aux insecticides

Epigénétique : rôle de l'environnement dans l'expression des gènes de résistance

L'épigénétique

Chaque individu ne se définit pas uniquement par son génome. L'expérience, et les stress qu'il va rencontrer au cours de son existence vont façonner ses capacités à réagir face à un nouveau stress comme on peut l'observer pour les organismes envahissants (Van Petegem, Pétilion et al. 2015; Renault, Laparie et al. 2018) ou sur des organismes exposés à des pesticides (Vandegehuchte and Janssen 2014). C'est pourquoi dans une population clonale de pucerons on observe une diversité de phénotypes entre individus pourtant génétiquement identiques, cela pose d'ailleurs des difficultés aux chercheurs pour l'analyse des données de biotests. En effet, la variabilité de réponse face à un stress insecticide est importante entre individus. Quelle est la part de l'inné et de l'acquis dans le phénomène de résistances aux insecticides ? Et à quel point l'acquis peut être héritable ? Conrad Hal Waddington (1905-1975) est le premier à avoir théorisé ce phénomène à travers ses observations en embryologie. Aujourd'hui, cette question interroge de plus en plus de scientifiques ainsi la mécanique des phénomènes épigénétiques fait l'objet de nombreuses publications depuis une vingtaine d'années (Waddington 1957). L'épigénétique est une discipline qui examine des mécanismes réversibles et transmissibles sur quelques générations seulement de modifications d'expressions des gènes en fonction de l'histoire de vie d'un individu, sans modification de la séquence nucléotidique de son génome (Weinhold 2006). Ces modifications d'expression perdurent et sont transmissibles à court terme en l'absence du signal ou de l'évènement responsable du changement. Ces changements sont plus sensibles à l'environnement et ont une stabilité inférieure à celle des modifications de la séquence de l'ADN (Attig, Gabory et al. 2010). Par exemple, chez les abeilles c'est la nourriture des larves qui va contrôler le devenir d'un individu à l'âge adulte : s'il mange de la gelée royale il deviendra reine sinon ouvrière. Les mécanismes à l'œuvre derrière cette différenciation sont de type épigénétique (Kucharski, Maleszka et al. 2008). Edith Heard propose une métaphore ingénieuse : « Le génome est un livre renfermant le mode d'emploi complet pour la construction, la survie et la reproduction d'un organisme et l'épigénome englobe les marque-pages et surlignages du texte que le lecteur opère au cours de sa vie en fonction de son vécu. Une photocopie de ce livre étant transmise à la génération suivante les surlignages sont moins lisibles. Ici le lecteur est à la fois acteur de l'annotation de son livre et de la mise en œuvre de ce qui est écrit. Il est constitué de l'ensemble des protéines et ARN capables de percevoir des signaux environnementaux et d'agir sur l'expression et/ou l'annotation des gènes » (Heard 2013).

Trois mécanismes épigénétiques ont été décrits mais les dernières avancées scientifiques ont montré

qu'ils s'imbriquent entre eux et font partie d'un seul et même processus.

Les modifications d'histones. Les histones sont les protéines globalement positivement chargées sur lesquelles les très longues molécules d'ADN, négativement chargées, s'enroulent pour tenir dans l'espace très restreint d'un noyau cellulaire. Les séquences d'acides aminés des histones sont très conservées mais il existe au moins 11 types de modifications post-traductionnelles au niveau de leur queue Nter. Ces queues interagissent avec les histones voisines, participant ainsi à l'organisation supramoléculaire de la chromatine (Strahl and Allis 2000). Un « code histone » regroupant toutes ces modifications serait en lien avec l'état transcriptionnel de la chromatine. Les modifications post-traductionnelles des histones sont responsables de la décompaction de la chromatine permettant l'expression des gènes s'y trouvant via par exemple l'acétylation de lysines, la phosphorylation de sérines et thréonines, ou, à l'inverse, de la consolidation de la chromatine compactée via des méthylations de certains résidus lysines de leur queue (Guillemette and Gaudreau 2006; Bertin and Mangenot 2008). Une mono-ubiquitinylation (fixation covalente d'une protéine d'ubiquitine) d'un résidu lysine au sein des queues Nter d'histones perturbe aussi la structure de la chromatine vers une activation ou une répression en fonction du type d'histone concernée (Hosseini and Minucci 2018). Les systèmes de compaction et décompaction de l'ADN sont des mécanismes dynamiques et toutes ces modifications des histones sont plus ou moins réversibles, de plus il existe des régulations croisées entre les différentes modifications des histones (Lee, Smith et al. 2010).

Les méthylations de l'ADN. Cela consiste en une méthylation de cytosines formant des 5-méthylcytosines au niveau de dimères CG dans les régions régulatrices de gènes. Or une forte méthylation dans le promoteur est souvent synonyme d'une inhibition d'expression de gène. Les enzymes qui catalysent cette réaction, les ADN méthyltransférases (DNMTs), utilisent le substrat S-adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur du groupement méthyle (Gibney and Nolan 2010). La réaction inverse de déméthylation de l'ADN est plus complexe. Elle peut se faire de manière passive en absence de DNMT lors de la réplication, ou de manière active par modification du groupe méthyle (Bhutani, Burns et al. 2011). Dans ce cas, cela endommage la cytosine et favorise les mutations à ce locus (Zhou, He et al. 2020). Des recherches récentes montrent que des méthylations d'adénine d'ARN messagers sont également possibles et qu'elles affectent la traduction (Kietrys and Kool 2016).

Les ARN non-codants. Seulement 1,2% du génome humain code pour des protéines et 98% des transcrits produits sont des ARNs non-codants. Ils ont été classifiés selon leur taille et leur rôle dans la machinerie cellulaire. Parmi les petits ARN, les miRNA (microRNA) et les siRNA (short interfering RNA) sont les plus communs. Les deux utilisent le même type de machinerie cellulaire (DICER, Hélicase, RISC...) mais les premiers sont produits par la cellule alors que les seconds sont d'origine exogène, ils peuvent par exemple provenir de virus (les transposons sont ici considérés comme exogènes). Les miRNA sont régulés pendant le développement pour participer à la régulation de l'expression des gènes. Les siRNA eux jouent un rôle de protection du génome contre l'invasion par des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les virus (Jensen, Gassama et al. 1999; Malinsky, Bucheton et al. 2000). Les deux sont impliqués dans des mécanismes de régulation d'expression des gènes post-transcriptionnelle de type silencing. Et ils semblent aussi jouer un rôle important dans les différents mécanismes épigénétiques (Greiner 2012). Des études récentes suggèrent que des petits ARN non codants pourraient servir de, matrice de reconnaissance d'une séquence nucléotidique comme celle d'un promoteur, à des enzymes de remodelage de la chromatine, donc de modification d'histones (Malumbres 2013). Ils pourraient aussi induire ou réprimer l'expression de gènes spécifiques en dirigeant une méthylation de l'ADN dans leur promoteur (Place, Li et al. 2008; Huang, Place et al. 2012; Zhang, Zhang et al. 2012). Enfin une découverte très récente a montré le rôle primordial des ARNt dans

la transmission des schémas de méthylation de l'ADN entre générations notamment après une exposition au DDT un insecticide OC (Skinner, Maamar et al. 2018).

Interconnexion entre ces trois mécanismes. Plusieurs études ont décrit une protéine 'UHRF1' capable de se lier à la queue Nter d'histones et d'en reconnaître les modifications tout en se fixant à de l'ADN méthylé (Bronner, Fuhrmann et al. 2009; Hashimoto, Horton et al. 2009; Hashimoto, Vertino et al. 2010). En outre, les enzymes polycomb impliquées dans les modifications des histones utilisent des ARN non-codant comme matrice de reconnaissance de l'ADN (Zardo, Ciolfi et al. 2012).

Epigénétique et résistance aux insecticides

Le lien entre environnement, ici les pesticides, et génome assuré par l'épigénome, peut passer par trois mécanismes :

- Une activation/inhibition directe d'enzymes ou co-facteurs impliqués dans la machinerie épigénétique, par un xénobiotique. Par exemple, des organosulfurés contenus dans l'ail inhibent des histones-deacetylases (Delage and Dashwood 2008)
- Une intervention de récepteurs nucléaires qui une fois liés aux pesticides recrutent des enzymes de la machinerie épigénétique (Sugii and Evans 2011)
- Une intervention de récepteurs membranaires entraînant une cascade de signalisations intracellulaires classiques finissant par jouer sur des mécanismes d'épigénétiques décrits dans le paragraphe précédent (Oppold, Kreß et al. 2015).

Des modifications épigénétiques intergénérationnelles induites par des pesticides ont été décrites par méthylation de l'ADN (Vandegheuchte, Lemièrre et al. 2010), modification d'histone (Niu, DesMarais et al. 2015) et transmission d'ARN non-codant (Liebers, Rassoulzadegan et al. 2014). Chez les insectes, les effets de la méthylation de l'ADN a des conséquences qui varient en fonction de leur localisation au sein des gènes. Dans un promoteur de gène ou sur un transposon elles vont avoir un effet inhibiteur, mais quand les méthylations sont positionnées sur la partie codante du gène elles vont être activatrices (Brevik, Lindström et al. 2018). Chez le moustique *Aedes albopictus* une exposition à un fongicide ou une phytohormone affecte l'état épigénétique sur plusieurs générations et abaisse la sensibilité des descendants à l'imidaclopride associé à des changements de méthylation de l'ADN (Waldvogel, Kreß et al. 2015). Les modifications épigénétiques peuvent aussi se combiner à un mécanisme de résistance génétique pour notamment réduire son coût. Par exemple, chez des individus résistants de *Myzus persicae* ayant amplifiés des gènes d'estérases, en absence de pression de sélection, une méthylation dans les promoteurs des « extra » copies éteint ces gènes et réduit du même coup leurs effets pleiotropes (Hunt, Glastad et al. 2013). Enfin, les baculovirus, largement utilisés comme insecticides (cf. chapitre sur le virus de la granulose) font face à des réactions de défense des insectes utilisant les voies du silencing. Ainsi chez *Helicoverpa armigera* une résistance à un nucléopolyédrovirus (HaSNPV) a été attribuée à des mécanismes de RNAi induits par des siRNA viraux (Jayachandran, Hussain et al. 2012).

L'implication des phénomènes épigénétiques dans les résistances aux insecticides pourrait résoudre les deux paradoxes évolutifs discutés dans le paragraphe sur l'origine des résistances et les théories évolutives associées. Je les résume ici : les apparitions des résistances se font à des échelles de temps beaucoup plus courtes que celles admises pour une évolution classique, ensuite il existe une très forte convergence des mutations entre espèces enfin les espèces envahissantes appauvries génétiquement par des goulots d'étranglement qui développent beaucoup de résistances. Ainsi la piste selon laquelle les insecticides pourraient eux-mêmes être responsables d'une augmentation des chances de mutations

à un locus particulier par la voie de l'épigénétique me semble intéressante à explorer (West-Eberhard 2005).

Plasticité phénotypique

La capacité d'un génotype donné à prendre plusieurs valeurs phénotypiques pour un trait donné en fonction des conditions environnementales est appelée plasticité phénotypique (Bradshaw 1965; Bradshaw 2006). Un phénotype peut varier selon, son génotype, l'environnement et bien sûr selon l'interaction entre ces deux facteurs. La plasticité phénotypique est un processus adaptatif conduisant à un phénotype qui n'est *a priori* pas transmis à la descendance (Bradshaw 2006; Grishkevich and Yanai 2013). Il peut être dirigé c'est-à-dire qu'une modification de l'environnement va conduire à un changement binaire de phénotype de façon drastique, ou bien stochastique conduisant à un panel de phénotypes. La plasticité phénotypique est très développée chez les plantes et en particulier les plantes pérennes devant s'adapter à un environnement changeant sur de longues périodes sans avoir la possibilité de se déplacer (Schlichting 1986), elle existe néanmoins chez les autres êtres vivants (West-Eberhard 1989).

Chez les insectes, les pucerons offrent une bonne illustration de polyphénisme (Simpson, Sword et al. 2011). A partir d'un même génotype, un puceron peut prendre une forme aptère ou ailée en fonction de son environnement (Braendle, Davis et al. 2006). La densité des colonies, la température et la photopériode sont les principaux facteurs environnementaux identifiés comme étant à l'œuvre dans l'expression de ce polyphénisme. D'un point de vue physiologique, chez le puceron du pois cela s'exprime sous la forme d'une sous-exposition d'un embryon à l'ecdysone (hormone de mue) dans le corps de sa mère. Ce facteur exogène inhiberait la voie de l'insuline, qui moins active serait à l'origine de la formation d'un phénotype aptère (Grantham, Shingleton et al. 2020). Ces dimorphismes sont donc le jeu de modulations au niveau du système endocrinien de l'insecte. Or, l'utilisation d'insecticides perturbant ces voies hormonales (voir paragraphe sur les régulateurs de croissance) conduit à des modifications dans le ratio d'individus ailés/aptères chez différentes espèces de pucerons (Kambhampati, Mackauer et al. 1983; Hardie 1986; Gao and Hardie 1996), montrant que les insecticides peuvent jouer sur les mécanismes de plasticité phénotypique chez les insectes. Chez le criquet migrateur (*Locusta Migratoria*) aussi ce polyphénisme entre forme solitaire et forme grégaire est régulé par un système hormonal, celui de la corazine. Sa voie est activée via les contacts physiques entre individus et la perception visuelle des congénères (Simpson, Despland et al. 2001). Mais la plasticité phénotypique n'est pas uniquement synonyme de dimorphisme tranché, cela peut simplement se traduire par une variation de taille en fonction de la disponibilité de nourriture. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) la carence alimentaire conduit à la formation d'adultes aux ailes de petite taille alors que la taille de leurs pièces génitales est normale. L'équipe de recherche du docteur Gibert a montré là encore que ce mécanisme était contrôlé par la voie de l'insuline (Gibert 2020). Chez cette même espèce, des variations de coloration abdominale sont observées en fonction de la température. Cette fois le mécanisme n'implique pas des hormones mais un jeu complexe de facteurs de transcriptions et d'*enhancer* modulant l'expression de gènes de mélanisation (Gibert 2020).

Les facteurs de transcription sont des acteurs centraux de la plasticité phénotypique car ils régulent directement l'expression des gènes notamment ceux impliqués dans la résistance aux insecticides (cf. paragraphe sur la régulation de l'expression des gènes de détoxication). Ils sont classés en deux catégories, ceux qui sont impliqués dans la composition de la machinerie transcriptionnelle basale organisée autour d'ARN polymérase qui ne nous intéressent pas ici et ceux qui sont activés par liaison avec une molécule exogène ou endogène activant ou réprimant l'expression de gènes spécifiques

(Le_Goff 2014). Pour cela ils se fixent sur les séquences régulatrices en amont des gènes à transcrire puis recrutent des co-régulateurs transcriptionnels qui agissent sur la condensation de la chromatine via l'acétylation ou désacétylation des histones. Les facteurs de transcriptions sont susceptibles d'activer leur propre expression engendrant ainsi une boucle d'autorégulation positive (ou boucle de rétroaction) à l'origine d'une persistance temporelle d'activation de certains gènes (Crews and Pearson 2009). La persistance temporelle de ces régulateurs est très complexe et encore mal connue et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches (Le_Goff 2014).

Les mécanismes épigénétiques font aussi partie de ceux qui expliquent des phénomènes de plasticité phénotypique (Simpson, Sword et al. 2011).

De la plasticité phénotypique, aux résistances aux insecticides

Pour détecter une nouvelle résistance en pratique d'une population d'insectes à un insecticide, le moyen le plus sûr est d'utiliser des techniques de biotests (cf. paragraphe sur les méthodes de détection). C'est-à-dire d'observer la réponse (souvent la mortalité) de plusieurs individus à une gamme croissante de doses d'insecticide. Ce test donne une image relativement réaliste de ce qu'il se passe au champ. Le résultat de ces tests va donc nous donner une indication sur les différents phénotypes d'une population qui ne sont autre que la somme indissociable de leurs réponses adaptatives : Plasticité phénotypique + sélection génétique = résistance (Figure 15). En effet, les individus testés ont hérité de leurs ancêtres un génome façonné par une longue histoire évolutive à laquelle va s'ajouter leur capacité individuelle à répondre à un stress environnemental. **La résistance est un phénotype, car c'est le phénotype qui est sélectionné en premier par la pression de sélection.** Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai par abus de langage le terme résistance en lieu et place de « plasticité phénotypique + sélection génétique » pour faciliter la lecture.

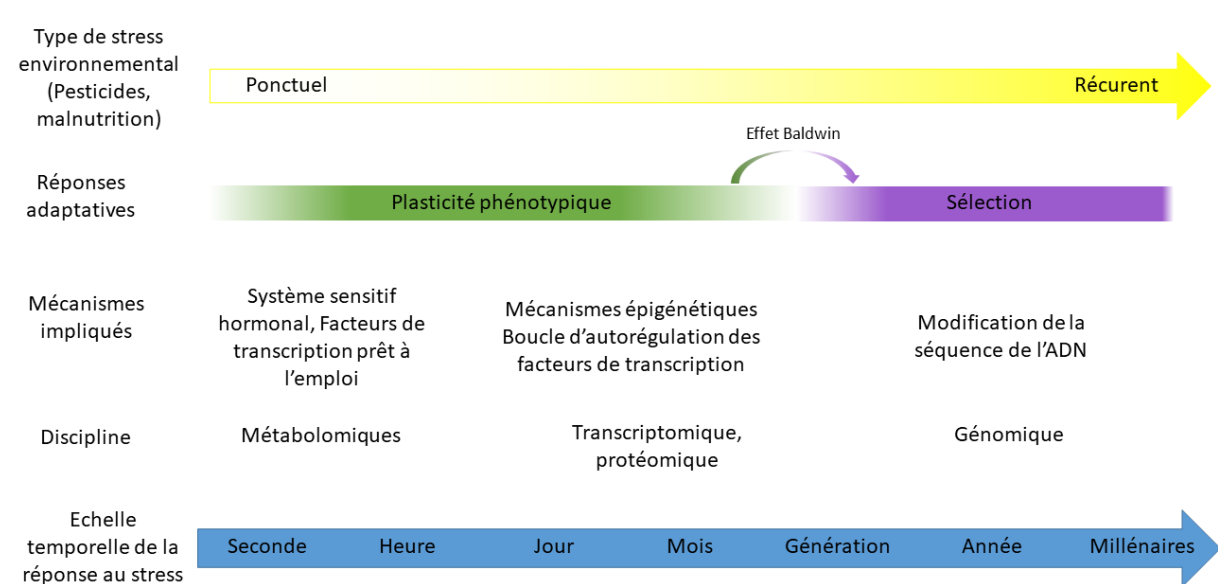


Figure 15 : Proposition de schéma conceptuel adapté d'un cours d'Edith Heard montrant des différentes réponses adaptatives à un stress, par exemple le contact avec un insecticide (Heard 2013).

Les deux phénomènes adaptatifs placés sur la Figure 15 sont donc très difficilement dissociables entre

eux d'autant que des découvertes récentes montrent qu'il existe des ponts les reliant. Ce passage d'épigénétique vers génétique se rapproche du corollaire à la théorie de l'évolution appelé effet Baldwin. En 1896 James Mark Baldwin émet une théorie, se rapprochant de celle de Lamarck, selon laquelle le comportement durable d'un individu influence sa capacité à évoluer. Ainsi un caractère phénotypique pourrait être incorporé/fixé dans le génome par l'effet Baldwin. Dans la même veine, Waddington en 1942 dit que cette plasticité phénotypique favorise les mutations dans une zone donnée du génome et que cela est à l'origine des phénomènes de convergence de traits entre espèces (Waddington 1942). Mary Jane West-Eberhard est la première scientifique moderne à rapprocher plasticité phénotypique et sélection naturelle, elle fait de ces deux phénomènes un seul et même processus complexe (West-Eberhard 2005). Un changement de sémantique est alors proposé par Antonine Nicogiou (Nicoglou 2011) qui définit « *la plasticité est un trait comme un autre qui peut être sélectionné (la plasticité phénotypique adaptative ou non adaptative) qui est partiellement indépendante du contrôle génétique (la plasticité non adaptative). Cette indépendance peut donner l'illusion qu'elle est un épiphénomène de la sélection naturelle même si en réalité elle ne fait que précéder la sélection naturelle. Dans la pratique il continue de rester difficile de distinguer le trait phénotypique de sa plasticité.* ».

Carl Schlichting (Schlichting 2004) avance trois raisons pour que la plasticité phénotypique favorise les modifications génétiques dans une population :

- Elle laisse plus de temps, en permettant la survie en milieux perturbés, pour que des mutations ou changements génétiques apparaissent
- Elle permet l'occupation de nouvelles niches écologiques
- Elle maintient la diversité génétique en réduisant l'impact de la sélection naturelle

Il y a 2 ans une étude sur la coloration d'une espèce de lézards montre que l'expression de leur phénotype s'exprime en fonction du milieu dans lequel elle évolue. Sur sol volcanique (noir) les individus vont être plus foncés que ceux qui évoluent sur du sable blanc. Ces scientifiques ont montré que certaines populations inféodées au sol volcanique avaient « fixé » le phénotype foncé et qu'ils n'étaient plus en mesure de revêtir le clair (Corl, Bi et al. 2018).

D'un point de vue mécanistique il a été montré que la méthylation de l'ADN conduisait à une augmentation de la chance d'apparition de mutation au même locus (Zhou, He et al. 2020). En effet la déméthylation est un processus qui endommage la cytosine au passage (cf. paragraphe sur l'épigénétique). De plus l'exposition d'organismes à des pesticides modifie leur épigénome. Par exemple, chez le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) une exposition à des doses sublétales d'imidaclopride conduit à des modifications des schémas de méthylation de l'ADN. Ces modifications sont spécialement localisées dans les gènes associés à des résistances comme ceux de MFO ou dans des éléments transposables. Ces modifications ont été transmises sur 2 générations (Brevik, Bueno et al. 2021). L'importance de ces méthylations dans l'expression des gènes de résistance en comparaison des mutations déjà fixées dans le génome reste un champ à explorer.

e) Autres déterminisme et origine des résistances

Les microbiotes ou certains facteurs extrachromosomaux peuvent aussi être à l'origine de résistance. Par exemple, *Riptortus pedestris* (Hemiptera) possède des bactéries symbiotiques du genre *Burkholderia* capables de dégrader un organophosphoré. L'acquisition de telles bactéries préadaptées

dans des sols pollués d'insecticides confère des résistances aux insectes inféodés à ce territoire (Kikuchi, Hayatsu et al. 2012). Cet exemple n'est pas un cas isolé et l'importance des symbiotes dans l'acquisition de résistance via des mécanismes de détoxification a fait l'objet d'une revue qui montre la diversité, l'importance et les stratégies qui peuvent être mises en place face à ce phénomène émergent (Blanton and Peterson 2020).

D. Insecticides

a) Grandes familles insecticides et modes d'actions associées

Généralités

Les spécialités commerciales insecticides (préparation, mélange, formulation) se composent de la substance active à laquelle ont été ajoutées diverses substances destinées à la diluer, ou à favoriser l'adhérence aux plantes, la colorer... La substance active, d'une grande pureté est constituée d'une molécule à fort pouvoir insecticide à l'origine de l'action biologique.

En général on classe les insecticides en trois catégories : Les insecticides de contact qui agissent lorsqu'ils sont déposés sur la cuticule de l'insecte, les insecticides translaminaires qui ont une mobilité réduite dans la culture et qui peuvent agir par ingestion et/ou par contact et des insecticides systémiques qui sont transportés par les vaisseaux du xylème et du phloème dans toute la plante. Ils peuvent donc être utilisés aussi bien en traitement de semence que pulvérisation foliaire.

Les autres propriétés importantes à appréhender dans un insecticide sont :

- sa rémanence, c'est-à-dire sa durée d'action sur l'insecte cible. Elle est bien sûr très corrélée à sa persistance dans l'environnement.
- Son niveau d'efficacité sur la cible
- Son spectre d'action qui déterminera sa spécificité

Le réseau R₄P a proposé une nouvelle classification universelle des pesticides. Elle présente l'intérêt de grouper les trois familles de pesticides : herbicide, insecticide et fongicide dans une seule et même classification. Elle se base sur plusieurs critères le premier étant le mode d'action biochimique, suivi des classes chimiques (Figure 16). La première version de cette classification est disponible sur le site internet du réseau à l'adresse suivante : <https://www.r4p-inra.fr/fr/classification-des-ppp/>. La version mise à jour (non encore en ligne) compte 605 substances actives insecticides-acaricides dont 380 étant des toxiques du système nerveux ou musculaire.

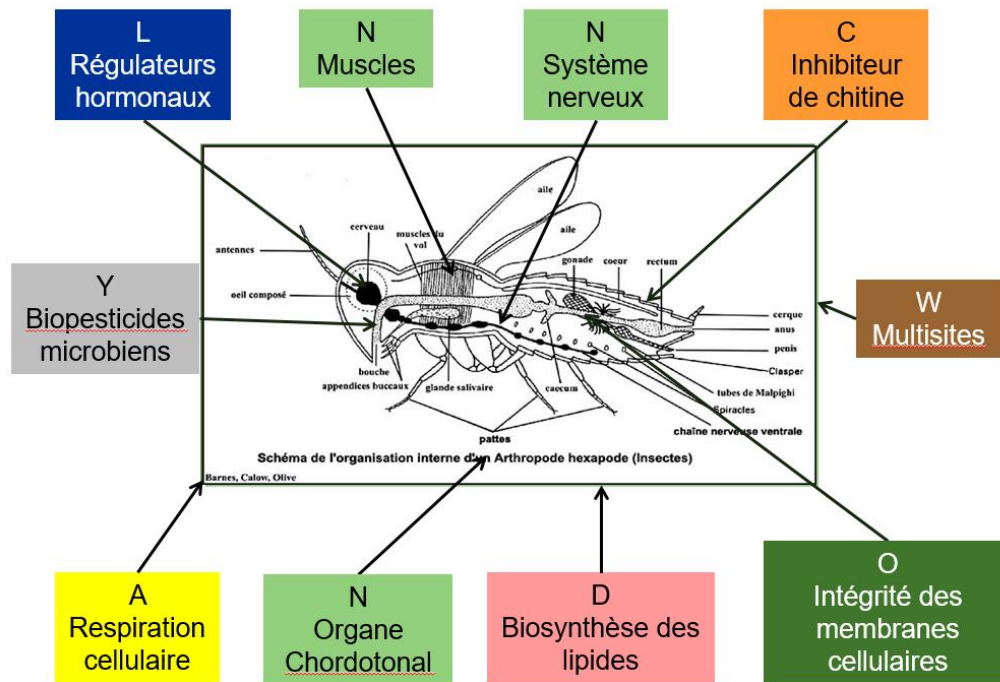


Figure 16 : Classes d'insecticides choisies par R4P dans leur classification universelle des pesticides se basant sur le mode d'action biochimique des substances actives sur l'insecte cible. Chaque lettre et sa couleur correspondante représentent une classe.

Les toxiques neuronaux et musculaires

Afin d'alléger le texte, voici mes sources d'information récurrentes pour les paragraphes qui suivent. Toutes les données de toxicité, d'écotoxicité et de mode d'action sont référencées individuellement pour chaque substance active sur la très complète base de données PPDB disponible à l'adresse suivante : <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>. Des données complémentaires sur la classification, les modes d'action, les familles chimiques et les résistances sont disponibles sur le site R4P : <https://www.r4p-inra.fr/fr/classification-des-ppp/>. Les informations qui touchent à la mise sur le marché français des pesticides sont disponibles sur le site officiel de l'Anses : <https://ephy.anses.fr/>. Les informations sur les données d'utilisation en France sont acquises indirectement via les données de vente disponibles sur le site gouvernemental suivant : <https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/ventes-de-pesticides-par-departement/>. Enfin, le livre intitulé, " Insecticides: action and metabolism" écrit par O'Brien en 2014 est porteur de la plupart des autres informations détaillées ci-après (O'Brien 2014). Des références additionnelles sont ajoutées dans le texte lorsque les informations proviennent d'une autre source.

Les organochlorés (OCs)

Ces insecticides ont deux modes d'action différents en fonction des sous-familles. Les aryltrichloroéthanés agissent sur la fermeture du canal sodium tandis que les chlorocyclodiènes et les chlorocyclohexanes agissent sur le fonctionnement d'un canal chlore GABA dépendant. Ce blocage entraîne un dysfonctionnement du système nerveux de l'insecte.

Tous ces produits ont été interdits à la commercialisation, cependant, j'ai choisi de les présenter ici malgré leur désuétude car ce sont les premiers à avoir sélectionné des résistances chez les insectes ravageurs et comme la cible moléculaire de la sous-famille des aryltrichloroéthanés est la même que

celle des pyréthriinoïdes (encore très largement utilisés) cela entraîne des résistances croisées par mutations de cible moléculaire (*kdr*)(Prasittisuk and Busvine 1977; Brengues, Hawkes et al. 2003).

Ce sont pour la plupart des POPs (Polluants Organiques Persistants)(BEAUBRUN EN FAMILLE DIANT 2014). Sur le plan du devenir et du comportement dans l'environnement, ils sont généralement très stables dans les milieux (sols), très peu solubles, donc peu présents dans les eaux, mais présents dans les sédiments. Au-delà de ces généralités, il existe des différences importantes entre membres de cette famille, à la fois dans la toxicité, l'écotoxicité, le devenir et le comportement dans l'environnement.

Les organophosphorés (OPs)

Ce groupe chimique a été développé à partir de 1944 et englobe des insecticides et/ou acaricides (Ganendran 1974). Ces substances inhibent l'acétylcholinestérase, une enzyme impliquée dans la dégradation d'un neurotransmetteur au niveau de certaines synapses nerveuses. Cette inhibition bloque la transmission des signaux nerveux. Bien que cette enzyme soit très conservée dans le règne animal, les niveaux de toxicité des OPs sont variables d'une espèce à une autre, notamment grâce à la capacité de certains organismes à détruire la substance avant qu'elle n'atteigne sa cible (Thapa, Lv et al. 2017).

L'âge d'or des OPs a suivi celui des OCs, mais actuellement la plupart ont été retirées du marché suite à la directive n°91/414/CEE à cause de leur trop grande toxicité pour les vertébrés. Il ne subsiste aujourd'hui pratiquement qu'une substance active encore autorisée car elle se dégrade très vite, le Phosmet, mais elle n'est que très peu utilisée pour la même raison (Anses-Ephy 2021).

Les carbamates

Les carbamates ont la même cible moléculaire que les organophosphorés : l'acétylcholinestérase. Leur niveau de toxicité aiguë pour les arthropodes est variable. Le premier carbamate à avoir été utilisé est le carbaryl. Par rapport aux organophosphorés, les risques d'effets à long terme sont potentiellement moins importants en raison d'une meilleure possibilité de récupération, les acétylcholinestérases carbamylées étant légèrement moins stables que les acétylcholinestérases phosphorylées. Cependant, cette récupération est très variable d'une espèce à une autre (Reiner 1971). Comme les OPs il ne reste que quelques substances encore autorisées en France mais elles continuent à être largement utilisées dans le monde. La plupart des substances de cette famille sont systémiques et ont des profils écotoxicologiques assez contrastés.

Les pyrèthres et pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des substances dérivées des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs de pyrèthre. Leur cible moléculaire est le canal sodium. Les pyréthriinoïdes agissent également sur le système nerveux en bloquant un canal sodium voltage dépendant de la membrane cytoplasmique des axones en position ouverte. Ils présentent en général une toxicité sur les mammifères moindre que celle des trois précédentes familles d'insecticides, une plus faible persistance et s'emploient à de plus faibles doses. Ce sont des insecticides de contact peu spécifiques au sein des arthropodes (Maund, Campbell et al. 2011).

Avermectines

Le premier représentant de cette famille est l'abamectine, une substance naturelle (lactone macrocyclique) obtenue par fermentation bactérienne d'un micro-organisme du sol, *Streptomyces*

avermectin (Lasota and Dybas 1990). Cette substance active est très utilisée dans certains pays en agriculture biologique mais peu en France à cause de son profil toxicologique (0,0013% des ventes en 2019). L'émamectine fait partie des dérivés hemisynthétiques moins toxiques qui en ont découlé. Elle est largement utilisée en agriculture. Ces substances se fixent sur un récepteur au niveau de synapses GABAergiques, qui contrairement aux cholinergiques, sont inhibitrices (elles induisent des comportements de détente) et utilisent comme neurotransmetteur l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Ce sont des agonistes du GABA qui agissent en se fixant de manière définitive sur le site de fixation de ce neurotransmetteur. L'émamectine est 5 fois plus utilisée que l'abamectine de nos jours, elle est très spécifique aux lépidoptères (Acta-phytosanitaire 2019).

Néonicotinoïdes et spinosynes

Les néonicotinoïdes sont des dérivés de la nicotine, ces molécules sont systémiques donc très utilisées en traitement de semence. Récemment retirées du marché français pour leurs effets non intentionnels sur insectes pollinisateurs, elles restent très largement utilisées dans le monde notamment pour contrôler les populations de pucerons sur diverses cultures.

Les spinosynes ont une structure moléculaire très différente mais partagent la même cible moléculaire que les néonicotinoïdes, les récepteurs nicotiques à acétylcholine (nAChR) situé au niveau des synapses cholinergiques. Cette famille d'insecticides est issue d'extrait d'un micro-organisme *Saccharopolyspora spinosa*, un actinomycète (bactérie à Gram positif) découvert en 1982 (Thompson, Dutton et al. 2000). Des molécules à activité insecticide (spinosynes) sont extraites de la bactérie après fermentation (Sparks, Thompson et al. 1998). Aujourd'hui, ces molécules sont principalement commercialisées sous la forme de deux substances actives : le spinosad et le spinetoram. Le spinosad est un insecticide autorisé en agriculture biologique, composé d'un mélange de spinosynes A et D, les deux métabolites les plus actifs qui sont produits par la bactérie. Aujourd'hui, cet insecticide est utilisé dans 40 pays sur diverses cultures, telles que le coton, les crucifères, la pomme, la vigne et la pêche, pour lutter contre plus de 50 parasites (Thompson, Dutton et al. 2000).

Les spinosynes se fixent sur un site spécifique du nAChR, leur cible moléculaire, qui est différent de celui des néonicotinoïdes. Il existe des cas de résistances croisées à ces deux familles "insecticide" sans que cela soit systématique (Sparks, Dripps et al. 2012). Le spinosad n'est pas sélectif au sein des arthropodes.

Anthraniliques diamides

Cette famille chimique est relativement récente, si l'on tient compte de la vitesse d'apparition de nouvelles familles sur le marché, puisque son premier représentant, le chlorantraniliprole, a été découvert en 2001 et autorisé en France à partir de 2010 (Anses-Ephy 2021). Ce sont des toxiques musculaires agonistes de la ryanodine, un alcaloïde extrait d'une plante d'Amérique latine (*Ryania speciosa*), utilisée par les Indiens comme poison sur leurs flèches (Ujváry 2010). Le récepteur à ryanodine est situé sur la membrane sarcoplasmique à l'intérieur des cellules musculaires. Lorsqu'il s'ouvre cela libère du calcium dans le cytoplasme signal induisant la contraction musculaire (Isaacs, Qi et al. 2012).

Les régulateurs de croissance d'insectes

Ils agissent, soit sur la formation de la cuticule soit, sur le système hormonal de l'insecte. Les premiers font partie de la classe des benzoyl-urées mais plus aucune substance active insecticide de ce mode d'action n'est encore homologuée en France. Il subsiste encore deux acaricides l'étozazole et l'hexythiazox. Ils agissent sur l'enzyme chitine synthase.

Les seconds perturbent l'action des deux grandes hormones du système endocrinien des insectes ; l'ecdysone dont la variation de concentration dans l'hémolymphe rythme les épisodes de mues ; et l'hormone juvénile qui détermine la nature de la mue. Ces insecticides peuvent être classés en trois sous-groupes en fonction de leur mode d'action :

- Les mimétiques de l'hormone juvénile. Ils ont une action de stérilisation, affectent le développement embryonnaire, suppriment la mue nymphale (formation de super larves), suppriment le comportement maternel.
- Les analogues d'ecdysone ou ecdystéroïdes s'appellent les diacylhydrazines. Ce sont des accélérateurs de mue et des inhibiteurs de maturation sexuelle. Ils se lient au récepteur d'ecdysone et sont très actifs sur lépidoptères.
- Les inhibiteurs d'hormones juvéniles sont des dérivés du précocènes, un extrait de plantes (Ageratum). Ces molécules doivent préalablement être activées par oxydation dans les corps allates avant d'être actives. Azadirachtine, une substance active extraite du fruit de l'arbre de neem appartient à cette famille.

Spécifiques et nécessitant une activation moléculaire ils sont beaucoup utilisés dans le cadre d'agriculture intégrée car ils sont souvent inoffensifs sur la faune auxiliaire. Ils ont cependant des niveaux d'efficacité souvent en deçà des insecticides neurotoxiques qui couplés à l'apparition de résistance les a rendus moins populaires auprès des utilisateurs après quelques décennies d'utilisation.

Inhibiteurs de la voie de biosynthèse des lipides

C'est un mode d'action de nombreux herbicides qui a été nouvellement adapté pour être insecticide. En 2011, le premier produit mis sur le marché en France ayant ce mode d'action s'appelle le spirotetramate et a pour famille chimique les β -cétéoénoles cycliques. La cible moléculaire de ces substances semble être l'Acetyl-CoEnzyme A Carboxylase (ACCase) qui n'est autre que l'enzyme responsable de la polymérisation d'acétyl-CoA pour former de longues chaînes lipidiques (Bretschneider, Fischer et al. 2012). Ce mode d'action original, pour un insecticide, implique qu'il est peu soumis aux problèmes de résistances croisées développées par diverses espèces de pucerons vis-à-vis des pyréthrinoïdes, des carbamates et des néonicotinoïdes. Il montre également une persistance d'action longue (jusqu'à 6 semaines) même si sa vitesse d'action est plus lente. Les insecticides appartenant à cette famille sont systémiques : ils se déplacent dans les vaisseaux du xylème et du phloème et agissent par ingestion.

Inhibiteurs des organes chordotonaux

Cette famille chimique est très récente, elle agit au niveau d'organes sensoriels impliqués dans la proprioception chez l'insecte : les organes chordotonaux. Bien que leur cible moléculaire ne soit pas encore définitivement élucidée, les travaux de l'équipe du docteur Kandasamy (Kandasamy, London et

al. 2017) ont mis en évidence leur implication dans la modulation d'un canal nommé TRPV pour Transient Receptor Potential Vanilloïde. Lorsqu'ils sont ouverts, ces canaux laissent passer des ions calcium et en leur absence l'ion sodium. En absence d'insecticide, ils s'ouvrent sous divers stimuli chimiques ou physiques : ligands endogènes ou xénobiotiques ; étirement ; chaleur.

Très spécifiques des insectes piqueurs suceurs, ils jouent un rôle important dans la lutte contre les pucerons suite au retrait du marché des néonicotinoïdes en France. Le flonicamide est la substance active principale de ce mode d'action. Son action sur les organes chordotonaux induit l'arrêt de la prise de nourriture. Son efficacité au laboratoire est vingt fois inférieure à celle de la lambda-cyhalothrine, un pyréthriinoïde, à dose égale (Samara, Lowery et al. 2021). Cependant, les doses importantes utilisées au champ semblent donner des résultats d'efficacité satisfaisants sur le terrain sur un puceron du coton pourtant devenu résistant à des néonicotinoïdes (Gore, Cook et al. 2013).

Virus entomopathogènes

Plusieurs familles de virus ont été identifiées pour leur capacité à infecter les arthropodes ; cependant, les Baculovirus sont les seuls utilisés comme agents de contrôle biologique en pratique (Dent 1991; Suty 2010).

Les baculovirus forment une grande famille de virus qui peuvent infecter les larves de lépidoptères nuisibles aux cultures, ainsi que les hyménoptères, les diptères, les coléoptères et les trichoptères. Ces espèces sont relativement spécifiques en n'infectant à notre connaissance qu'une ou quelques espèces d'insectes étroitement apparentés. Il existe cependant une exception, sur laquelle de nombreuses études ont été menées, le nucléopolyédrovirus *Autographa californica*, AcMNPV, qui infecte plus de 33 espèces de 7 familles de Lépidoptères (Blissard and Rohrmann 1990; BISHOP, HIRST et al. 1995). Les baculovirus se répliquent dans le noyau des cellules hôtes. Leur génome est composé d'une molécule d'ADN circulaire double brin dont la taille varie de 80 à 200 kb. Le génome est emballé dans une nucléocapside présentant une symétrie hélicoïdale qui est enveloppée dans une membrane. Les baculovirus présentent un cycle de vie complexe dans lequel deux formes virales sont produites (voir (Rohrmann 2019) pour une revue).

Les baculovirus sont classés en quatre genres selon le Comité international sur la taxonomie des virus :

- Alphabaculovirus, nucléopolyédrovirus (NPV) infectant les lépidoptères
- Betabaculovirus, granulovirus (GV) infectant les lépidoptères
- Gammabaculovirus, NPV infectant les hyménoptères
- Deltabaculovirus NPV infectant les diptères

La principale voie d'infection des baculovirus est l'ingestion par les larves des particules virales, qui contaminent les aliments. La transmission verticale a été démontrée pour certains baculovirus, mais son importance dans le maintien des populations est encore à l'étude (Virto, Zarate et al. 2013). Plusieurs baculovirus, NPV et GV sont utilisés pour la lutte biologique dans le monde entier.

Des chercheurs en Chine ont isolé 82 espèces de virus de 47 parasites du thé (Ye, Xiao et al. 2014). Le virus NPV de l'arpeuse du thé et le virus NPV du thé en Chine sont appliqués à grande échelle. Le *Cydia pomonella* GranuloVirus (CpGV) est l'une des espèces les plus utilisées comme biopesticide en France et dans le monde pour lutter contre le carpocapse des pommes, le principal ravageur de cette culture (Berling 2009). Très spécifique, il est inoffensif pour la faune auxiliaire et l'environnement.

Dérivés d'acides caféiques

Ces dérivés n'entrent pas encore dans la composition de produits insecticides commercialisés car la recherche doit encore faire des avancées sur leur formulation avant qu'ils puissent être efficaces. Une équipe de recherche française a trouvé des effets aphicides aux acides dicaffeoylquinique et dicaffeoyltartrique (Poëssel, Sauge et al. 2011). Ces molécules sont présentes à des teneurs importantes dans des légumes consommés par l'homme, les patates douces (Harrison, Mitchell et al. 2008) et la salade chicorée par exemple (Scarpati and Oriente 1958). Elles sont également utilisées par l'industrie pharmaceutique et en médecine pour leurs propriétés antioxydantes et antifongiques (Ma, Abe et al. 2010). Très spécifiques aux pucerons ces molécules ne sont pas toxiques pour les abeilles ni les autres auxiliaires.

Biopesticides à action physique : Kaolin, maltodextrine, huiles minérales et végétales

La maltodextrine est une substance extraite de maïs (*Zea mays*). Son utilisation en tant que biopesticide est relativement récente (EFSA 2013) et très peu d'études scientifiques ont été publiées sur ce sujet. Une équipe de recherche a montré un effet toxique de la maltodextrine sur *Drosophila suzukii* avec une efficacité moyenne (Cahenzli, Strack et al. 2018). Son mode d'action est assez similaire à celui des huiles végétales et minérales : il agit par suffocation après le colmatage des spiracles et par engluement des appendices moteurs. La polymérisation des dérivés de glucose par séchage va former des couches imperméables. Ces produits ciblent surtout des pucerons, acariens, aleurodes sur toutes cultures légumières et ornementales sous serres. Le kaolin, ou silicate d'aluminium est plus connu sous le nom d'argile. Son action est elle aussi d'ordre physique. Il prévient l'oviposition et l'installation des femelles fondatrices chez les pucerons. Son action sur l'environnement est négligeable car il y est déjà présent en grande quantité (Karagounis, Kourdoumbalos et al. 2006).

b) Les insecticides passés, présents et futurs

Le phénomène d'apparition de résistance s'inscrit sur une échelle de temps de plusieurs dizaines d'années. Il est donc important d'appréhender l'historique de l'utilisation des insecticides de synthèse en France depuis leur invention et leur démocratisation dans les années 50.

Les organochlorés ont été largement utilisés après-guerre de façon systématique et massive, ce qui a entraîné l'apparition de nombreux cas de résistance chez des insectes ravageurs dans les années 60 (Georghiou 1983). C'est en 1968 que les effets sur l'environnement de cette classe d'insecticides ont été portés à la connaissance du grand public (Carson 1968). En plus de la perte d'efficacité de ces insecticides sur le terrain à cause des résistances, et de la découverte de leur impact sur l'environnement, l'apparition de la famille des organophosphorés sur les marchés à la fin des années 60 a conduit progressivement au remplacement des OCs par les OPs. C'est ainsi qu'en 1982 les organochlorés représentaient moins de 10% des substances insecticides vendues. (Casida and Quistad 1998).

Un changement du même genre s'est opéré à la fin des années 90 remplaçant les OPs à la toxicité sur mammifères trop élevée par les pyréthrinoïdes plus spécifiques. Ces derniers étaient déjà sur le marché depuis longtemps mais les retraits d'autorisation d'utilisation des OPs ont laissé une place dans le

marché qu'ils ont pu investir (Acta-phytosanitaire 2019). Une évolution vers des produits de plus en plus spécifiques et actifs à faible dose s'est poursuivie. Par exemple la substance active contemporaine qu'est le chlorantraniliprole est 10 000 fois plus sélective pour les insectes que pour les mammifères là où le DDT avait une toxicité équivalente (Sparks 2013) (Figure 17).

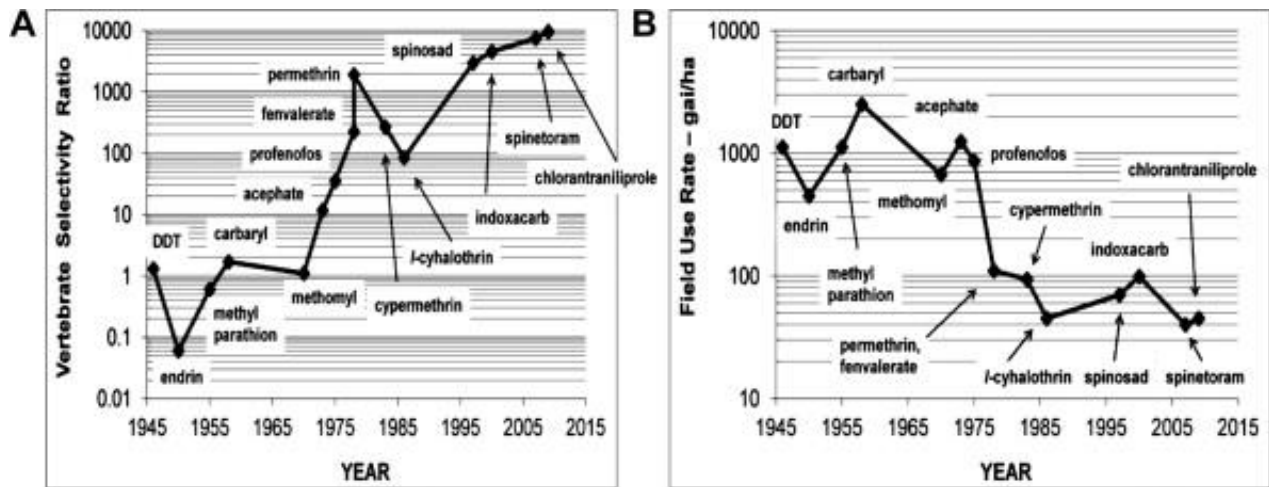


Figure 17 : Tirée de Spark, 2013 : A - Rapports de sélectivité pour les vertébrés des insecticides représentatifs des Lépidoptères. Les rapports présentés sont basés sur la DL50 topique ($\mu\text{g/g}$) pour *Heliothis virescens* (tordeuse des bourgeons du tabac ; données de mortalité sur 48-72 h) / DL50 orale aiguë (mg/kg) pour le rat. B - Diminution de la dose par hectare ces insecticides au fil des années-Données basées sur le taux d'utilisation typique pour *H. virescens* et/ou *Helicoverpa zea* sur le coton ou les légumes.

De nos jours ce sont toujours les insecticides neurotoxiques et les toxiques musculaires (Classe N) qui dominent très largement le marché. Ces dernières années les volumes d'insecticides vendus en France augmentent avec des ventes de plus en plus importantes de kaolin, classé dans les modes d'action incertains ou inconnus. En comparaison la classe N n'est qu'en légère augmentation (Figure 18). La pression de sélection sur les mêmes cibles moléculaires perdure donc depuis longtemps. Par exemple, la cible commune aux OCs et pyréthriinoïdes est sous sélection depuis plus de 80 ans. Le nombre de nouveaux produits recevant des autorisations de mise sur le marché en France est en régression car, à la lumière de nos connaissances actuelles, les autorités sanitaires sont plus attentives aux éventuels effets non intentionnels sur la santé humaine et sur l'environnement. Cela s'accompagne donc d'un coût et d'une durée d'évaluation des substances actives plus importants, dissuadant certaines entreprises phytosanitaires de se lancer dans un tel processus. Ce phénomène n'est pas mondial, et par exemple au Japon la recherche de nouvelles molécules pesticides spécifiques reste très active. Mais est-ce qu'un insecticide n'entraînant aucune perturbation et n'ayant aucun risque de résistance peut exister ? L'avenir résiderait donc plus probablement dans un changement de paradigme remplaçant l'agriculture intensive par une agriculture plus écologique.

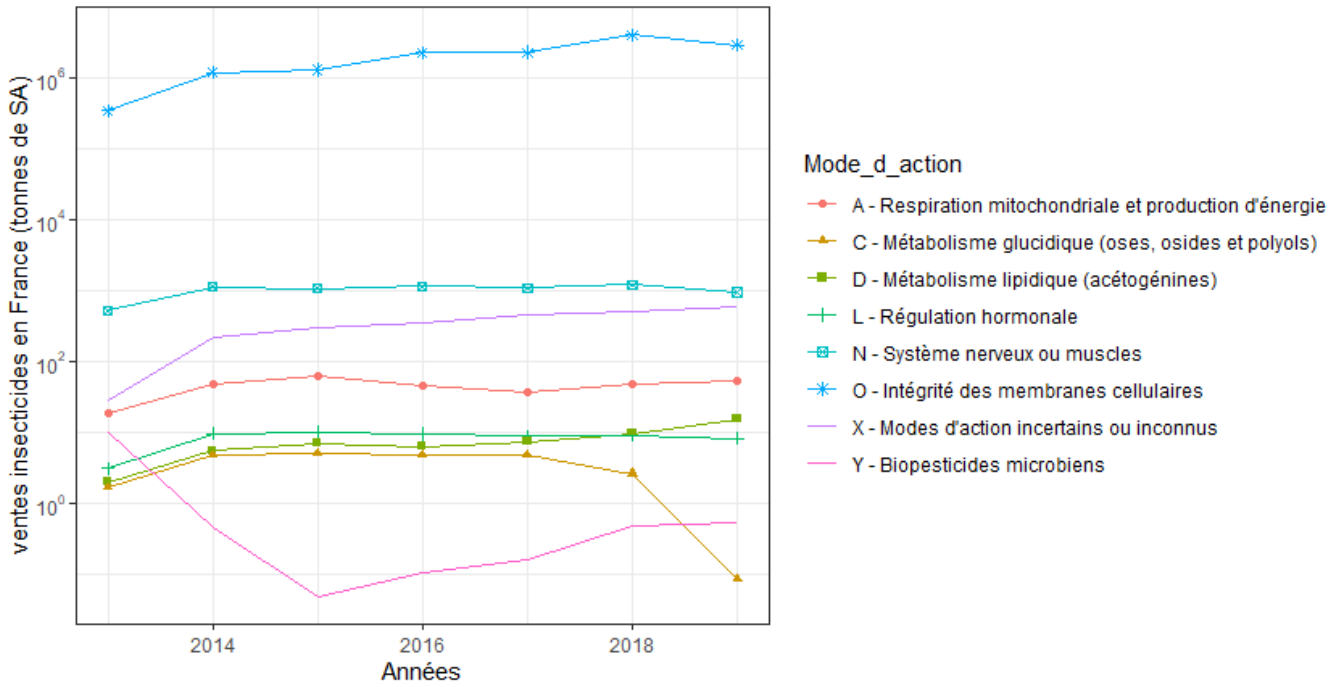


Figure 18 : Quantité d'insecticides vendue en France sur la période 2013-2019 en fonction de leur mode d'action comme défini par R₄P. Ce graphique a été réalisé à partir des bases de données de vente des produits phytosanitaires officiels (geo.data.gouv.fr). Les huiles minérales qui agissent sur l'intégrité des membranes cellulaires (groupe O) sont représentées ici bien qu'elles soient surtout utilisées comme adjuvant pour des herbicides plus que pour leur usages contre des pucerons sur cultures pérennes (marginal en terme de volume par rapport à l'usage herbicide). J'ai retiré le soufre de ces calculs car qui est d'abord utilisé comme fongicide même s'il a également des propriétés insecticides.

CHAPITRE 1 : Combinaison de mécanismes de résistance : deux exemples chez des lépidoptères ravageurs

Introduction

Les deux principaux mécanismes de résistance chez les insectes sont les mutations de cibles moléculaires et la détoxification. La combinaison de ces deux mécanismes n'est pas souvent étudiée. Dans leur étude sur les résistances aux pyréthrinoïdes d'un insecte vecteur de maladie humaine, Fronza *et al.* montrent que mutation de cibles (ici *kdr*) et détoxification peuvent cohabiter avec un effet plus fort pour le premier mécanisme que pour le second (Fronza, Roca-Acevedo *et al.* 2020). Une étude sur le vecteur de la malaria cette fois montre non seulement une combinaison entre détoxification et mutation de cible mais en plus elle révèle des différences de combinaisons de ces mécanismes entre populations testées (Nardini, Christian *et al.* 2012). Dans leur revue de 2010, Hardstone et Scott listent 15 études qui permettent de répondre à la question : est-ce que les résistances multiples sont synergistes, antagonistes, neutres, ou additives. Ils concluent qu'à l'état homozygote elles sont plutôt synergiques, et hétérozygote additives avec des exceptions (Hardstone and Scott 2010). Les modèles biologiques présentés dans cette revue sont tous des diptères sauf une espèce de puceron. Une étude plus récente montre que l'effet synergiste conféré par la mutation *kdr* combiné à des MFO est avéré quand *Aedes aegypti* est face à des pyréthrinoïdes mais que cela entraîne des résistances croisées négatives au contact de certaines substances organophosphorées (Smith, Sears *et al.* 2019).

Est-ce la norme pour détoxification et mutation de cible de coexister dans une même population pour résister au mieux à une substance active ? Est-ce que ces mécanismes de résistance se combinent différemment entre populations chez les lépidoptères aussi ?

Dans ce premier chapitre, je cherche à élucider les mécanismes de résistance chez deux lépidoptères ravageurs. Je présenterai la probable implication de mécanismes de détoxification et de mutation de cible et leur imbrication dans la résistance à plusieurs insecticides de synthèse chez *Grapholita molesta* et *Ostrinia nubilalis* (Siegwart, Monteiro *et al.* 2011; Siegwart, Thibord *et al.* 2017). Les méthodes que j'ai choisies dans ces études ne permettent pas de différencier la plasticité phénotypique de la sélection d'allèles de résistance aux insecticides, pour ne pas alourdir mon discours j'ai regroupé ces deux notions sous le terme 'résistance aux insecticides', ce qui est toujours le cas dans la littérature scientifique (cf. paragraphe C de l'étude bibliographique).

La tordeuse orientale du pêcher, *Grapholita molesta* (Tortricidae, Grapholitini), est un lépidoptère ravageur des vergers de pêchers (*Prunus persicae* (Linné)). Les larves de *G. molesta* attaquent à la fois les pousses et les fruits de sa plante hôte indigène, mais cette tordeuse est également connue pour se nourrir de coings, d'abricot, d'amandes, de nêfle et, dans une moindre mesure, de cerises et prunes (Balachowsky 1966). De plus, elle a acquis récemment la capacité de réaliser tout son cycle de vie dans les vergers de fruits à pépins. Cette observation a été faite sur les continents américains et européens et sa présence cause de lourds dommages sur les pommes et les poires (Reis Fo, Nora *et al.* 1987; Usmani and Shearer 2001; Natale, Mattiacci *et al.* 2003). Dans la première publication que je vais présenter ici, il était surtout question de déterminer s'il y avait des résistances dans des populations brésiliennes recevant de nombreux traitements insecticides et d'élucider les mécanismes sous-jacents. Pour avoir un panorama du spectre de résistance de ces populations, nous avons testé des substances

actives appartenant à 5 familles chimiques différentes. L'objectif de cette première étude était également de produire un outil de détection de ces résistances pour en permettre une meilleure gestion sur le terrain.

La pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Crambidae, Pyraustinae), n'avait jusque-là pas développé de résistances aux insecticides chimiques bien qu'elle soit l'un des plus importants ravageurs du maïs en Europe et en Amérique du Nord (Bohnenblust, Breining et al. 2014). En France les insecticides pyréthrinoïdes sont les plus utilisés pour lutter contre ce ravageur depuis les années 80. Sa résistance aux pyréthrinoïdes a été officiellement signalée pour la première fois en 2012 lorsque des essais biologiques sur des insectes collectés dans la région Centre ont montré un rapport de résistance de 119 en laboratoire (Siegwart, Thibord et al. 2012). Dans la deuxième publication que je présente dans ce chapitre, nous avons cherché à mieux caractériser la résistance observée et à déterminer les mécanismes sous-jacents.

Premier article: Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations

Tools for Resistance Monitoring in Oriental Fruit Moth (Lepidoptera Tortricidae) and First Assessment in Brazilian Populations

M. SIEGWART,^{1,2} L. B. MONTEIRO,³ S. MAUGIN,¹ J. OLIVARES,¹
S. MALFITANO CARVALHO,⁴ AND B. SAUPHANOR¹

J. Econ. Entomol. 104(2): 636–645 (2011); DOI: 10.1603/EC10302

ABSTRACT In southern Brazilian apple (*Malus* spp.) orchards, predominantly organophosphates are used to control the oriental fruit moth, *Cydia molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae), but control failures often occur. Therefore the susceptibility of three *C. molesta* Brazilian populations was investigated to five insecticides of different groups and modes of action, in comparison with a susceptible laboratory strain mass reared in southern France for >10 yr. At the same time, comparative biochemical and genetic analysis were performed, assessing the activities of the detoxification enzymatic systems and sequencing a gene of insecticide molecular target to find out markers associated with resistance. The three Brazilian populations were significantly resistant to chlorpyrifos ethyl compared with the reference strain. One of the field populations that had been frequently exposed to deltamethrin treatments showed significant decreasing susceptibility to this compound, whereas none of the three populations had loss of susceptibility to tebufenozide and thiacloprid compared with the reference strain. All three populations had slight but significant increases of glutathione transferase and carboxylesterases activities and significant decrease of specific acetylcholinesterase activities compared with the reference. Only the most resistant population to chlorpyrifos exhibited a significantly higher mixed function oxidase activity than the reference. The acetylcholinesterase of females was significantly less inhibited by carbaryl in the Brazilian populations than in the reference strain (1.7–2.5-fold), and this difference was not expressed in the male moth. However, no mutation in the MACE locus was detected. These biological and molecular characterizations of adaptive response to insecticides in *C. molesta* provide tools for early detection of insecticide resistance in field populations of this pest.

RESUMO Os inseticidas organofosforados são utilizados predominantemente para controle da mariposa oriental, *Cydia molesta* Busck em pomares de maçã na região Sul brasileira, mas ocorrem frequentemente perda de eficiência de controle. Portanto, a suscetibilidade de três populações brasileiras de *C. molesta* foi estudada a cinco inseticidas de diferentes grupos e modos de ação, comparando com população suscetível de laboratório criadas no sul da França há mais de dez anos. Ao mesmo tempo, foram realizados testes comparativos bioquímicos e análises genéticas, avaliando as atividades dos sistemas de desintoxicação enzimática e seqüenciamento de um gene, procurando encontrar marcadores associados à resistência. As três populações brasileiras foram significativamente resistente ao clorpirifós etil em comparação com a população de referência. Uma das populações de campo, que tinha sido freqüentemente expostos a deltametrina, apresentaram diminuição significativa de sensibilidade a este composto, ao passo que nenhum dos três populações apresentaram uma perda de susceptibilidade para tebufenozide e tiaclopride, quando comparada com a população de referência. As três populações apresentaram aumentos significativos de glutathione transferase e atividades carboxilesterases e diminuíram a atividade de acetilcolinesterase em relação à referência. Apenas a população mais resistente ao clorpirifós apresentou significativa atividade de oxidase de função mista em relação a referência. A acetilcolinesterase de fêmeas foi significativamente menos inibida por carbaryl na população brasileira

¹ INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, F-84000 Avignon, France.

² Corresponding author, e-mail: myriam.sieglwart@avignon.inra.fr.

³ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 81531-990 Curitiba, Brazil.

⁴ Universidade Federal de Lavras–UFLA, Departamento de Entomologia, 37200-000 Lavras, Brazil.

do que na população de referência (1,7 a 2,5 vezes), e essa diferença não foi expressa em machos. No entanto, nenhuma mutação no locus MACE foi detectado. Estas caracterizações biológicas e moleculares, da resposta adaptativa de *C. molesta* aos inseticidas, fornece ferramentas para a detecção precoce da resistência em populações de campo.

KEY WORDS *Cydia molesta*, insecticide resistance, monitoring, mechanism, target mutation

The oriental fruit moth, *Cydia molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae), is a damaging lepidopteran pest in peach (*Prunus persicae* (L.) orchards. *C. molesta* larvae attack both shoots and fruit of its native host plant, but this moth also is known to feed on quince [*Cydonia oblonga* (Mill.)], apricot [*Prunus armeniaca* (L.)], almond [*Prunus dulcis* (Mill.)], and medlar [*Mespilus germanica* (Bosc.)] and to a minor degree on cherry [*Prunus cerasus* (L.)] and plum [*Prunus domestica* (L.)] (Balachowsky 1966). Moreover, although this species was previously expected to migrate toward pome fruit in the late generations after the harvest of stone fruit, *C. molesta* has acquired the ability to complete its life cycle on American and European pome fruit orchards and is causing heavy damage on apple (*Malus* spp.) and pears (*Pyrus* spp.) (Reis et al. 1988, Usmani and Shearer 2001, Natale et al. 2003).

C. molesta has been present in southern Brazil since the early 1980s (Lorenzato 1988), and its damage was first recorded in Vacaria (Rio Grande do Sul) and Fraiburgo (Santa Catarina) and then during the 1990s in São Joaquim (Santa Catarina) and Porto Amazonas (Paraná). The control of *C. molesta* in Brazil involved exclusively neurotoxic insecticides, including numerous organophosphates (OPs), until the end of 1990s. Tebufenozide and novaluron are the only insect growth regulators (IGRs) registered against *C. molesta* in Brazil (Andrei 2009). These insecticides are aimed to control simultaneously *C. molesta* and secondary pests, including *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) and *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) (Botton et al. 2000).

In Brazilian apple orchards and in southern European peach orchards as well, the protection against *C. molesta* requires up to 10 treatments per year (Monteiro et al. 2009, Siegwart et al. 2010b). Despite this high insecticide pressure, control failures were recorded in several locations of both production areas during the past 2 yr (Monteiro et al. 2009, Monteiro and Souza 2010, Siegwart et al. 2010b). This could be the result of the selection of insecticide resistance, as it has already occurred for OPs and carbamates in North American populations of *C. molesta* (Kanga et al. 1997, Pree et al. 1998).

Insecticide resistance management requires a discontinuous selection process that may be obtained from the use of nonchemical control methods (Roush and Tabashnik 1990, Monteiro et al. 2008) or by alternating insecticide compounds with different modes of action. The implementation of new compounds is thus of interest to counter the selection of resistance to neurotoxic compounds that may result from their intensive and often exclusive use in Europe (mainly

pyrethroids) or in South America (mainly OPs). New neo-nicotinoid and insect growth regulator (IGR) families could be interesting tools, because several neurotoxic active ingredients are now withdrawn from European and South American registration.

Early detection of insecticide resistance also is needed to avoid the rapid spread of this phenomenon and to allow the implementation of resistance management strategies (Kanga et al. 2003). Studies on the North American population showed an increase of esterase in resistant populations compared with the susceptible ones, along with a decreased inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by carbamates and OPs (Kanga et al. 2003), indicating a probable mutation in this enzyme gene.

In this study, the resistance status of Brazilian populations of *C. molesta* collected in more or less intensively sprayed orchards was investigated to five active ingredients from different insecticide families: 1) neonicotinoid, 2) pyrethroid, 3) molting activating compound (MAC), 4) carbamate, and 5) OP. Bioassays were paired with metabolic analysis and gene sequencing of insecticide molecular targets, to identify markers associated with the resistance to these different insecticide groups. Enzyme assays were designed to assess the activity of three systems involved in insecticides detoxication in numerous insect pests: glutathione transferases (GSTs), mixed function oxidases (MFOs), and carboxylesterases (ESTs) (Yasutomi 1983, Oppenoorph 1985). The total AChE activity, which may vary, resulting in resistance to OPs or carbamates (Zhu and Gao 1999) was estimated. Finally, genes coding for the two forms of AChE were partially sequenced. The whole methodology was designed to define molecular and multimetabolic diagnostic tools to investigate the combination of mechanisms involved in resistance phenomenon.

Materials and Methods

Insects. Three Brazilian populations of *C. molesta* were sampled in apple orchards in Vacaria (Rio Grande do Sul state), Lages (Santa Catarina state), and Porto Amazonas (Paraná state). A susceptible laboratory strain (S_{it}) originating from Italian peach orchards (Provided by Fabio Molinari, University of Piacenza, Italy) was used as reference. The Vacaria population was collected in 2005 and reared in the laboratory on artificial diet (Guennelon et al. 1981) during 3 yr with two further introductions of new genetic material from the same orchard. This orchard had mainly been protected using pyrethroid and OP applications previous to collecting the population. The other two Brazilian populations were field collected in

early 2008 in orchards where failure of chemical protection occurred. In 2006–2007 season five OPs were applied in Porto orchard, whereas Lages received seven OPs and two MACs. Close to 10% damages were recorded in 2007 in Lages orchard despite this protection program (unpublished data). Porto and Lages populations were reared in Parana Federal University, Curitiba (Brazil) during two generations. The three Brazilian populations were then transferred at Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Avignon, where analyses were performed. These analyses were completed during three successive generations, required to multiply the insects and for preliminary tests to set the adequate concentrations of the different insecticide and the methodology of enzyme analysis. The rearing of the field populations and of the reference strain was conducted at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h. Egg laying was obtained in plastic tubes (8 cm in diameter, 20 cm in length) closed on both sides with gaze. Eggs were placed on artificial diet (Guennelon et al. 1981) in a plastic container (30 by 14 by 10 cm) for larval development. Larvae pupated in gaze strips, in plastic containers. The reference strain S_{it} had been mass reared on artificial diet for 10 yr in Crop Protection Service in Lyon, France, without any insecticide exposure.

Insecticides. Susceptibility of the populations to the OP chlorpyrifos-ethyl (Pyrinex ME, 250 g/liter, Makhteshim-Agan, Sevre, France), to the neonicotinoid thiacloprid (Calypso, 480 g/liter, Bayer CropScience, Lyon, France), to the pyrethroid deltamethrin (Decis, 15 g/liter, Bayer CropScience), to the carbamate carbaryl (Sevin, 85% wettable powder, Certis, Guyancourt, France), and to the benzhydrazid tebufenozide (Confirm, 240 g/liter, Dow Agrosciences, Sophia Antipolis, France) were assessed. Fresh dilutions of formulated insecticides were prepared in distilled water for bioassays on neonates.

Bioassays. Microplate (96-wells, Sterilin, Dutscher SAS, Brumath, France) wells were filled with 150 μl of artificial diet (Stonefly Industries Ltd., Rochester, NY), and 6 μl of each insecticide solution was applied to the diet's surface according to Reyes and Sauphanor (2008). For each population, concentration–response relationships were established per insecticide. Six concentrations giving between 0 and 100% mortality were used. Distilled water replaced insecticide in the control (Fuentes-Contreras et al. 2007). Newly hatched larvae (0–4 h old) were individually placed in the wells. Mortality was recorded after 7 d at 25°C . A larva was considered as dead when not responding to a probe with dissecting forceps. Missing larvae (a mean of 1.6% in the whole experiment) were subtracted from the initial number.

Enzymatic Activities. GST, MFO, EST, and AChE activities were evaluated on adult (head for AChE activity and inhibition, abdomen for MFO, and thorax for other enzymes). At least 12 insects per sex and per population were analyzed for each enzymatic system. Fluorescence and absorbance were measured using a microplate reader (HTS 7000, PerkinElmer Life and

Analytical Sciences, Boston, MA). To obtain activities of the three enzyme systems on each insect, each part of adult body was used as specific enzyme extract.

Enzyme extracts. EST and GST activities were evaluated using single thorax homogenized in 110 μl of 50 mM HEPES buffer, pH 7.0. For AChE activity, one head was homogenized on ice in 50 μl of 50 mM phosphate buffer with 0.5% Triton, pH 7.2. For AChE inhibition, five heads of adults were pooled and homogenized in 250 μl of ice-cold 0.05 M phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.5% Triton. The homogenates obtained from each insect segment were centrifuged at $15\,000 \times g$ for 15 min at 4°C , and the supernatants were used as enzyme sources (Bouvier et al. 2002). The protein content of each sample was measured according to Bradford (1976) by using bovine serum albumin to build the standard curve.

GSTs. GST activity was determined in black microplates (96-well, Corning Life Sciences, Lowell, MA) by using monochlorobimane (MCB) as substrate (Nauen and Stumpf 2002). The reaction mixture in one well consisted of 30 μl of enzymatic extract, 170 μl of a solution containing 6 μl of 100 mM glutathione, 162 μl of HEPES buffer (50 mM, pH 7.0), and 2 μl of 30 mM MCB. Wells with HEPES buffer instead of enzyme extract were used as controls. Fluorescence was measured after 20-min incubation at 22°C , with 380 nm excitation and 450 nm emission filters. Because the bimane-glutathione adduct was not commercially available, the activity was expressed as fluorescence units per minute per microgram of total protein extracted.

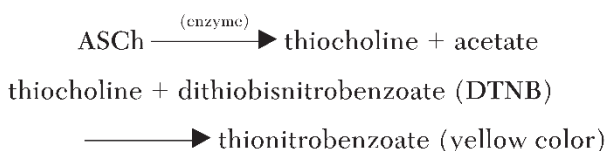
ESTs. Total nonspecific EST activity was measured with α -naphthyl acetate (α -NA) and para nitrophenyl acetate (p-NA) as substrates (Reyes et al. 2011). The reaction mixture for the first substrate was 1 μl of protein extract and 194 μl of 30 μM α -NA in HEPES buffer (50 mM, pH 7.0) in each microplate well. The reaction was stopped and colored after 20-min incubation at 22°C in darkness, by adding 55 μl of 0.2% Fast garnet GBC in 2.5% sodium dodecyl sulfate solution. Absorbance was recorded at 590 nm, after incubation during 20 min in darkness at room temperature.

The reaction mixture for the second substrate was 2.5 μl of protein extract, 2.5 μl of p-NA (50 mM in dimethyl sulfoxide) in 245 μl of HEPES buffer (50 mM, pH 7.0) with EDTA (1 mM) in each well. Absorbance was recorded at 405 nm each minute (kinetic mode) during 10 min. If the stabilization of speed reaction occurred, the difference of optical density per minute was calculated; otherwise, the measurement was repeated. Two standard curves with α -naphthol (0–18 nmol per well) or p-nitrophenol (0–37.5 nmol per well) were elaborated to express activity in nanomoles of product per minute per milligram of total proteins.

MFOs. The MFO activity was determined using 7-ethoxycoumarin *O*-deethylation (ECOD) (Ulrich and Weber 1972) adapted for in vivo analysis in microplate. Twenty-four fresh insects of each strain were analyzed. Adult abdomens were dissected and homogenized in incubation solution (100 μl of HEPES buffer

[50 mM, pH 7.0] with 7-ethoxycoumarin [0.4 mM] on ice and centrifuged at $15\,000 \times g$ for 2 min at 2°C. Supernatants were individually placed in wells of black microplates (96-well, Corning Life Sciences). After 4-h incubation at 30°C, the reaction was stopped by adding 100 μ l of 1.5 M glycine buffer, pH 10.3. The 7-hydroxycoumarin (HC) fluorescence was quantified with 380 nm excitation and 465 nm emission filters. Four wells receiving glycine buffer previous to incubation were used as control. The activity was expressed as picograms of 7-HC per insect per min via to a standard curve of 7-HC (0.5–4.5 nmol per well).

AChE. The AChE activity was determined using acetylthiocholine (ASCh) as substrate (Ellman et al. 1961). To analyze numerous samples, Ellman's protocol was adapted for microplate analysis. The enzyme activity was measured by increase of yellow coloration due to the formation of thionitrobenzoate, based on the following reactions:



Nineteen to 40 insect extracts were analyzed per sex and population. The reaction mixture in one well was composed of 138.5 μ l of phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0), 5 μ l of DTNB (0.01 M, 0.3 mM final concentration), 1.5 μ l of ASCh (0.1 M, 1 M final concentration), and 5 μ l of protein extract. Four wells receiving phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) instead of protein extract were used as control. Absorbance was recorded at 405 nm every minute (kinetic mode) during 10 min. When the reaction speed was stabilized, the activity was calculated and expressed in nanomoles of thiocholine per minute per milligram of total protein via standard curves with DTT (0–4.5 nmol per well) instead of thiocholine (Ellman et al. 1961). Because DTT has two functional groups—SH, this standard curve has to be divided by two before using.

The inhibition of AChE activity by carbaryl was assessed using 25 insects per sex and population. We dissolved 20 μ l of carbaryl in ethanol in each well of a microplate, and the solvent was evaporated to dryness before addition of reaction mixture. Preliminary studies were conducted to estimate the representative range of insecticide concentrations. On this prepared plate, 10 μ l of extracts was incubated at 4°C during 20 min. In the control wells the insecticide was replaced by the solvent alone and in the blank by 0.01 M eserine. The reaction was initiated by addition of a solution containing 133.5 μ l of phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0), 5 μ l of DTNB (0.01 M, 0.3 mM final concentration), and 1.5 μ l of ASCh (0.1 M, 1 mM final concentration). The absorbance was recorded every 5 min for a total period of 40 min. Three replicates of seven concentrations were used in each test. Concentration of insecticides causing 50% inhibition (IC_{50}) of AChE activity were estimated through probit analysis (Russell et al. 1977). Differences in inhibition among genotypes were considered not significant if the 95%

confidence limits (CL) of the inhibition ratio at the IC_{50} level of the susceptible strain included 1.0 (Robertson and Preisler 1992).

Sequencing the Molecular Targets of Insecticides. Eight individuals were sequenced for ace1: one from S_{it} , one Porto, two Vacaria, and two Lages. The last two are a Porto and a Vacaria survival of biotests at 1,200 ppm of chlorpirifos. These last two individual are used to sequence ace2 gene.

We performed the total DNA extraction of *C. molesta* by using a hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) protocol (Murray and Thompson 1980). Adults were individually ground in 200 μ l of proteinase K (0.3 mg/ml) and incubated overnight at 56°C. Lysis occurred at 65°C during 1 h by adding 300 μ l of lysis buffer (200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, and 2% CTAB) and 100 μ l of Sarcosyl 5%. Proteins were precipitated and separated by chloroform:isoamylalcohol (24:1) treatment. Nucleic acids were precipitated at -20°C after adding 1 volume of isopropanol. The DNA pellet was washed in ethanol and resuspended in 60 μ l of water. Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were carried out in a 25- μ l reaction volume containing 1 \times GoTaq buffer (Promega, Madison, WE), 200 μ M each dNTPs, 0.4 μ M each primer, 1 U of GoTaq, and 2 μ l of DNA template.

For amplification in the first gene of AChE (ace1), we used the primers ACE 1S (5'-ccagacctgttgaaagctg-3') and ACE 1R (5'-tgctctctggaatgcctacg-3') and for amplification in the second gene (ace2), we used primers ACE 2S (5'-gtgccgcagcatttaagagt-3') and ACE 2R (5'-tgcctctctcatcattgtg-3').

Thermal conditions were 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 60 s, and 74°C for 2 min. For ace1, primers were designed using a sequence of the related tortricid moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). This sequence name is cydpom-ace1, noted in the GenBank database under accession DQ267977 (Cassanelli et al. 2006). For ace2, the cDNA sequence of the gene (accession HM775184) was provided by S. Cassanelli (University of Modena and Reggio Emilia, Italy).

The PCR fragments obtained were purified after visualization using 1% agarose gel with the QIAquick gel extraction kit (Genome Express, Meylan, France) and directly sequenced. Data analysis was performed with the BioEdit software (Tom Hall, Carlsbad, CA).

Statistical Analyses. A probit analysis on corrected mortalities (Abbott 1925) was done to determine the LC_{50} values (Raymond 1985). Resistance ratios at the LC_{50} (RR_{50} , the ratio between the LC_{50} of the resistant strain and the LC_{50} of the susceptible strain) and their 95% CL were calculated. The LC_{50} values were considered different when the 95% CL of their RR_{50} did not include 1. Biochemical data were subjected to analysis of variance. Means were compared by the protected least significant difference Tukey test ($P < 0.05$) by using the software R (Bell Laboratories, Murray Hill, NJ).

Table 1. Susceptibility to five insecticides of neonate larvae of one reference strain (S_{it}) and three Brazilian populations (Vacaria, Porto, Lages) of *C. molesta*

Insecticide	Pop	n^a	LC ₅₀ ^b (95% CL)	LC ₅₀ susceptibility ratio/ S_{it} ^c
Chlorpyrifos	S_{it} ^d	168	92.53 (40.70–177.44)	
	Vacaria	168	276.17 (171.28–568.68)	2.98 (2.23–3.99)
	Porto	165	272.44 (151.62–829.76)	2.94 (2.24–3.87)
	Lages	161	250.17 (134.35–814.38)	2.70 (2.06–3.54)
Deltamethrin	S_{it}	164	0.13 (0.10–0.18)	
	Vacaria	167	0.24 (0.17–1.72)	1.80 (1.16–2.79)
	Porto	166	0.12 (0.10–0.13)	0.88 (0.69–1.12)
	Lages	164	0.12 (0.11–0.14)	0.90 (0.75–1.09)
Thiacloprid	S_{it}	190	91.30 (72.60–108.46)	
	Vacaria	165	55.98 (17.57–78.65)	0.61 (0.42–0.90)
	Porto	168	39.39 (22.60–53.05)	0.43 (0.30–0.62)
	Lages	166	86.16 (66.92–110.40)	0.94 (0.67–1.34)
Tebufenozide	S_{it}	165	9.44 (7.18–10.94)	
	Vacaria	166	9.30 (5.44–11.62)	0.98 (0.71–1.36)
	Porto	188	8.15 (3.71–46.10)	0.86 (0.61–1.23)
	Lages	191	4.55 (2.99–7.49)	0.48 (0.36–0.64)
Carbaryl	S_{it}	191	165.3 (120.3–227.6)	
	Vacaria	189	237.3 (181.2–312.8)	1.44 (1.00–2.08)
	Porto	186	190.0 (120.7–229.9)	1.15 (0.77–1.71)
	Lages	188	144.4 (108.2–192.4)	0.87 (0.58–1.32)

^a Number of neonates tested.

^b LC₅₀ values expressed in milligrams per liter⁻¹.

^c Susceptibility ratio/ S_{it} : resistance ratio = LC₅₀ of Brazilian strain divided by LC₅₀ of the reference strain.

^d S_{it} : European reference strain mass reared on artificial diet since >10 yr.

Results

Laboratory Bioassays. The three Brazilian populations tested were significantly less susceptible to chlorpyrifos than the European reference strain S_{it} , with RR_{50} values ranging from 2.70 to 2.98 (Table 1). The Vacaria population was also significantly resistant to deltamethrin ($RR_{50} = 1.80$), whereas the two other populations were not. Vacaria population also was the least susceptible to carbaryl, with 1.00–2.08 values of the 95% CL of its RR_{50} (Table 1). Surprisingly, two populations were significantly less susceptible to thiacloprid than the reference strain ($RR_{50} = 0.61$ and 0.43 for Vacaria and Porto, respectively), and the Lages population was 2 times less susceptible to tebufenozide than S_{it} ($RR_{50} = 0.48$).

Despite differences in their selection pressure, the three Brazilian codling moth populations did not exhibit strong differences in their insecticide susceptibility. All of them responded similarly to chlorpyrifos ethyl. However, the Vacaria population was two-fold less susceptible to deltamethrin than Porto and Lages (Vacaria versus Porto $RR_{50} = 2.04$ [1.32–3.16]; Vacaria versus Lages $RR_{50} = 1.96$ [1.27–3.05]). In the same way, Porto population was 2.19 (1.60–2.99) times more susceptible to thiacloprid than Lages, and Lages was 2.04 (1.53–2.72) times more susceptible to tebufenozide than Vacaria.

Enzymatic Activities. The three Brazilian populations exhibited significantly higher GST activities than the S_{it} strain ($F = 34.11$, $df = 39$, $P < 0.001$; $F = 25.34$, $df = 43$, $P < 0.001$; and $F = 15.95$, $df = 45$, $P < 0.001$ for Lages, Porto, and Vacaria, respectively) (Fig. 1a). The highest enzymatic ratio was obtained between

Lages and S_{it} strain (1.7-fold). No sex-linked variability was observed for this enzyme system ($F = 2.309$, $df = 1$, $P = 0.133$) (data not shown). EST activities measured using both α -NA and p-NA substrates followed similar patterns as GST activity (Fig. 1b), with significantly higher values in the three Brazilian populations than in the S_{it} strain ($F = 29.060$, $df = 40$, $P < 0.001$; $F = 35.112$, $df = 44$, $P < 0.001$; and $F = 14.914$, $df = 46$, $P < 0.001$ with α -NA for Lages, Porto, and Vacaria, respectively; $F = 31.400$, $df = 39$, $P < 0.001$; $F = 29.863$, $df = 43$, $P < 0.001$; and $F = 17.512$, $df = 43$, $P = 0.001$ with p-NA for Lages, Porto, and Vacaria, respectively). The highest enzymatic ratio was between Lages and S_{it} strain: 2.0-fold for α -NA and 1.7-fold for p-NA. The Lages populations, collected in orchards where failure of chemical protection occurred, had higher GST and α -NA activities than the Vacaria population, whereas the Porto population exhibited intermediate activities for both enzyme systems. These three populations did not differ significantly from each other for p-NA EST activities.

A different pattern was observed for specific AChE activity, with a significantly higher activity in the S_{it} strain than in Brazilians populations ($F = 87.4077$, $df = 211$, $P < 0.001$). But as for GST and EST enzyme systems, the Vacaria population exhibited a lower specific AChE activity than Porto and Lages ($F = 50.9626$, $df = 105$, $P < 0.0001$ and $F = 27.4031$, $df = 126$, $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 1c). No sex-linked variability was observed for AChE activities ($F = 0.375$, $df = 211$, $P = 0.5410$).

Only the Lages population had significantly higher MFO activity than the S_{it} strain ($F = 7.7$, $df = 46$, $P = 0.008$). Moreover, activity ratio is low (1.4-fold), and the three Brazilian populations did not differ significantly from each other for this character. All tested females exhibited a higher MFO activity than males ($F = 11.3$, $df = 84$, $P < 0.002$) (Fig. 2), due to their significant bigger size (data not shown). This difference was verified regardless of the population (S_{it} : $T = 7.9$, $df = 22$, $P < 0.001$; Porto: $T = 18.2$, $df = 22$, $P < 0.001$; Vacaria: $T = 10.9$, $df = 15$, $P < 0.005$; and Lages: $T = 8.2$, $df = 22$, $P < 0.001$). The inhibition of the AChE activity by carbaryl was significantly lower in the Brazilian population than in the S_{it} strain, excepted for the males of the Vacaria population (Table 2). The AChE of Lages population was also less susceptible to the inhibition by carbaryl than that of Vacaria moths.

Gene Sequencing of AChE. Parts of the two AChE genes (*ace1* and *ace2*) were sequenced for the first time in *C. molesta* to search for a mutation potentially involved in OP resistance. No differences were found between the four oriental fruit moth populations in the 850-pb segments of *ace1* gene that were sequenced (AN in GenBank HM775185). Seventy-four point differences were found between the DNA sequences of *C. molesta* and *C. pomonella*, three of them being responsible of protein variation: I168V, P272A, and I369T (numbers correspond to *C. pomonella* [numbering DQ267977]). These three

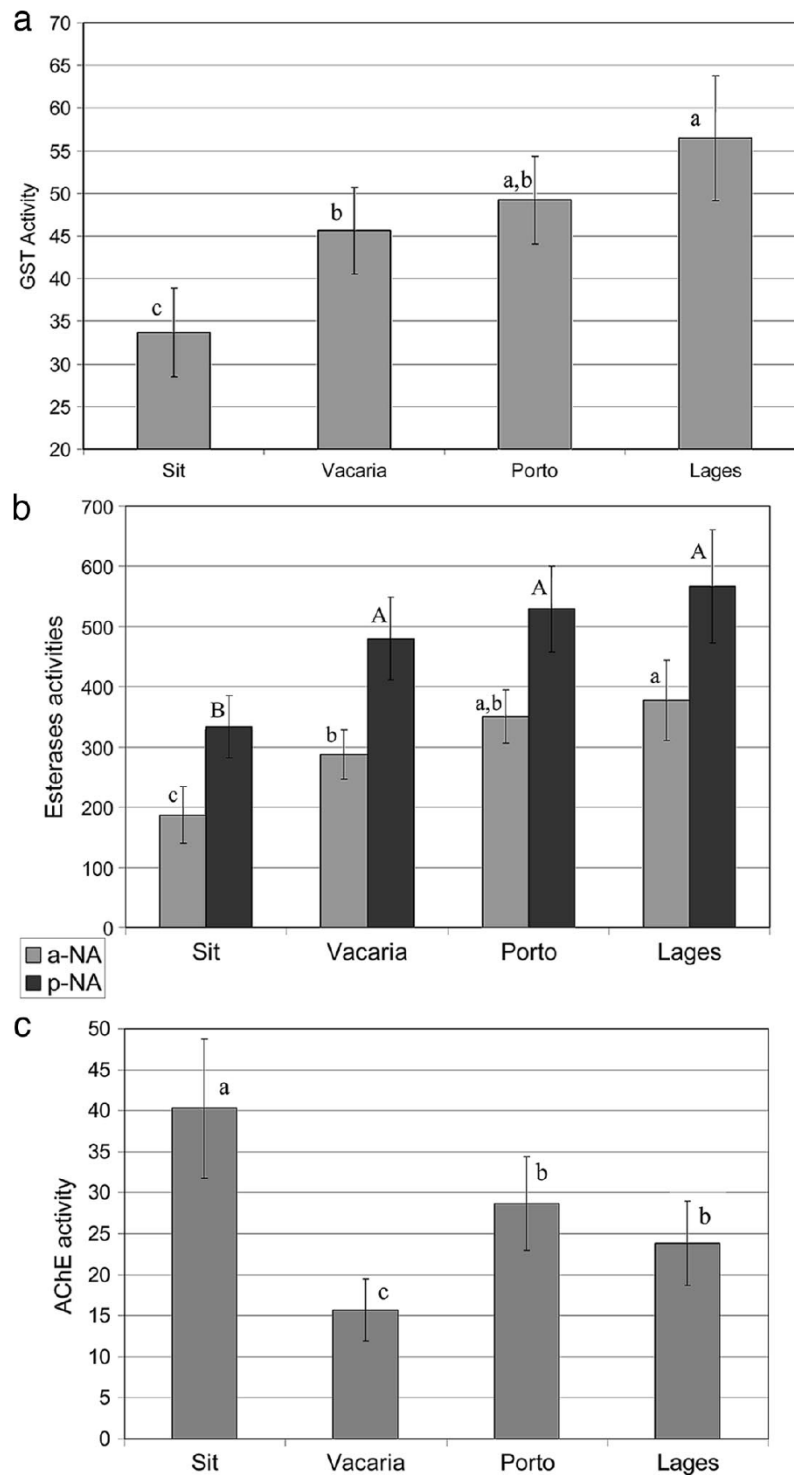


Fig. 1. (a) GST activity, measured in fluorescence unit formed per minute per microgram of protein, in reference strains (S_{it}) and Brazilian strains (Vacaria, Porto, and Lages) of the oriental fruit moth. (b) Carboxylesterase activity, measured in nanomoles of product (α -naphthol or p-nitrophenol) per minute per milligram of protein. Letters (uppercase for esterase activity with p-NA and lowercase for esterase activity with α -NA) illustrate Tukey's test results ($P > 0.05$). (c) AChE activity, measured in nanomoles of ASCh per minute per milligram of protein, in reference strains (S_{it}) and Brazilian strains (Vacaria, Porto, and Lages) of the oriental fruit moth. Letters illustrate Tukey's test results ($P > 0.05$).

variant amino acids exist in other species. They are presumably not involved in the enzyme conformation and activity. The second gene known to code AChE in *Cydia* genus, *ace2* was partially sequenced

in individuals showing high tolerance to chlorpyrifos in our bioassays (AN in GenBank HM775184). But none sequence differences was found between our S_{it} strain and these individuals.

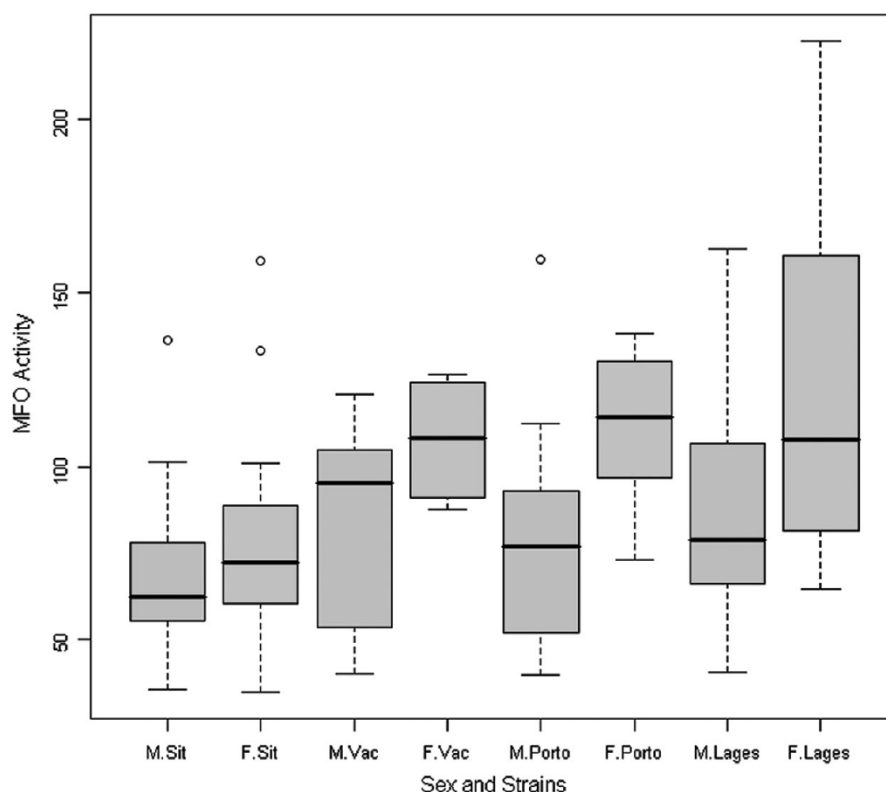


Fig. 2. Distribution of MFO activities (picograms of 7-HC per minute per abdomen of insect) by populations and sex.

Discussion

The first aim of this study was to set up in *C. molesta* a method developed previously in *C. pomonella* allowing the early detection of insecticide resistance in field populations (Reyes and Sauphanor 2008). This was achieved through the implementation of bioassays with targeted insecticides, enzymatic diagnostic based on the main systems involved in insecticide metabolism, and sequencing of the molecular target of OPs.

The microplate bioassay on neonates already described for *C. pomonella* (Reyes and Sauphanor 2008) proved appropriate for *C. molesta* and provided reliable results for the five tested insecticides, highlighting small but significant differences between the tested populations and the reference susceptible strain. The three Brazilian populations exhibited a

higher tolerance to chlopyrifos than the reference strain *S_{it}*, in coherence with the frequent applications of OP insecticides in Brazilian orchards to prevent *C. molesta* injury. Such reduced susceptibility to OPs may partially explain the heavy damages on fruit caused in these orchards by *C. molesta* during the past 5 yr. However, Vacaria population was significantly more tolerant to deltamethrin than Porto and Lages, probably because pyrethroids were more frequently used before 2000 than now. Indeed Vacaria is one of the oldest and the largest growing area for apple orchards in Brazil, planted in the beginning of 1980. Lages and Porto orchards were planted more recently, in 1990 and 1998, respectively, and therefore received only few pyrethroid treatments during their production period.

Table 2. Acetylcholinesterase inhibition by carbaryl in adults of four populations of *C. molesta*

Pop	Sex	n ^a	Slope ± SE	IC ₅₀ ^b (95% CI)	IR ^c (95% CI)	χ ²
S _{it}	Male	25	1.03 ± 0.07	0.012 (0.009–0.015)		3.8
	Female	25	0.84 ± 0.06	0.008 (0.006–0.011)		1.7
Vacaria	Male	25	1.15 ± 0.07	0.012 (0.010–0.015)	1.0 (0.9–1.2)	3.9
	Female	25	1.00 ± 0.07	0.011 (0.009–0.014)	1.7 (1.2–1.5)	4.3
Porto	Male	25	1.21 ± 0.09	0.017 (0.014–0.022)	1.5 (1.3–1.7)	1.8
	Female	25	1.07 ± 0.07	0.016 (0.012–0.020)	1.9 (1.7–2.1)	1.7
Lages	Male	25	1.15 ± 0.06	0.019 (0.015–0.024)	1.6 (1.5–1.8)	2.9
	Female	25	1.06 ± 0.07	0.021 (0.016–0.027)	2.5 (2.2–2.8)	4.6

^a Number of adult moths tested.

^b Concentration are expressed in millimoles per minute per milligram of protein for carbaryl.

^c IC₅₀ values estimated by probit analysis; inhibition ratio IR was calculated by dividing the IC₅₀ for the Brazilian populations (Lages, Porto, or Vacaria) by the IC₅₀ for our laboratory strain (S_{it}) for each gender.

In our study, the reliability of the reference strain has to be considered carefully. It was collected in Italy >15 yr ago in an untreated peach tree orchard and was then maintained in continuous mass rearing in the laboratory without any selection pressure. It is thus expected to be susceptible to insecticides but also to have a genetic background strongly different from the populations more recently sampled, in apple orchards of a distant continent. All our populations had been reared on artificial diet for a few generations in the same conditions previous to the study, avoiding the differential induction of digestive enzymes by the host plants. However we cannot exclude that the differences of enzyme activities recorded between the field populations and the reference result from these distant genetic backgrounds rather than from an adaptive response to the insecticide pressure. The responses to insecticide and the enzyme activities were often observed to be dependent on the host plant, as demonstrated for the susceptibility of *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) to OPs (Robertson et al. 1990). The comparison of the responses to insecticides and of biochemical characteristics between the three Brazilian populations is thus meaningful.

The three Brazilian populations exhibited a reduced susceptibility to chlorpyrifos compared with the reference strain, together with a decreased specific activity of the AChE target of OPs and carbamates. It is noticeable that the Vacaria population owning the lowest specific AChE activity also was the least susceptible to carbaryl. Similar OP resistance associated to reduced AChE's affinity for ASCh substrate was described previously in *C. pomonella* (Reuveny and Cohen 2004). This resistance to chlorpyrifos in oriental fruit moth populations also was associated with an increase of GST and EST (for both α -NA and p-NA substrates) activities. However, converging to what occurs in *C. pomonella* (Reyes et al. 2011), these combined target site modification and detoxification mechanisms do not confer a high level of resistance to the analyzed pesticides. But in these oriental fruit moth populations, the activity ratios of the detoxifying enzymes were rather low, never exceeding 2 times more than the reference. The Brazilian populations also slightly differed from the reference strain for their specific AChE activity (0.4- to 0.7-fold) and for AChE's inhibition by carbaryl (1.7- to 2.5-fold in female moths). Comparatively, the 25-fold resistance to carbofuran of Canadian populations of *C. molesta* (Kanga et al. 1997) was associated to a close four-fold increase of α -NA esterase activity and to a 1,757-fold decrease of susceptibility of AChE to carbaryl, without any alteration of the MFO and GST activities. Further investigations attributed this resistance to OPs and carbamates of North American populations of *C. molesta* to a sex-linked alteration of AChE (Kanga et al. 1997, de Lame et al. 2001, Shearer and Usmani 2001). The small differences of specific AChE activity and of inhibition by carbaryl observed in our samples also could be the result of a mutation or of a modified expression of the ace gene in some individuals. We

therefore focused on qualitative or quantitative modifications of the gene, more precisely on the section where a mutation MACE was described in *C. pomonella* (Cassanelli et al. 2006). The sequencing did not reveal any modification in this part of the gene, but a modification can be localized in another section of the gene. Moreover, only eight insects could be sequenced at this step, and we thus have now to develop a routine test to screen entire populations. Moreover, although the basic blueprint of life is encoded in DNA, the execution of the genetic plan is carried out by the activities of proteins. The fabric of biological diversity is therefore protein-based and natural selection acts at the protein and phenotypic level (Karr 2008, Biron et al. 2010). Another hypothesis to test is that *C. molesta* resistance is caused by posttranscriptional changes by using transcriptomics and proteomics tools (Biron et al. 2006, Nedelkov et al. 2006, Karr 2008).

None of the observed mechanisms could explain the resistance to deltamethrin in Vacaria population, which was significant compared with the reference strain and with the two other Brazilian populations as well. Compared with these two populations, Vacaria had the lowest GST and MFO activities and also expressed the lowest affinity for both EST substrates. Such specific resistance to deltamethrin could thus be the result of a mutation in the target site of pyrethroids, the voltage-dependant sodium channel, as demonstrated previously in numerous insect species, including *C. pomonella* (Brun-Barale et al. 2005, Reyes et al. 2007), and also is suspected in French populations of *C. molesta* (Siegwart et al. 2010a). The sequencing of this gene in *C. molesta* would thus be of particular interest, to go back to the conserved DNA samples of Brazilian and French populations.

The Lages population issuing from the orchard that was the most heavily treated during in the past 5 yr also had the highest GST and EST activities, significantly higher than the Vacaria population, and it also had an increased MFO activity compared with the reference strain. Such activities were not related to an increased tolerance to any of the tested insecticides but conversely to a significantly increased susceptibility to tebufenozide. An increased susceptibility to thiacloprid also was recorded in Lages and Porto populations, without any relation with the observed mechanisms. Regarding the low resistance and activity ratios that were recorded in this study, it may be hypothesized that resistance mechanisms are at the beginning of the selection process, as attested by the large intra population variability and the high activities recorded in few individuals of the population issuing from the most heavily treated orchard in Lages. Moreover, it cannot be excluded that a part of the resistance was lost during the few generations of rearing of the populations in the laboratory without selection pressure, due to the fitness cost usually associated to metabolic resistances (Roush and Plapp 1982, McKenzie and Batterham 1991, Boivin et al. 2003) and to the AChE mutations as well (Bourguet et al. 2004, Shi et al. 2004). However, this loss of resistance during the rearing process could only lead to an under estimation of the

rate of resistant individuals in the analyzed populations, without qualitative change in the observed mechanisms.

Establishing the baseline susceptibility to insecticides and the baseline activity of enzymatic metabolism systems is required for insecticide resistance monitoring and management (Roush and Tabashnik 1990). This was made possible with this study for insecticide groups that were the most intensively used in apple orchards during previous decades, i.e., OPs, pyrethroids, and carbamates. Due to their negative ecological impact, these compounds are now being replaced by more selective or new compounds, including IGRs and neo-nicotinoids. Despite the frequent observation of metabolic resistance to the molting activator tebufenozide in various lepidopteran species (Sauphanor and Bouvier 1995, Smaghe et al. 1998, Waldstein and Reissig 2000, Cao and Han 2006), the efficacy of this insecticide was conserved against the tested populations. This is also the case for thiacloprid, which is not yet frequently applied in the studied area. The developed and tested method will be used to analyze new populations, trying now to get large collections allowing direct investigations on the F1 neonates of the sampled insects. This method also will be implemented for other insecticides, including the recent compounds that are expected to be registered in Brazil against *C. molesta*.

Acknowledgments

We acknowledge Stefano Cassanelli (University of Modena) and Reggio Emilia for informations and precious advices on the genetic part of this study. We also thank Fabio Molinari for supply of the Italian strain. Finally, we thank David Biron for critical review and English editing. We thank Companhia de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil) for funding the sabbatical grant of L.B.M. at INRA Avignon.

References Cited

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 275–277.
- Andrei, E. 2009. *Compêndio de defensivos agrícolas*. 8^o Edição, Andrei Ed., São Paulo, Brazil.
- Balachowsky, A. S. 1966. *Entomologie appliquée à l'agriculture*, traité 2, vol. 2. Masson et Cie, Paris, France.
- Biron, D. G., H. D. Loxdale, F. Ponton, H. Moura, L. Marché, C. Brugidou, and F. Thomas. 2006. Population proteomics: an emerging discipline to study metapopulation ecology. *Proteomics* 6: 1712–1715.
- Boivin, T., J. C. Bouvier, J. Chadœuf, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2003. Constraints on adaptive mutations in the codling moth: measuring fitness trade-offs and natural selection. *Heredity* 90: 107–113.
- Botton, M., O. Nakano, and A. Kovaleski. 2000. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) em regiões produtoras de maçã do Sul do Brasil. *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 633–637.
- Bourguet, D., T. Guillemaud, C. Chevillon, and M. Raymond. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58: 128–135.
- Bouvier, J. C., T. Boivin, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51: 55–66.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brun-Barale, A., J.-C. Bouvier, D. Pauron, J.-B. Berge, and B. Sauphanor. 2005. Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L. and development of a diagnostic test. *Pest Manag. Sci.* 61: 549–554.
- Cao, G., and Z. Han. 2006. Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. *Pest Manag. Sci.* 62: 746–751.
- Cassanelli, S., M. Reyes, M. Rault, G. C. Manicardi, and B. Sauphanor. 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 642–653.
- de Lane, F. M., J. J. Hong, P. W. Shearer, and L. B. Brattsten. 2001. Sex-related differences in the tolerance of oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) to organophosphate insecticides. *Pest Manag. Sci.* 57: 827–832.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, Jr., and R. M. Feather-Stone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88–95.
- Fuentes-Contreras, E., M. Reyes, W. Barros, and B. Sauphanor. 2007. Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *J. Econ. Entomol.* 100: 551–556.
- Guennelon, G., H. Audemard, J. C. Fremond, and M. A. El Idrissi Ammari. 1981. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* 1: 59–64.
- Kanga, L.H.B., D. J. Pree, J. L. van Lier, and G. M. Walker. 2003. Management of insecticide resistance in oriental fruit moth (*Grapholita molesta*; Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. *Pest Manag. Sci.* 59: 921–927.
- Kanga, L.H.B., D. J. Pree, J. L. van Lier, and K. J. Whitty. 1997. Mechanisms of resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta* (Busck)). *Pestic. Biochem. Physiol.* 59: 11–23.
- Karr, T. L. 2008. Application of proteomics to ecology and population biology. *Heredity* 100: 200–206.
- Lorenzato, D. 1988. Lepidópteros nocivos em fruteiras rosáceas no Sul do Brasil. *Ipagro* 31: 7.
- McKenzie, J. A., and P. Batterham. 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends Ecol. Evol.* 9: 166–169.
- Monteiro, L. B., and A. Souza. 2010. Tortricid moth control in apple with two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in fraiburgo, Sc. Rev. Bras. Frutic. 32: 423–428.
- Monteiro, L. B., L.L.M. de Mio, A.C.V. Motta, B. M. Serrat, and F. L. Cuquel. 2009. Fluctuation and damage of *Grapholita molesta* in peach orchards for integrated production in Lapa, Parana, Brazil. *Bragantia* 68: 99–107.
- Monteiro, L. B., A. de Souza, and L. Belli. 2008. Mating disruption for the control of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), in Fraiburgo, Santa Catarina, Brazil. *Bragantia* 67: 191–196.

- Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325.
- Natale, D., L. Mattiacci, A. Hern, E. Pasqualini, and S. Dorn. 2003. Response of female *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to plant derived volatiles. *Bull. Entomol. Res.* 93: 335–342.
- Nauen, R., and N. Stumpf. 2002. Fluorometric microplate assay to measure glutathione S-transferase activity in insects and mites using monochlorobimane. *Anal. Biochem.* 303: 194–198.
- Nedelkov, D., U. A. Kiernan, E. E. Niederkofle, K. A. Tubbs, and R. W. Nelson. 2006. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. *Mol. Cell. Proteomics* 5: 1811–1818.
- Oppenorph, F. J. 1985. The biochemistry and genetics of insecticide resistance, pp. 731–774. In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 12. Pergamon, Oxford, United Kingdom.
- Pree, D. J., K. J. Whitty, L. van Driel, and G. M. Walker. 1998. Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara Peninsula of Ontario. *Can. Entomol.* 130: 245–256.
- Raymond, M. 1985. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour microordinateur. *Entomol. Med. Parasitol.* 23: 117–121.
- Reis, F. W., I. Nora, and R. Melzer. 1988. Population dynamics of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) and its adaptation on apple in south Brazil. *Acta Hort.* 232: 204–208.
- Reuveny, H., and E. Cohen. 2004. Evaluation of mechanisms of azinphos-methyl resistance in the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 57: 92–100.
- Reyes, M., and B. Sauphanor. 2008. Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. *Pest Manag. Sci.* 64: 945–953.
- Reyes, M., P. Franck, P. J. Charmillot, C. Ioriatti, J. Olivares, E. Pasqualini, and B. Sauphanor. 2007. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Manag. Sci.* 63: 890–902.
- Reyes, M., B. Collange, M. Rault, S. Casanelli, and B. Sauphanor. 2011. Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 99: 25–32.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992. *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL.
- Robertson, J. L., K. F. Armstrong, D. M. Suckling, and H. K. Preisler. 1990. Effects of host plants on the toxicity of azinphosmethyl to susceptible and resistant light brown apple moth (Lepidoptera, Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 2124–2129.
- Roush, R. T., and F. W. Plapp, Jr. 1982. Effects of insecticide resistance on biotic potential of the house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 75: 708–713.
- Roush, R. T., and B. E. Tabashnik. 1990. *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Russell, R. M., J. L. Robertson, and N. E. Savin. 1977. POLO: a new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 23: 209–213.
- Sauphanor, B., and J. C. Bouvier. 1995. Cross-resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pestic. Sci.* 45: 369–375.
- Shearer, P. W., and K. A. Usmani. 2001. Sex-related response to organophosphorus and carbamate insecticides in adult Oriental fruit moth, *Grapholita molesta*. *Pest Manag. Sci.* 57: 822–826.
- Shi, M. A., A. Lougarre, C. Alies, I. Fremaux, Z. H. Tang, J. Stojan, and D. Fournier. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol. Biol.* 4: 5.
- Siegwart, M., F. Bouvier, S. Maugin, and B. Sauphanor. 2010a. Host plant differentiation in French populations of oriental fruit moth, *Cydia molesta*. In IOBC, Working Group Integrated Protection of Fruit Crops, 13–17 September 2010, Vico del Gargano, Italy.
- Siegwart, M., H. Coupard, C. Mottet, and B. Sauphanor. 2010b. Recrudescence de la tordeuse orientale. *Phytoma* 633: 28–32.
- Smagge, G., T. S. Dhadialla, S. Derycke, L. Tirry, and D. Degheele. 1998. Action of the ecdysteroid agonist tebufenozide in susceptible and artificially selected beet armyworm. *Pestic. Sci.* 54: 27–34.
- Ulrich, V., and P. Weber. 1972. The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes: a direct fluorometric test. *Physiol. Chem.* 353: 1171–1177.
- Usmani, K. A., and P. W. Shearer. 2001. Susceptibility of male oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) populations from New Jersey apple orchards to azinphosmethyl. *J. Econ. Entomol.* 94: 233–239.
- Waldstein, D. E., and W. H. Reissig. 2000. Synergism of tebufenozide in resistant and susceptible strains of obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) and resistance to new insecticides. *J. Econ. Entomol.* 93: 1768–1772.
- Yasutomi, K. 1983. *Role of detoxification esterases in insecticide resistance*. Plenum, New York.
- Zhu, K. Y., and J. R. Gao. 1999. Increased activity associated with reduced sensitivity of acetylcholinesterase in organophosphate-resistant greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Sci.* 55: 11–17.

Received 16 August 2010; accepted 9 January 2011.

Deuxième article: Biochemical and molecular mechanisms associated with the resistance of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) to lambda-cyhalothrin and first monitoring tool.

Insecticide Resistance and Resistance Management

Biochemical and Molecular Mechanisms Associated With the Resistance of the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Lambda-Cyhalothrin and First Monitoring Tool

Myriam Siegwart,^{1,2} Jean-Baptiste Thibord,³ Jérôme Olivares,¹ Céline Hirn,⁴ Jan Elias,⁴ Sandrine Maugin,¹ and Claire Lavigne¹

¹INRA, UR 1115 PSH, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, 84000 AVIGNON, France (myriam.siegwart@inra.fr; jerome.olivares@inra.fr; sandrine.maugin@inra.fr; claire.lavigne@inra.fr), ²Corresponding author, e-mail: myriam.siegwart@inra.fr, ³ARVALIS Institut du végétal, 21 chemin de Pau, 64 121 Montardon (JB.THIBORD@arvalisinstitutduvegetal.fr), and ⁴Syngenta Crop Protection, 4002 Basel, Switzerland (celine.hirn@syngenta.com; Jan.elias@syngenta.com)

Subject Editor: Brad Coates

Received 29 August 2016; Editorial decision 31 October 2016

Abstract

The European corn borer (*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) is one of the most serious corn pest in Europe where it is controlled with pesticides, in particular, pyrethroids. First control failures with this chemical family occurred on the field in 2008 in the center of France, and the first resistance case was described in 2012. In the present study, we investigate resistance mechanisms involved in seven French populations of *O. nubilalis* collected in the field. Resistances to deltamethrin and lambda-cyhalothrin were confirmed, with a higher resistance ratio for lambda-cyhalothrin (63.79 compared to 7.67). Resistance to the two active compounds was correlated except for one population, indicating a high probability of cross-resistance. Analyses of the activity of three major families of detoxification enzymes in resistant individuals showed a significant increase of the average MFO activity in males of four populations (activity ratios of 2.76–5.73) and higher GST activity in females of two other populations (activity ratios 4.48 and 5.21). Molecular investigation of the sodium channel gene sequence showed the presence of the *kdr* mutation in a highly resistant individual. We designed a PCR-RFLP screening tool to search for this mutation in the field, and we found it in five populations but not in the susceptible one. The resistance of *O. nubilalis* to pyrethroids in France seems to result from a combination of resistance mechanisms, possibly as a consequence of a selection pressure with an exceptional duration (almost 40 yr old).

Key words: pyrethroid, deltamethrin, *kdr*, cytochrome p450 (MFO), glutathione-S-transferase (GST)

The control of insect pests is a major issue in agriculture. However, management strategies relying on insecticides may be compromised by pest insecticide resistance. Until now there have been no reports of resistance to chemical insecticides for the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) (Pyraloidea, Crambidae, Pyraustinae) despite the fact that it is one of the most important corn pest in Europe and North America (Bohnenblust et al. 2014). This polyphagous moth is native from northern Africa, western Asia, and Europe (Tudon et al. 1989) and was accidentally introduced into North America at the beginning of the twentieth century (Caffrey and Worthley 1927). The larvae bore into stalks and ears of corn. In France, the loss was evaluated on average at 4% of yield potential per larvae per plant. Losses can be higher in the case of water stress (Thibord 2009). For the past 15 yr, control of *O. nubilalis* has been widely based on the use of transgenic Bt corn in America and

numerous studies have investigated mechanisms of resistance to Bt toxins (Bravo et al. 2011) and resistance management schemes (Huang et al. 2011). The emergence of insects resistant to Bt corn in the field has been slow, possibly because the resistance alleles were initially rare (frequency <1) (Bourguct et al. 2003, Stodola et al. 2006) and strategies have been designed to slow down the evolution of resistance (Huang et al. 2011).

Control of *O. nubilalis* is based on the use of insecticides in regions of the world where GM crops are not grown, for example, in France. In this country, the insecticide-based control of this pest is mostly performed using pyrethroids since late 1970s. The first evidence of possible resistance to pyrethroids in *O. nubilalis* was reported in the mid-2000s in central France. Between 2008 and 2011, field experiments in this area confirmed a low efficiency of lambda-cyhalothrin and other active ingredients belonging to the

family of pyrethroids (J.-B. Thibord 2009, Personal communication). Resistance to pyrethroids was formally reported in 2012 when bioassays on insects collected in fields of this same region with excessive damage showed resistance ratio as high as 119 in the laboratory (Siegwart et al. 2012). To our knowledge, such resistance was not reported elsewhere in this species. In the present study, we aimed to characterise the observed resistance better and to determine underlying mechanisms.

Pyrethroids are neurotoxic to insects and act by binding on the voltage-gated sodium channel. Resistance to pyrethroids is reported in numerous insect pests (Soderlund and Knipple 2003). Two main categories of mechanisms have been reported to cause resistance. The first is associated with the detoxification of the insecticide molecule by specific enzymes (Liu and Scott 1998, Kranthi et al. 2001). The second is linked to nonsynonymous mutations in the gene coding for the voltage-gated sodium channel, the principal site of pyrethroid action. Mainly two mutations have been found in numerous pests, the one, named *kdr* for “knock down resistance” was the first reported in 1951 and is the most common one (Busvine 1951, Soderlund and Knipple 2003). The second mutation, *super-kdr*, was reported 16 yr later and was also found in various insect pests (Farnham 1977, Soderlund and Knipple 2003). Detoxification and mutation are not exclusive, and both types of resistance can coexist in a single insect population (Franck et al. 2007).

In the present study, we chose to assess the presence of these two types of resistance mechanisms in French populations of *O. nubilalis* collected in corn fields where resistance was either suspected or not. 1) First, we assessed if resistance was associated with increased detoxification by specialised enzymes by measuring activities of three major families: Oxygenases P₄₅₀ (MFO), the glutathione-S-transferases (GST), and carboxylesterase (EST). 2) Second, we assessed if the resistance was acquired through a mutation of the molecular target gene of pyrethroids: the voltage-gated sodium ion channel by sequencing a part of this gene carrying *kdr* and *super kdr* mutations in domains IIS4, IIS5, and IIS6 segments.

Materials and Methods

Insect Sampling

We used as a reference one susceptible laboratory strain that has been mass reared on an artificial diet at the INRA of Magneraud (France) for 20 yr without insecticide selection pressure. This strain originated from a nontreated field near Paris (France). Other individuals were collected as diapausing larvae directly in corn stalks in seven corn fields located near the following cities (French department number): Epieds-en-beauce (45); Semerville (41); Tripleville (41); Labosse (41); Binas (41); Montardon (64); and Rouffach (68). Larvae were stored 4 mo at 4 °C in the laboratory to break down diapause. The larvae were then individualized in small boxes with some moist cotton in a climatic chamber at 23 °C and a photoperiod of 16:8 (L:D) h. Adult emergence was checked every day. As soon as we obtained one male and one female from the same population, these were paired for reproduction. We thus assess 16 pairs for Epied en Beauce; 14 pairs for Semerville; 3 pairs for Labosse; 3 pairs for Binas; 12 pairs for Montardon; and 7 pairs for Rouffach.

Offsprings were submitted to toxicological tests at the neonatal stage (bioassays). Individuals that survived the bioassay at high insecticide concentration (up to 13 ppm for lambda-cyhalothrin or 13.28 ppm for deltamethrin, see below) were kept in individual vials containing artificial diet without insecticide pressure during the rest of their life cycle. As soon as these resistant individuals emerged as

adults, half of their abdomens were dissected and immediately used to measure MFO activity; protein extractions were performed on the second half for GST and EST activities measurement, and the rest of the insect body was individually kept in 90% ethanol at 4 °C for genetic analyses.

Following the bioassay results, we selected and sequenced a highly resistant individual from Semerville (n°205) and a nontreated from Montardon (n°3) to seek for the *kdr* and *Super-Kdr* mutations. Further, we selected 37 individuals to create a molecular *kdr* detection tool. This selection include 26 individuals that are survivors to very high insecticide concentration, plus six from the location Rouffach (where the *kdr* mutation was first detected), plus five samples from the nontreated population of Montardon.

Insecticides

The commercial formulations of lambda-cyhalothrin (Karate Zeon[®]) and deltamethrin (Decis Protech[®]) were purchased from Syngenta (France) and Bayer (France). The insecticides were diluted in osmosed water. Insecticide ranges used to test the reference strain were 0.54; 1.17; 1.8; 3.9; 6; and 9.5 ppm for lambda-cyhalothrin and 2.61; 3.91; 5.88; 8.84; 13.28; 19.96; and 30 ppm for deltamethrin. These concentrations were adapted for field populations (see below).

Bioassays

Susceptibilities of the reference strain and offspring of wild individuals were evaluated by bioassays on the neonate larvae stage. Microplate (96-wells, Sterilin Ltd, Newport, United Kingdom) wells are first filled with 150 µl of artificial diet (Stonefly Industries Ltd, Rochester, NY). Six microliters of insecticide solution was overlaid on the diet, and one neonate larva (0–4 h old) was deposited on each well 20 min after treatment (Reyes and Sauphanor 2008). Controls were placed on each plate on, untreated artificial diet, to estimate the percentage of natural mortality. Osmosed water replaced insecticide for the controls (Fuentes-Contreras et al. 2007). Wells were sealed with parafilm and a lid was placed on each microplate to prevent larvae escape. Mortality was recorded after seven days at 23 °C. A larva was considered as dead when not responding to a probe with dissecting forceps. Missing larvae were subtracted from the initial number.

The corrected mortality was calculated using the Abbott formula (Abbott 1925).

For each insecticide concentration, the average sensitivity level of a population/strain was calculated as the mean corrected mortality of all individuals from this population/strain.

For each population/strain, concentration–response relationships were established per insecticide. The six concentrations of lambda-cyhalothrin and seven of deltamethrin (see above) giving between 0 and 100% mortality for the reference strain were initially used. When a population contained resistant individuals, i.e. individuals that survived the highest concentrations tested on the reference strain (9.5 ppm of lambda-cyhalothrin or 30 ppm of deltamethrin), extra upper concentrations were tested. These concentrations are chosen by keeping the same multiplying factor used in the original range until we reached 100% of mortality. Probit analyses were performed on these results with the free software *prpobit* 1.63 (Sakuma 1998); <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11284>). All resistance ratios were calculated on the basis of these analyses.

Enzymatic Activities

The general principle for the dosage of enzymatic activities is to measure the quantity of the product of an enzymatic reaction and to divide it by the total protein content of the sample. The amount of

product is determined by a level of absorbance or fluorescence. MFO activity was measured on fresh half posterior parts of adult abdomens directly placed in the reaction solution. Measurement of GST and EST activities were performed using the second (anterior) half of the abdomen and necessitated a preliminary phase of protein extraction.

The total protein content of each sample was measured with Bradford colorimetric test using bovine serum albumin to build the standard curve (Bradford 1976).

Fluorescence and absorbance were measured using a microplate reader (Infinite 200, Tecan, Männedorf, Switzerland).

Mixed-Function Oxidase (MFO)

The MFO activity was determined using 7-ethoxycoumarin O-decetylation (ECOD) (Ulrich and Weber 1972) adapted for in vivo analysis in microplates. Adult abdomens were dissected and directly homogenized in an incubation solution containing 100 μ l of Hepes buffer (50 mM pH 7) with 7-ethoxycoumarin (0.4 mM) on the ice. After 4-h incubation at 30 °C, the reaction was stopped by adding 100 μ l of 1.5M glycine buffer (pH 10.3) and centrifuged at 15 000 \times g for 2 min at 2 °C. Supernatants were individually placed in wells of black microplates (96-wells, Corning Costar, New York, U.S.). The 7-hydroxycoumarin (HC) fluorescence was quantified with 380 nm excitation and 465 nm emission filters. Three wells per microplates were left without samples but just the mix receiving glycine buffer previous to incubation to have a blank. Protein dosages were made on this reaction product after fluorescence measurement. A 10-fold dilution was operated before this dosage using the Bradford method (Bradford 1976). The MFO activity was expressed as pg of 7-HC/ μ g of total protein/min by using a standard curve of 7-Hydroxycoumarin (HC) (0.5-4.5 nmoles/well) to convert fluorescence in 7 HC quantity.

Glutathione S-Transferase (GST)

For protein extraction, anterior half abdomens were crushed in 110 μ l of Hepes buffer (50 mM, pH 7) on the ice and the obtained homogenates were centrifuged at 15 000 g for 15 min at 4 °C. Supernatants were stored at -80 °C before use. When all extractions were finished, the supernatants were used as enzyme sources for reactions in a single test to limit handling errors (Bouvier et al. 2002). GST activity was determined in transparent microplates (96-wells, Sterilin, Newport, United Kingdom) using 2,4-dinitro-chlorobenzene (CDNB) as substrate (Nauen and Stumpf 2002). The reaction mixture in one well consisted of 2 μ l of enzymatic extract, 198 μ l of a solution containing: 10 μ l of 50 mM glutathione (GSH), 185 μ l of Hepes buffer (50 mM, pH 7.0), and 3 μ l of 50 mM CDNB. Three wells per microplate were filled with 2 μ l of Hepes buffer (50 mM, pH 7.0) instead of enzyme extract as blank. Absorbance was measured after 2 min of incubation at 25 °C in kinetic mode every 30 s at 340 nm. Since the CDNB-glutathione adduct was not commercially available, we were unable to build a standard curve, so we used the molar extinction coefficient (9.6 mM⁻¹.cm⁻¹) of CDNB-glutathione to convert absorbance in μ mol of CDNB-glutathione. The final specific activity was expressed in μ mol of CDNB-glutathione/min/mg of total protein extracted.

Carboxylesterases (EST)

The same protein extracts were used as for GST. Total nonspecific EST activity was measured with α -naphthyl acetate (α -NA) as substrate (Reyes 2007). The reaction mixture was 1 μ l of protein extract and 194 μ l of 30 μ M α -NA in Hepes buffer (50 mM, pH 7.0) in each

microplate well. After 20 min of incubation at 22 °C in darkness, the reaction was stopped and coloured by adding 55 μ l of 0.2% Fast Garnet GBC diluted in 2.5% sodium dodecyl sulphate solution. Absorbance was recorded at 590 nm, after incubation for 20 min in darkness at room temperature.

The standard curve with α -Naphthol (0-18 nmoles/well) was elaborated to express activity in nmoles of product/min/mg of total proteins.

Sequencing and Detecting the *kdr* Mutation

For genetics studies, total DNA was individually extracted from the head of adults moths following Wash et al. (Walsh et al. 1991) with 100 μ l of 10% Chelex 100 (Biorad) solution and 3 μ l (10 mg/ml) of proteinase K (Eurobio). Tissues were digested overnight at 56 °C. After boiling for 30 min, supernatants were used as DNA templates for PCR reaction. Sequencing was done on two selected individuals and detection on 37 moths (see insect sampling).

Sequencing the *kdr* Mutation

The design of all primers was made using the Primer 3 web interface version 0-4-0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) (Rozen and Skaletsky 1999). As no sequence was available for *O. nubilalis* in this part of the genome, we designed our primer OsNa-R2 matching the closest phylogenetic sequence available on GenBank: *Cnaphalocrocis medinalis* (Pyraloidea, Crambidae, Spilomelinae—GenBank accession KC342959 & AGH70334) for the detection of the *kdr* and super*kdr* mutations. According to the high similarities between *Cydia pomonella* and *C. medinalis* we used primers SKdr-F and SKdr-R, previously designed in our lab for this purpose on *C. pomonella* (Franck et al. 2012) as PCR and sequencing primers for the detection of the *Super-Kdr* mutation (Table 1). We then amplified the whole region carrying both mutations (Fig. 2) using SKdr-F and OsNa-R2 at low annealing temperature on two selected individuals.

PCR amplifications were performed with a Mastercycler thermo-cycler (Eppendorf). Each reaction had a volume of 25 μ l containing the following MIX: 1X GoTaq Flexi Buffer, 1.5 mM MgCl₂, and 0.1 mg/ml Bovine Serum Albumin, 200 μ M of each dNTPs, 0.4 μ M of each Forward and Reverse primers, 1 unit of GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) and 4 μ l of DNA template. The PCR conditions were: 3 min at 95 °C followed by 35 cycles at 95 °C for 45s, 50 °C for 1 min, and 72 °C of elongation for 1.5 min with a final extension step at 72 °C for 10 min.

An ~1400 pb PCR product was obtained and sequenced (GATC Biotech) with PCR primers. Sequences were manually edited and aligned both in forward and reverse directions and assembled using the Bioedit Software (Hall 1999). We verified the sequence homology with voltage-gated sodium ion channel sequences known in other susceptible and resistant Lepidoptera (*Bombyx mori*, *Plutella xylostella*, *Cydia pomonella*) and validated the presence of the *Kdr*

Table 1: List of primers used to amplify part of sodium channel gene containing the *kdr* and super-*kdr* locus in *O. nubilalis*

Primer name	Sequence
Skdr-F	5'-GGCCGACACTTAATTTACTCATC-3'
SKdr-R	5'-TTCCCGAAAAGTTGCATACC-3'
Universal M13	5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'
Os-Kdr1	5'-GCACAGTTTCATGATTGTGTTTC-3'
Os-Kdr2	5'-CAGGGCCAAGAAAAGTTAAG-3'
OsNa-R2	5'-GAAGATCCGAAATTTGCACG-3'

L1014F mutation. The obtained complete sequences were deposited in the GenBank database (accession N° KU588158 for the resistant individual and KU588159 for the susceptible one); incomplete or poor quality sequences were not deposited.

Detection of the *kdr* Mutation

To screen the *kdr* mutation in the 37 selected individuals, we used a slightly modified nested PCR approach described by Schuelke (2000) coupled with a PCR-RFLP method from Franck et al. (2007). We designed a new specific primer pair (all primers detailed in Table 1): Forward Os-Kdr1 and reverse Os-Kdr2. Os-Kdr1 was conjugated with a universal 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3' M13-Tail; at its 5' end, the same universal 6-FAM (6-carboxyfluorescein) labeled M13-Tail was used for fluorescence detection. We used a ratio of 1 M13-tailed-Os-Kdr1 primer for 10 Labeled universal M13-tail and 10 Os-Kdr2 reverse primers. We found two size of amplicon, probably due to intron variability: 268 and 273 bp. PCR amplifications were carried out with a Mastercycler thermocycler (Eppendorf). The reaction occurred in 12 µl containing: 1X GoTaq Flexi Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml Bovine Serum Albumin, 200 µM of each dNTPs, 0.4 µM of each labelled M13-Tail and specific reverse primer, 0.04 µM of M13-Tailed specific forward primer, 1 unit of GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), and 2 µl of DNA template. The PCR conditions were: 3 min at 95 °C followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 54 °C for 45 s, 72 °C for 45 s and 10 cycles at 95 °C for 30 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, with a final extension step at 72 °C for 20 min.

All the PCR products were digested at 65 °C for 16 h with two units of Tas I endonuclease and 1X of Buffer N°B (Fermentas) in 20 µl of final reaction volume. Ten microliters of digested products were diluted in 100 µl H₂O; 2 µl of this dilution, 7.8 µl of HiDi formamide, and 0.2 µl GeneScan- 600 LIZ Size standard (Applied Biosystems) were injected on an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) using POP7 polymer. These genotyping runs were analyzed using GeneMapper V4.1 Analysis Software (Applied Biosystems).

Each revealed fragment length was defined as an allele.

Statistical Analyses

A probit analysis on corrected mortalities (Abbott 1925) was performed to determine the LC₅₀/LC₉₀ values (Raymond 1985). Resistance ratios at the LC₅₀ (RR₅₀, which is the ratio between the LC₅₀ of the resistant population and the LC₅₀ of the reference strain) and their 95% CI were calculated. The LC₅₀s were considered different when the 95% CI of their RR₅₀ did not include 1 (Robertson et al. 2007). Correlation between resistance to lambda-cyhalothrin and deltamethrin was performed with the Pearson method. Enzymatic activities data were subjected to the nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) because the data deviated for normality. Means were pairwise compared by the protected least significant difference Wilcoxon test ($P < 0.05$) using the software R (Bell Laboratories, Murray Hill, US).

Results

Toxicological Tests

There was a wide diversity of susceptibility to lambda-cyhalothrin in the field as shown by the continuous range of concentration–mortality response curves in toxicological tests (Fig. 1).

All field populations showed a lower susceptibility to lambda-cyhalothrin than the reference strain. Resistance ratios at LC₅₀ varied from 2.04 to 63.79 for the less (Montardon) to the most resistant population (Epicds-en-Beauce; Table 2).

Resistance ratios to deltamethrin were systematically lower at LC₅₀ than for the lambda-cyhalothrin. Despite this, 4 out of 7 populations had significantly higher LC₉₀ than the reference strain (Table 2).

The resistance ratios to lambda-cyhalothrin and deltamethrin were strongly correlated among populations ($r = 0.93$ $P = 0.007$) if the population Epicds-en-Beauce was removed from the analysis. Numerous individuals from Epicds-en-Beauce were resistant to lambda-cyhalothrin, but few were resistant to deltamethrin.

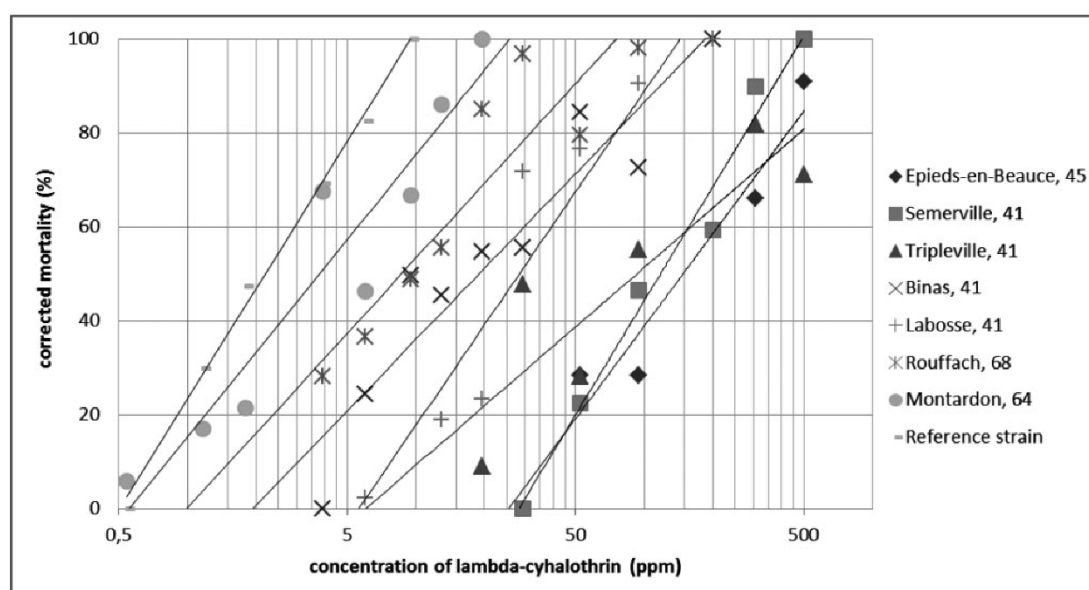


Fig. 1. Concentration–mortality response curves for the bioassay performed with lambda-cyhalothrin on seven populations and a reference strain of *O. nubilalis*.

Table 2: Probit analyses of bioassays performed on seven field populations

	Lambda-cyhalothrin					Deltamethrin						
	n	LC50 (CI)	LC90 (CI)	RR ^a	RR ^b	χ ²	n	LC50 (CI)	LC90 (CI)	RR ^a	RR ^b	χ ²
				(at I.C.50)	(at I.C.50)					(at I.C.50)	(at I.C.50)	
Epièdes-en-Beauce, 45	566	137.79 *	372.40 *	63.79	31.31	11.4	268	12.61 *	99.11 *	2.22	2.53	28.3
Semerville, 41	484	61.69 *	235.30 *	28.56	14.02	36.8	328	43.50 *	232.24 *	7.67	8.73	21.8
Tripleville, 41	443	61.36 *	562.99 *	28.41	13.95	17.7	208	39.22 *	133.36 *	6.92	7.87	9.9
Labosse, 41	387	27.51 *	88.36 *	12.74	6.25	7.4	198	11.05	29.04	1.95	2.21	12.8
Binas, 41	257	17.27 *	121.08 *	8	3.92	20.2	215	20.40	363.50 *	3.6	4.09	5.1
Rouffach, 68	889	5.30	22.16 *	2.45	1.20	10.6	438	4.98	12.00	0.88	–	22.3
Montardon, 64	704	4.40	23.05 *	2.04	–	40.1	311	5.14	34.28	0.90	1.03	4.4
Ref strain	241	2.16	6.56	–	0.49	14.7	192	5.67	16.12	–	1.10	27.4

Lethal concentrations statistically different from the reference strain (nonoverlapping confidence intervals) are marked with a star.

^aRR—Resistance ratio compared to the reference strain.

^bRR—Resistance ratio compared to the most susceptible field population: Montardon for lambda-cyhalothrin, and Rouffach for deltamethrin.

Enzymatic Activities

The GST activities were assessed in only five populations owing to the mortality induced by toxicological tests in populations Rouffach and Montardon. Activity differences were evident between sexes with males showing higher activity levels (Kruskal–Wallis $\chi^2 = 14.6$, $df = 1$, $P = 1.3 \cdot 10^{-4}$). A large interpopulation heterogeneity of GST-specific activity was observed (Table 3). Mean GST activity of females from wild populations was 5.21 to 3.24 times higher than in the reference strain, but only females of the Semerville population had significantly higher GST activities than the reference (Kruskal–Wallis $\chi^2 = 20.7$, $df = 1$, $P = 5.1 \cdot 10^{-6}$). Activity ratio average 2 for males, and no significant difference when compared to the reference strain.

The specific activities of carboxylesterases (EST) were assessed in the same five populations (Table 3) as the GST. Differences were observed between sexes (Kruskal–Wallis $\chi^2 = 46.3$, $df = 1$, $P = 9.8 \cdot 10^{-12}$). No significant differences in activity were observed with the reference strain, considering males and females separately or not, but the three more resistant populations had the highest activities (ratios up to 2). For example, between the reference strain and the most resistant population: Epièdes-en-Beauce for males the Kruskal–Wallis $\chi^2 = 3.7$, $df = 1$, $P = 0.053$ and for females the Kruskal–Wallis $\chi^2 = 3.6$, $df = 1$, $P = 0.058$.

The MFO activities were assessed in six populations (Table 3). As for GST, there was a difference in specific activity between sexes (Kruskal–Wallis $\chi^2 = 138.5$, $df = 1$, $P < 2.2 \cdot 10^{-16}$). Males exhibited higher activity values than females. MFO activities differed between populations (Kruskal–Wallis $\chi^2 = 104.9$, $df = 13$, $P < 2.2 \cdot 10^{-16}$). Males of four populations exhibited higher MFO specific activity than the reference strain while in the two other populations (Semerville and Labosse) females had significantly lower activities than the reference strain or any other population.

Genetic Analyses

Alignment of sequences of the susceptible and the resistant individual highlighted 17 mutations and deletions in the sodium channel

gene α -subunit carrying *kdr* and super *kdr* mutations loci. They were all located in introns except two: one silent mutation (V991) and the *kdr* mutation (Fig. 2). This latter mutation is identical to that in *C. pomonella* and other pests or human disease insect vectors (Soderlund and Knipple 2003, Brun-Barale et al. 2005). At the protein level, it leads to the replacement of a Leucine in position 1014 to a Phenylalanine. The position number was attributed according to the amino acid sequence of the most abundant splice variant of the house fly Vssc 1 sodium channel protein (Ingles et al. 1996, Williamson et al. 1996). We have not found the super *kdr* mutation in the resistant individual sequenced.

The PCR-RFLP detection tool gave clear results (Supp. Fig. 1 [online only]) and allowed us to genotype the 37 individuals from field populations (Table 4). We found two restriction profiles for the susceptible genotypes: at 195 and 218 bp sizes. This variation corresponds to a modification in the intron following the *kdr* mutation locus leading to the elimination of the first *TaqI* cut locus. Furthermore, some size variation was observed on total PCR products probably due to changes in intron sequences. The *kdr* mutation was found in five populations. The only population without the *kdr* mutation was from Montardon, the nontreated field.

Discussion

In the present study, we confirmed the suspected resistance of *O. nubilalis* to lambda-cyhalothrin and deltamethrin in central France. Results further indicate that both high activity of detoxification enzymes and the presence of the *kdr* mutation may be responsible for the resistance. Results allow a better understanding of the recent problems of control of *O. nubilalis* with pyrethroids observed in cornfields of central/northern France.

Cross-resistance, i.e., that two or more resistances are determined by a similar mechanism, is often found between active compounds of the pyrethroid family regardless of the mechanism involved (Zimmer and Nauen 2011, Dykes et al. 2015). In our study, resistance to deltamethrin was not as high as for

Table 3: Enzymatic activities of EST, GST, and MFO on adult abdomens of resistant individuals from seven field populations and a reference strain of *O. nubilalis*

Population	EST activities (nmol α -naphthol/min/mg prot)		GST activities (μ mol of CDNB-GS/min/mg prot)		MFO activities (pg of 7-HC/min/mg prot)					
	Mean of EST activity \pm SD	Activity ratio	Mean of GST activity \pm SD	Activity ratio	Mean of MFO activity \pm SD					
					Female	Male				
<i>Epieds-en-Beauce, 45</i>	87.83 \pm 50.15 (n = 34)	2.16	730.63 \pm 174.58ab (n = 17)	1.360.77 \pm 591.23 (n = 15)	3.24	1.44	86.87 \pm 35.59b (n = 20)	599.85 \pm 370.28b (n = 15)	2.13	3.67
<i>Semerville, 41</i>	85.70 \pm 61.89 (n = 36)	2.10	1009.58 \pm 209.84b (n = 22)	2050.14 \pm 1046.30 (n = 16)	4.48	2.17	21.75 \pm 8.68a (n = 34)	72.81 \pm 45.73a (n = 27)	0.53	0.44
<i>Tripletville, 41</i>	83.93 \pm 48.22 (n = 39)	2.06	887.11 \pm 726.05ab (n = 21)	1735.04 \pm 958.35 (n = 23)	3.94	1.83	51.71 \pm 18.05b (n = 25)	938.35 \pm 493.61b (n = 33)	1.27	5.73
<i>Labosse, 41</i>	27.29 \pm 13.39 (n = 10)	0.67	1172.64 \pm 468.35ab (n = 9)	492.62 (n = 1)	5.21	0.52	19.48 \pm 7.70a (n = 20)	161.94 \pm 111.05a (n = 7)	0.48	0.99
<i>Binas, 41</i>	72.37 \pm 46.29 (n = 16)	1.78	1002.14 \pm 691.92ab (n = 9)	1658.17 \pm 958.14 (n = 7)	4.45	1.75	110.20 \pm 25.48b (n = 10)	488.04 \pm 221.32b (n = 12)	2.71	2.98
<i>Rouffach, 68</i>	–	–	–	–	–	–	79.47 \pm 74.97ab (n = 9)	452.04 \pm 280.11b (n = 3)	1.95	2.76
<i>Montardon, 64</i>	77.17 \pm 26.25 (n = 10)	1.89	157.86 \pm 45.67a (n = 8)	1011.53 \pm 266.76 (n = 2)	0.64	1.07	37.19 \pm 8.66b (n = 7)	299.30 \pm 196.62ab (n = 4)	0.91	1.83
<i>Reference strain</i>	40.74 \pm 18.75 (n = 93)	–	244.86 \pm 34.87a (n = 49)	944.81 \pm 161.46 (n = 45)	–	–	40.73 \pm 11.32b (n = 50)	163.63 \pm 63.33a (n = 29)	–	–

Activity ratio is calculated compared to the reference strain. Populations are ranked in descending order according to their resistance ratio to lambda-cyhalothrin. n—number of samples. Letters indicate homogenous subsets output obtain with a post hoc test ($\alpha < 0.05$).

lambda-cyhalothrin (Table 3; highest RR = 7.67 as compared to RR = 63.79, respectively) but was strongly correlated with it, which is an indication of cross-resistance. A single population, Epieds en Beauce, did not follow this pattern (high resistance to lambda-cyhalothrin and little resistance to deltamethrin), calling for a further investigation of resistance mechanisms.

In our sample, both augmented enzymatic activities involved in the detoxification of insecticides, and the kdr mutation may be responsible for the observed resistance.

Analyses of enzymatic activities gave mixed results. First EST activities of resistant individuals from all populations did not differ from that of the reference strain, suggesting no link to resistance in contrast to reports in other insect species (Kranthi et al. 2001, Thalavaisundaram et al. 2012). Contrarily male resistant individuals exhibited higher MFO activity than the reference strain in four populations and resistant females from one population exhibited higher GST activity than the reference. Interestingly, the population where females exhibited higher GST activity was also the one exhibiting low MFO activity for males, a possible indication that there could be two profiles of populations where selection would favor one or the other mechanism because overexpression of the two enzyme families would be too costly.

The role of MFO enzymes in resistance to pyrethroids has been observed in other species (Scott 1999, Zimmer and Nauen 2011, Gao et al. 2012) and differential expression of MFOs between sexes is frequent (Højland et al. 2014). However, differential expression was seldom related to differences in insecticide resistance (see, e.g., female-linked resistance to spinosad in the housefly (Markussen and Kristensen 2012)). Here these amplified MFO activities were observed only in males. The females even had lower MFO activity than the reference strain in two populations. The reference strain had comparable activity to the untreated population (Montardon), suggesting that it is a satisfactory control. MFO activity was not the only mechanism determining resistance in these populations. But evidence prove its importance: the proportion of females was higher in the two ones with little MFO activities than in the four populations with high MFO activities in males, ($\chi^2 = 4.9$, $df = 1$, $P = 0.026$). As for the MFO, GST has been previously described as responsible in case of Lepidoptera resistance to pyrethroids (Yu and Nguyen 1992, Bouvier et al. 2002).

As suspected for resistance to pyrethroids, a mutation in the sodium channel gene was found in a resistant individual at the locus of the widespread kdr mutation. This result is in line with the bioassay results showing cross-resistance between lambda-cyhalothrin and deltamethrin because these two active ingredients target both the sodium channel. Contrarily, we did not find the super kdr resistance which also confers resistance to pyrethroids in many insects species (Soderlund and Knipple 2003). However, we investigated super kdr in only one individual so that we may have missed it. The finding of the kdr mutation allowed developing a molecular detection tool based on QM13 PCR-RFLP. It enables testing the presence of kdr in 37 individuals at low cost. This tool may provide a large-scale picture of the distribution of this mutation in our study region. It gave very obvious results and thus appeared as a good candidate for high throughput monitoring studies that would be very useful for detecting the presence of the mutation when resistance is suspected or for resistance management programs in situations where the resistance is caused by kdr. Such a tool has already been developed in many other pests especially on codling moth (*Cydia pomonella*) or the green peach aphid (*Myzus persicae*) (Brun-Barale et al. 2005, Cassanelli et al. 2005). PCR-RFLP are routinely used by monitoring frameworks (IRAC or governmental) to visualize resistance

unlikely to exchange genes with the others, as it is a strict monovoltine race showing genetic isolation (Thomas et al. 2003). Multiple appearances of the *kdr* mutation in different locations was reported in other pest species (Franck et al. 2012, Rinkevich et al. 2012a, Rinkevich et al. 2012b). Its maintenance in populations may be related to a small fitness cost as previously observed (Foster et al. 1999, Sakyi et al. 2005, Brito et al. 2013).

The surprisingly long interval between first pyrethroid use and the report of field resistance could be due to an overall weak selection pressure. The treated area is relatively small in France, with only one hectare out of six treated due to low levels of damage, and treatment frequency is limited to one or two applications per year in France. Moreover, *Ostrinia nubilalis* is polyphagous, >224 plant species have been recorded as hosts by Hodgson in 1928. So it can live in untreated refuges area, forming pool of susceptibles individuals. The landscape of mixed farming allow movement of this pest between refuges area and corn crops. This has resulted in diluting the resistance, making more durable chemical control even mono-specific with pyrethroids. It could also be caused by a recessive inheritance of the mutation under field conditions making it necessary that the *kdr* allele reaches a high frequency before resistant (homozygous) individuals are observed. The use of pyrethroids dating back to the 1970s and a local insecticide intensity higher than average in a local region in central France, may explain why resistance was first reported there. Also, the presence of resistant homozygotes in the tested individuals suggests that the *kdr* allele is present at high frequency in these populations.

In conclusion, the resistance of *O. nubilalis* to pyrethroids in France seems to result from a combination of resistance mechanisms. First studies on insecticide resistance reported simple inheritance (Roush and McKenzie 1987) and semidominant expression of resistance (Holloway 1986). But in contrast, recent research suggests high evolutionary plasticity of resistance (Gao et al. 2012) and new genomics studies demonstrate the wide variety of genes involved in resistance (Faucon et al. 2015). This change is probably due to the lasting and widespread pesticide use allowing the accumulation of multiple mechanisms providing partial resistance to a broad spectrum of molecules. Understanding how these mechanisms are combined within populations or individuals is an essential subject for future research.

Acknowledgments

I would like to sincerely thank Sylvie Korownikoff for her work. My thanks also go to the reviewers for spending time reading and improving this manuscript.

Supplementary Data

Supplementary data are available at *Journal of Economic Entomology* online.

References Cited

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 275–277.
- Bohnenblust, E. W., J. A. Breining, J. A. Shaffer, S. J. Fleischer, G. W. Roth, and J. F. Tooker. 2014. Current European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, injury levels in the northeastern United States and the value of Bt field corn. *Pest Manag. Sci.* 70: 1711–1719.
- Bourguct, D., J. Chaufaux, M. Seguin, C. Buisson, J. L. Hinton, T. J. Stodola, P. Porter, G. Cronhohn, L. L. Buschman, and D. A. Andow. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1225–1233.
- Bouvier, J. C., T. Boivin, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51: 55–66.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–254.
- Bravo, A., S. Likitvatanavong, S. S. Gill, and M. Soberon. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol.* 41: 423–431.
- Brito, L. P., J.G.B. Linss, T. N. Lima-Camara, T. A. Belinato, A. A. Peixoto, J.B.P. Lima, D. Valle, and A. J. Martins. 2013. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* *kdr* Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS ONE* 8: e60878. doi:10.1371/journal.pone.0060878.
- Brun-Barale, A., J. Bouvier, D. Pauron, J. Berge, and B. Sauphanor. 2005. Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L. and development of a diagnostic test. *Pest Manag. Sci.* 61: 549–554.
- Busvine, J. R. 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* 168: 193–195.
- Caffrey, D. J., and L. H. Worthley. 1927. A progress report on the investigations of the European corn borer, Vol. 1476, U.S. Dept. of Agriculture, Washington, DC.
- Cassanelli, S., B. Cerchiarri, S. Giannini, D. Bizzaro, E. Mazzoni, and G. C. Manicardi. 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* 61: 91–96.
- Dykes, C. L., R.B.S. Kushwah, M. K. Das, S. N. Sharma, R. M. Bhatt, V. Veer, O. P. Agrawal, T. Adak, and O. P. Singh. 2015. Knockdown resistance (*kdr*) mutations in Indian *Anopheles culicifacies* populations. *Parasites Vectors* 8: 333. doi: 10.1186/s13071-015-0946-7.
- Farnham, A. W. 1977. Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. 1. knock-down resistance. *Pestic. Sci.* 8: 631–636.
- Faucon, F., I. Dusfour, T. Gaude, V. Navratil, F. Boyer, F. Chandre, P. Sirisopa, K. Thanispong, W. Juntarajumnonng, R. Poupardin, et al. 2015. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Res.* 25: 1347–1359.
- Foster, S. P., C. M. Woodcock, M. S. Williamson, A. L. Devonshire, I. Denholm, and R. Thompson. 1999. Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (*kdr*) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies. *B. Entomol. Res.* 89: 133–138.
- Franck, P., M. Reyes, J. Olivares, and B. Sauphanor. 2007. Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Mol. Ecol.* 16: 3554–3564.
- Franck, P., M. Siegwart, J. Olivares, J. F. Toubon, and C. Lavigne. 2012. Multiple Origins of the sodium channel *kdr* mutations in codling moth populations. *PLoS ONE* 7: e43543. doi:10.1371/journal.pone.0043543.
- Fuentes-Contreras, E., M. Reyes, W. Barros, and B. Sauphanor. 2007. Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *J. Econ. Entomol.* 100: 551–556.
- Gao, Q., M. Li, C. F. Sheng, J. G. Scott, and X. H. Qiu. 2012. Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Phys.* 104: 252–260.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41.
- Højland, D. H., K. M. Vagn Jensen, and M. Kristensen. 2014. A comparative study of P450 gene expression in field and laboratory *Musca domestica* L. strains. *Pest Manag. Sci.* 70: 1237–1242.
- Holloway, G. J. 1986. A theoretical-examination of the classical-theory of inheritance of insecticide resistance and the genetics of time to knockdown and dry body-weight in *Sitophilus-oryzae* (L.) (coleoptera, curculionidae). *B. Entomol. Res.* 76: 661–670.

- Huang, F., D. A. Andow, and L. L. Buschman. 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomol. Exp. Appl.* 140: 1–16.
- Hudon, M., E. J. LeRoux, and D. G. Harcourt. 1989. Seventy years of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) research in North America. *Agric. Zool. Rev.* 3: 53–96.
- Ingles, P. J., P. M. Adams, D. C. Knipple, and D. M. Soderlund. 1996. Characterization of Voltage-sensitive Sodium Channel Gene Coding Sequences from Insecticide-Susceptible and Knockdown-resistant House Fly Strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 319–326.
- Kranthi, K. R., D. Jadhav, R. Wanjari, S. Kranthi, and D. Russell. 2001. Pyrethroid resistance and mechanisms of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 94: 253–263.
- Liu, N., and J. G. Scott. 1998. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 531–535.
- Markussen, M. D. K., and J. M. Kristensen. 2012. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. *Pest Manag. Sci.* 68: 75–82.
- Naun, R., and N. Stumpf. 2002. Fluorometric microplate assay to measure glutathione S-transferase activity in insects and mites using monochlorobimane. *Anal. Biochem.* 303: 194–198.
- Reyes, M. 2007. La Résistance aux insecticides chez le carpocapse des pommes: Mécanismes, détection et variabilité géographique. PhD, University of Avignon Avignon.
- Reyes, M., and B. Sauphanor. 2008. Resistance monitoring in codling moth: A need for standardization. *Pest Manag. Sci.* 64: 945–953.
- Rinkevich, F. D., C. Su, T. A. Lazo, D. J. Hawthorne, W. M. Tingey, S. Naimov, and J. G. Scott. 2012a. Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (kdr) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest. Biochem. Physiol.* 104: 192–200.
- Rinkevich, F. D., S. M. Hedtke, C. A. Leichter, S. A. Harris, C. Su, S. G. Brady, V. Taskin, X. Qiu, and J. G. Scott. 2012b. Multiple Origins of kdr-type Resistance in the House Fly, *Musca domestica*. *PLoS ONE* 7: e52761. doi:10.1371/journal.pone.0052761.
- Robertson, J. L., N. Savin, H. K. Preisler, and R. M. Russell. 2007. *Bioassays with arthropods*, CRC Press.
- Roush, R. T., and J. A. McKenzie. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 361–380.
- Rozen, S., and H. Skaletsky. 1999. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers, pp. 365–386. *In* S. Misener and S. Krawetz (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols*, vol. 132. Humana Press.
- Sakuma, M. 1998. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* 33: 339–347.
- Sakyi, K. Y., B. Sarfo, C. A. Brown, M. D. Wilson, and D. A. Boakye. 2005. Investigation into the fitness cost of KDR insecticide resistance in *Anopheles gambiae* malaria vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 155–155.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotech.* 18: 233–234.
- Scott, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 757–777.
- Scott, J. G., and S. Kasai. 2004. Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. *Pest. Biochem. Physiol.* 78: 171–178.
- Showers, W. B., R. L. Hellmich, M. E. Derrick-Robinson, and W. H. Hendrix. 2001. Aggregation and dispersal behavior of marked and released European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) adults. *Environ. Entomol.* 30: 700–710.
- Siegiwart, M., J. B. Thibord, S. Maugin, R. Doucet, and Y. Flodrops. 2012. Premier cas de résistance de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) à la lambda cyhalothrine (pyréthrine). *Phytoma* 658: 3.
- Soderlund, D. M., and D. C. Knipple. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563–577.
- Stodola, T. J., D. A. Andow, A. R. Hyden, J. L. Hinton, J. J. Roark, L. L. Buschman, P. Porter, and G. B. Cronholm. 2006. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States corn belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 502–507.
- Thalavaisundaram, S., M. A. Wilkes, S. Mansfield, H. A. Rose, and G. A. Herron. 2012. Esterases and glutathione S-transferases contribute to pyrethroid resistance in western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Aust. J. Entomol.* 51: 272–278.
- Thibord, J. 2009. Ravageurs du maïs: Les foreurs sous haute surveillance. *Perspectives Agricoles* 361: 61–65.
- Thomas, Y., M. T. Bethenod, L. Pelozuelo, B. Frerot, and D. Bourguet. 2003. Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner. I. sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution* 57: 261–273.
- Ulrich, V., and P. Weber. 1972. The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes: A direct fluorometric test. *Physiol. Chem.* 353: 1171–1177.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex (R)100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–513.
- Williamson, M., D. Martinez-Torres, C. A. Hick, and A. L. Devonshire. 1996. Identification of the mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid resistance. *Mol. Genet. Genom.* 252: 51–60.
- Yu, S. J., and S. N. Nguyen. 1992. Detection and biochemical-characterisation of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pest. Biochem. Physiol.* 44: 74–81.
- Zimmer, C. T., and R. Nauen. 2011. Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pest. Biochem. Physiol.* 100: 264–272.

Discussion

La résistance des insectes ravageurs aux insecticides est une problématique persistante en agriculture, une meilleure connaissance de ces phénomènes peut aider la recherche agronomique dans ses choix stratégiques de développement de méthodes de luttés, ainsi que les acteurs agricoles dans leurs utilisations des (bio)pesticides ; mais aussi apporter des connaissances en recherche fondamentale pour aller vers une compréhension de certains mécanismes évolutifs. Les questions abordées dans ce premier chapitre visent tout d'abord à détecter de nouvelles résistances, élucider les mécanismes sous-jacents et leurs combinaisons. Les deux études que nous avons menées offrent deux exemples de résistance qui combinent modification des capacités de détoxification et des cibles moléculaires. La mise en évidence de l'accumulation de mécanismes différents parmi les populations de ces deux espèces de

lépidoptères illustre la diversité et la complexité des gènes potentiellement impliqués dans la résistance.

Le coût de chaque mécanisme fait varier les combinaisons parmi les populations

Le fait d'avoir détecté différentes combinaisons de mécanismes chez des populations même proches géographiquement et entre sexes, laisse supposer l'existence de multiples mécanismes de résistance se combinant entre eux en étant plus ou moins favorisés par la pression de sélection et par le jeu des coûts physiologiques de chacun de ces mécanismes. Il y aurait donc un coût trop important à l'accumulation de tous les mécanismes dans une seule population en faveur d'une diversité étonnante de mécanismes co-existants dans une zone géographique relativement étroite. L'accumulation de tous ces mécanismes peut être attribuée au long historique de l'utilisation des pesticides qui sélectionne depuis les années 50 des mosaïques de gènes. De telles combinaisons de différents mécanismes de résistance, dont la mutation *kdr* et différents gènes ou facteurs de transcription de la MFO, ont été trouvées dans quatre souches de mouches domestiques résistantes à la perméthrine, un pyrèthrianoïde (Scott and Kasai 2004).

Des analyses additionnelles du jeu de données présenté dans la deuxième publication ont permis de tracer une ACP apportant des informations supplémentaires sur ce point (Figure 19). Bien que les axes de projection de cette analyse représentent plus de 83% de la variance totale, aucune structuration des individus n'est visible entre génotypes au locus *kdr*, alors que ce nuage de points est très structuré lorsque l'on y identifie les sexes (données non présentées). Cette observation va dans le sens d'une absence de corrélation négative entre détoxification et mutation de cible. Il semble que les activités MFO et les deux autres familles enzymatiques (EST et GST) sont indépendantes et la mutation *kdr* est aussi bien présente parmi les individus ayant de fortes comme de faibles activités de détoxification.

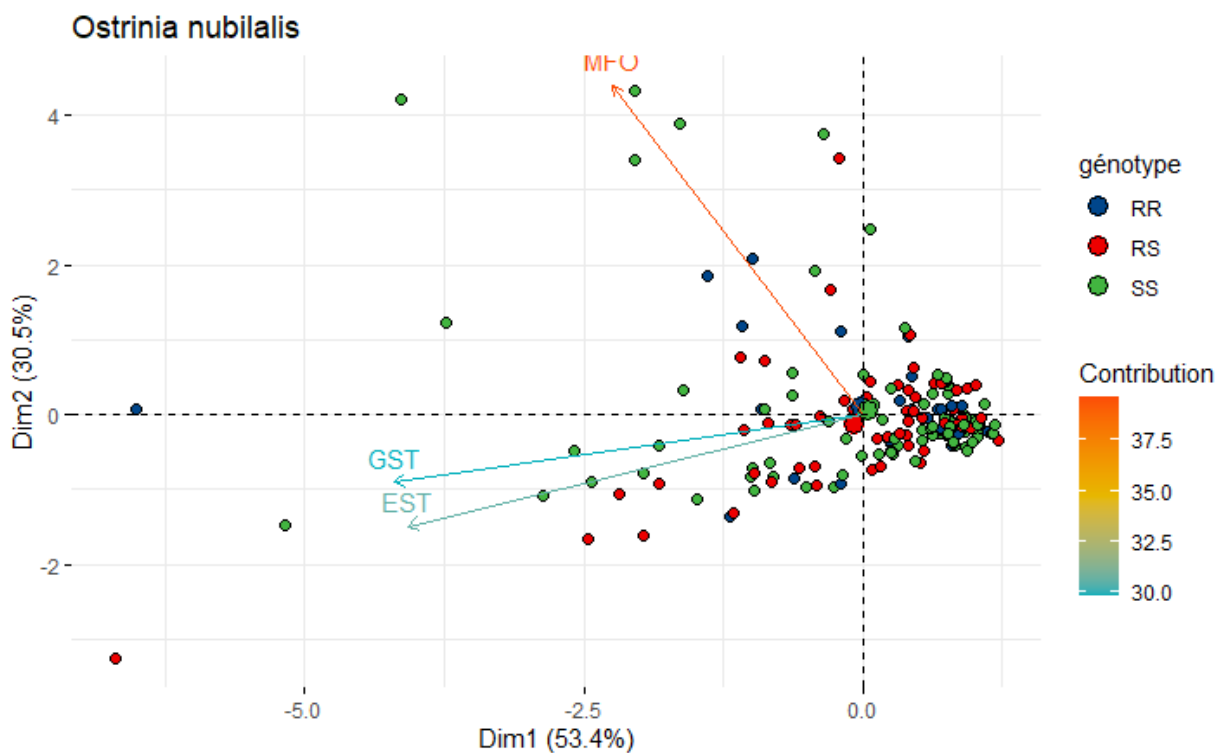


Figure 19 : Diagramme d'une analyse en composante principale des données d'activité enzymatiques MFO, GST et EST en fonction des génotypes au locus *kdr* dans les populations d'*O. nubilalis* présentées dans le deuxième article. La contribution est exprimée en % plus sa valeur est importante, plus la variable contribue à la composante principale.

Cette observation est cohérente avec une étude menée sur *C. pomonella*, un autre lépidoptère ravageur. En effet, dans leur publication Franck *et al.* ont dosé les activités MFO et recherché la présence de la mutation *kdr* dans des populations de cet insecte réparties dans le monde. Ils ont montré que les activités MFO étaient corrélées au nombre de traitements insecticides. L'hypothèse avancée pour expliquer cela était l'existence d'un fort coût réduisant les activités MFO en absence de traitement. Quant à la mutation *kdr*, elle n'a été détectée que dans deux pays mais à très forte fréquence même en absence de traitement. Ce schéma différent de celui des MFO pourrait être la conséquence d'un coût très faible (Franck, Reyes *et al.* 2007). Le faible coût pléiotrope de la mutation *kdr* est connu chez d'autres espèces d'insectes (Foster, Woodcock *et al.* 1999; Sakyi, Sarfo *et al.* 2005; Brito, Linss *et al.* 2013).

Origine des mécanismes de résistance

La présence d'un coût à l'activité MFO et l'absence de coût associé à la mutation *kdr* se prêtent bien à nos observations sur *O. nubilalis*, et pour aller encore plus loin dans la suite de l'étude de ces mécanismes de résistance nous avons génotypé sur 6 années (2012-2017) 2106 individus issus de 58 populations réparties sur le territoire français. La méthode utilisée était celle développée dans le deuxième article. Les résultats d'analyse montrent la présence de la mutation *kdr* dans deux zones bien délimitées au centre de la France et en Lorraine ainsi que quelques occurrences dans le sud-ouest (Figure 20).

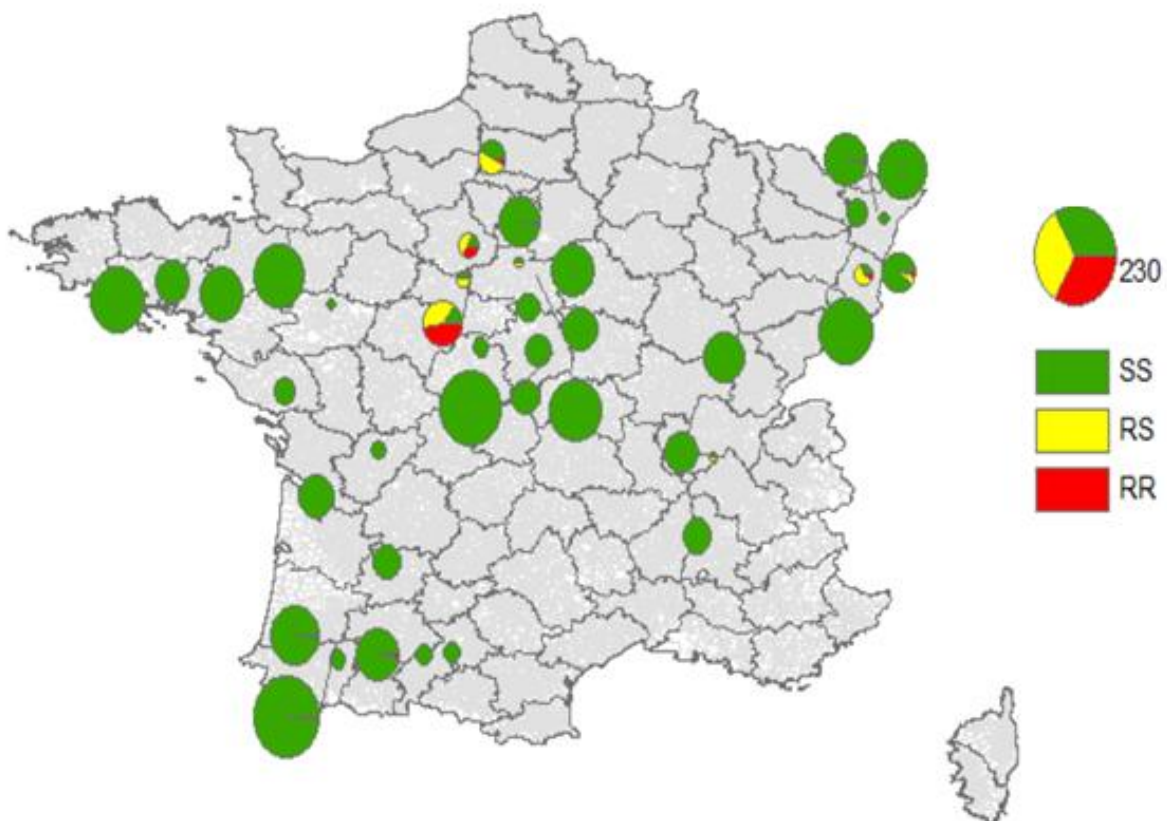


Figure 20 : Répartition géographique de la mutation *kdr* dans 58 populations d'*O. nubilalis* sur 2106 individus sur la période 2012-2017 sur le territoire français.

Là encore un parallèle peut être fait avec ce qui a été observé chez *C. pomonella* (Franck, Reyes *et al.*

2007). Dans notre étude, la mutation *kdr* a été trouvée dans des zones distantes de 900 km, or *O. nubilalis* n'est pas connue pour avoir une grande mobilité (Showers, Hellmich et al. 2001). Une telle distribution suggère que l'évènement de mutation a eu lieu il y a longtemps et s'est propagé, ou que plusieurs évènements de mutation indépendants ont eu lieu, l'une n'excluant pas l'autre. La première hypothèse est possible car les pyréthriinoïdes sont utilisés depuis plusieurs décennies. Cependant, la seconde m'apparaît plus plausible car les populations dans l'Est de la France porteuses de la mutation, ne sont pas susceptibles d'échanger des gènes avec les autres car il s'agit d'une race monovoltine stricte présentant un isolement génétique (Thomas, Bethenod et al. 2003). Des apparitions multiples de la mutation *kdr* dans différents endroits et liées à différents évènements génétiques ont été signalées chez d'autres espèces de ravageurs (Lynd, Weetman et al. 2010; Franck, Siegwart et al. 2012; Rinkevich, Hedtke et al. 2012a; Rinkevich, Su et al. 2012b). Cette hypothèse irait dans le sens d'une origine multiple *de novo* de cette mutation (c'est-à-dire postérieure à l'utilisation des pyréthriinoïdes, cf. paragraphe D. de l'étude bibliographique) avec une répartition géographique bien délimitée, contrairement à ce que l'on observe pour la détoxication qui apparaît particulière à chaque individu et semble plutôt avoir une origine de type variation continue d'après sa répartition géographique et sa complexité. Ces deux origines différentes de la résistance ont déjà été observées chez une autre espèce *Lucilia cuprina* devenue résistante à des OPs (Hartley, Newcomb et al. 2006).

Quelle part a chaque mécanisme dans la résistance ?

Il serait intéressant d'évaluer la part de chacune de ces familles enzymatiques et de *kdr* dans le phénotype et de déterminer s'ils sont antagonistes ou synergiques. Dans la plupart des cas identifiés par Hardstone et Scott dans leur revue, les mécanismes de résistances sont synergiques à l'état homozygote ou additifs à l'état hétérozygote (Hardstone and Scott 2010). Les études menées ici ne nous permettent pas de conclure sur ce point mais la deuxième étude semblerait montrer que *kdr* à l'état hétérozygote ou homozygote n'est pas antagoniste à une suractivité GST, EST ou MFO. Chez plusieurs espèces la mutation *kdr* est responsable de résistances à faibles niveaux quant elle n'est pas associée à *super-kdr* ($RR \sim 10$) (Rinkevich, Du et al. 2013). *Super-kdr* n'a pas été trouvée dans les populations testées dans notre étude. Dans la population « Labosse » d'*O. nubilalis* testée ici nous n'avons pas détecté de détoxication accrue alors qu'un rapport de résistance à la lambda-cyhalothrine de 12 a été mesuré. Le génotypage a posteriori de 26 individus de cette population a révélé 13 hétérozygotes, 2 homozygotes résistants et 11 homozygotes sensibles. La mutation *kdr* y est donc présente (sans que l'on ne connaisse son niveau de dominance), et le rapport de résistance est du même ordre de grandeur que celui que Rinkevich *et al.* observent chez des individus porteurs de *kdr* d'une autre espèce d'insecte (Rinkevich, Du et al. 2013). Il est donc possible que *kdr* confère des faibles niveaux de résistance qui soient améliorés par tout un panel d'autres mécanismes. Il faudrait faire appel à des expérimentations incluant des backcross avec des individus sensibles pour pouvoir ségréger les allèles responsables des différents mécanismes de résistances et pouvoir déterminer rigoureusement la part de chacun dans ce phénomène comme l'ont entrepris Cattel et al. (Cattel, Faucon et al. 2020). Déterminer le niveau de dominance de l'allèle *kdr* chez *O. nubilalis* serait également utile pour mieux interpréter les interactions entre mécanismes et la part de chacun dans le phénotype. Souvent considérée comme récessive (Soderlund and Knipple 2003), cette mutation s'est avérée être dominante dans certains cas (Bass, Puinean et al. 2014). Cette propriété doit donc aussi être réévaluée pour chaque espèce testée.

Résistance croisée

L'étude sur *O. nubilalis* a confirmé la résistance croisée présumée à la lambda-cyhalothrine et à la deltaméthrine dans le centre de la France. Des résistances croisées ont souvent été décrites entre les substances actives de la famille des pyréthriinoïdes, quel que soit le mécanisme impliqué (Zimmer and

Nauen 2011; Dykes, Kushwah et al. 2015). Dans notre étude, la résistance à la deltaméthrine n'est pas aussi élevée que celle à la lambda-cyhalothrine, (RR le plus élevé = 7,67 par rapport au RR = 63,79 respectivement) mais elles sont fortement corrélées entre-elles, ce qui est caractéristique d'une résistance croisée. Une seule population, celle d'Epieds en Beauce, ne suit pas ce schéma laissant penser que les mécanismes en jeu y sont différents des autres populations.

Le sexe un facteur de différenciation pour la résistance

L'un des résultats original de ces deux études réside dans le fait que des enzymes de détoxification potentiellement impliquées dans la dégradation de ces substances actives diffèrent entre sexes (Figure 2 du premier article et Tableau 3 du second). Le rôle des enzymes MFO dans la résistance aux pyréthroïdes a été observé chez d'autres espèces (Scott 1999; Zimmer and Nauen 2011; Gao, Li et al. 2012) et l'expression différentielle des MFO entre les sexes est fréquente (Hojland, Jensen et al. 2014). Cependant, l'expression différentielle a rarement été liée à des différences de résistance aux insecticides (Markussen and Kristensen 2012). Comme les sexes n'ont pas pu être différenciés dans nos biotests, nous ne pouvons pas conclure sur ce point pour nos modèles biologiques. Chez les lépidoptères la détermination du sexe fonctionne sur un système ZZ/Zw, les femelles sont hétérogamétique (Zw) et les mâles homogamétiques (ZZ) (Traut, Sahara et al. 2007). Le chromosome Z est le plus long il est potentiellement porteur de nombreux gènes de détoxification qui pourraient expliquer en partie ces divergences. Par exemple chez le carpocapse des pommes (*C. pomonella*) nous avons identifié sept gènes de détoxification sur ce chromosome : 4 CYP, 1 carboxylestérase, 1 catalase et 1 sulfotransférase (chapitre 3).

Niveau de résistance, pression de sélection et problèmes aux champs

L'intervalle étonnamment long entre la première utilisation de pyréthrinoïdes et le signalement de la résistance sur le terrain d'*O. nubilalis* pourrait être dû à une faible pression de sélection globale dans les champs de maïs. La surface traitée est relativement petite en France, avec actuellement un hectare sur six traités en raison des faibles niveaux de dégâts. La fréquence de traitement est limitée à 1 ou 2 applications par an en France. En outre, *Ostrinia nubilalis* est polyphage, plus de 224 espèces de plantes ont été enregistrées comme hôtes par Hodgson en 1928 (Hodgson 1928). Elle peut donc vivre dans des zones non traitées, formant ainsi un réservoir d'individus sensibles. Ce paysage agricole mixte facilite les déplacements de ce ravageur entre zones refuges et cultures de maïs. Cela a peut-être pour effet de diluer la résistance, rendant la lutte chimique plus durable, même si elle est uniquement réalisée avec des pyréthrinoïdes.

Nous avons observé chez la pyrale du maïs des niveaux de résistance suffisamment élevés pour poser des problèmes aux champs contrairement à la tordeuse orientale du pêcher qui présente des rapports de résistance plus faibles. Les niveaux d'activité des enzymes de détoxification sont plutôt faibles aussi dans la première étude, ne dépassant jamais deux fois la référence. Comparativement, la résistance de cet insecte au carbofuran (carbamate) atteint un rapport de 25 fois dans des populations canadiennes (Kanga, Pree et al. 1997) qui a été associée à une augmentation de près de 4 fois de l'activité EST (substrat α -NA) et à une diminution de 1757 fois de la sensibilité de la cible moléculaire sans qu'aucune altération des activités MFO et GST ne soit mise en évidence. Cette tendance à la diminution des niveaux de résistance à l'échelle mondiale en comparaison de ce qui était publié dans les années 80/90 est peut-être un marqueur des changements de pratiques vers des substances actives plus spécifiques et moins rémanentes (cf. paragraphe D de l'étude bibliographique). Les premières études sur la résistance aux insecticides ont fait état d'une transmission simple (Roush and McKenzie 1987) et d'une expression semi-dominante de la résistance (Holloway 1986). Les recherches récentes suggèrent une évolution de ce déterminisme génétique vers une plasticité évolutive plus élevée (Gao, Li et al. 2012). Et

de nouvelles études de génomique démontrent la grande variété de gènes impliqués dans ces phénomènes (Ranson, Claudianos et al. 2002; Oakeshott, Home et al. 2003; Faucon, Dusfour et al. 2015; Meisel and Scott 2018). Cette évolution est probablement due à une modification des pressions de sélections au cours des dernières décennies, passant d'insecticides ayant le même mode d'action, à larges spectres et rémanent vers des substances insecticides à faible spectre d'action utilisées en alternance. Ces bonnes pratiques jouent plutôt en faveur d'une accumulation de multiples mécanismes, conférant chacune des résistances partielles moins marquées mais plus polyvalentes. L'accumulation de mécanismes divers pose la question de l'existence d'éventuelles préadaptations à de futures méthodes de lutte contre des ravageurs.

CHAPITRE 2 : Durabilité (durée d'efficacité) des bioinsecticides

Les bioinsecticides d'origine naturelle sont constitués de molécules ou d'organismes déjà existants dans la nature. Des insectes ravageurs peuvent donc avoir co-évolué à leur contact comme cela a par exemple été le cas pour des sous-espèces de *M. persicae* se nourrissant sur tabac et ayant développé des résistances à la nicotine (Singh, Troczka et al. 2020). Bien que l'on s'attende à ce que les résistances soient plus longues à se mettre en place grâce à des modes d'action plus complexes et variés (Curtis 1985; Mani 1985; Tabashnik 1992; Tabashnik 1994), ce phénomène pourrait se reproduire pour d'autres bioinsecticides limitant ainsi leur durabilité. Dans les faits, l'utilisation de plus en plus fréquente de biopesticides conduit à l'apparition de résistance malgré des modes d'action souvent plus complexes que les insecticides de synthèse (Siegwart, Graillot et al. 2015). Dans ce chapitre, j'apporterai des éléments de réponse sur (i) l'existence d'une préadaptation chez différentes espèces de pucerons dont *Myzus persicae* dans l'acquisition d'une résistance à une substance naturelle aphicide, (ii) les caractéristiques d'une résistance à un bioinsecticide viral à base de CpGV chez *Cydia pomonella*. Ce chapitre posera donc deux questions qui touchent à la durabilité des méthodes de biocontrôle. J'utiliserai les données présentées ou en cours de publication suivantes : (Siegwart, Graillot et al. 2013; Siegwart, Lecerf et al. 2019; Siegwart, Sauge et al. In prep)

Chapitre 2.1 : Risques d'adaptation de pucerons aux acides 3,5-di-caféoyl quinique et tartrique (3,5-diCQ et diCT) et processus de métabolisation de ces molécules par ces insectes

Les recherches menées sur cette question ont été réalisées dans le cadre du WP3 du projet DicaBio (2016-2020), financé par le plan écophyto PSPE2 avec comme objectif d'enrichir la gamme des produits disponibles comme solutions de biocontrôle. Les personnes qui ont participé à ce travail sont : Jean-Luc Poessel (DR) ; Mathilde Salette (stage IUT) ; Antoine Blot (stage M1) ; Elodie Lecerf (TR) et Odile Mascle (TR).

Introduction

Notre objectif était de valoriser des substances naturelles botaniques comme biopesticides qui sont actuellement sous-exploitées commercialement. INRAE détient deux brevets sur la production et l'utilisation de molécules naturelles issues de plantes, l'acide 3-5dicaféoylquiniques (3,5-diCQ) et l'acide dicaféoyltartriques (acide chicorique, diCT), pour la lutte contre les pucerons, insectes ravageurs majeurs de nombreuses cultures (Poessel, Collet et al. 2014). Les 3,5-diCQ et diCT appartiennent à un groupe de composés phénoliques dérivés de l'acide caféique, présentant la particularité de posséder deux résidus de cet acide liés à un acide organique, l'acide quinique (3,5-diCQ) ou l'acide tartrique (diCT). Ils ont des propriétés aphicides par ingestion uniquement, confirmées sur plusieurs espèces de pucerons dont *Myzus persicae* (Poessel, Collet et al. 2014). Ces composés, identifiés chez de nombreuses espèces d'intérêt agronomique de consommation courante, patates douces, chicorée, endive, semblent dénués d'effets négatifs connus pour la santé et l'environnement (Poessel, Collet et al. 2014). Nous avons donc poursuivi des actions de valorisation des 3,5-diCQ et diCT comme outils de

biocontrôle. L'un des objectifs de recherche plus fondamentale, mais ayant tout de même une sortie très appliquée, est de pouvoir anticiper, en raison des grandes capacités d'adaptation des pucerons aux xénobiotiques, les contournements potentiels de la protection offerte par les 3,5-diCQ/diCT vis-à-vis de ces insectes.

Dans un premier temps, nous avons choisi de focaliser nos recherches sur l'espèce de puceron *Myzus persicae* qui est un ravageur d'importance mondiale, fortement polyphage. Dans les régions tempérées, il peut être holocyclique diécique, c'est-à-dire qu'il a un hôte primaire : le pêcher sur lequel il pond des œufs issus d'une reproduction sexuée qui donneront naissance en avril aux fondatrices, parthénogénétiques vivipares. Trois générations parthénogénétiques vont ensuite se suivre sur pêcher (comportant des formes ailées et/ou aptères) à l'issue de quoi des formes ailées uniquement seront produites pour disperser vers les hôtes secondaires (entre mi-mai et mi-juin). Les formes sexupares ailées apparaissent de début septembre à fin novembre et retournent sur les pêchers pour y engendrer les femelles sexuées. Les mâles eux sont produits sur les plantes secondaires à la même période, forçant ainsi un brassage génétique entre populations. Cependant, certains clones sont capables de se reproduire uniquement par parthénogenèse toute l'année. Cela se produit en l'absence de l'hôte primaire dans la zone géographique proche et en absence d'épisode de gel (les œufs sont les seules formes capables de résister au froid) (Guillemaud, Mieuzet et al. 2003). Il existe aussi des clones dont la reproduction est entièrement asexuée bien que l'hôte primaire soit présent dans la même zone géographique. Ces deux types clones cohabitent sans pouvoir se croiser, cependant des flux de gènes horizontaux ont été décrits entre eux (Margaritopoulos, Malarky et al. 2007). Les clones de *M. persicae* se développant sur tabac sont connus pour être différents des autres clones de par leur morphologie, leur couleur et leur asexualité toute l'année. Ils ont été renommés *M. persicae nicotianae* par Blackman (Blackman, Malarky et al. 2007).

L'espèce *M. persicae* dispose d'une très grande capacité d'adaptation aux insecticides. Ainsi, elle a développé des résistances à plus de principes actifs que n'importe quelle autre espèce d'insectes connue (Silva, Jander et al. 2012; Bass, Puinean et al. 2014). Les capacités d'adaptation du genre *Myzus* résultant en une résistance aux insecticides peuvent être classées en trois catégories. La première est la réduction de l'absorption de l'insecticide par la réduction de la perméabilité de la cuticule. La deuxième est la détoxification de la matière active via la variation de certaines activités enzymatiques à l'origine de l'excrétion ou la chélation de l'insecticide. La troisième consiste en une perte d'affinité des insecticides sur leurs cibles moléculaires par mutations de leurs gènes (Bass, Puinean et al. 2014). Dans la littérature, quatre mutations de cibles moléculaires ont été décrites (*kdr*, *super-kdr*, *MACE* et *Rdl*), une surproduction des carboxylestérases E4 ou FE4 induit une résistance croisée aux OPs et pyréthriinoïdes et dans une moindre mesure aux carbamates, et une surproduction de la CYP6CY3 confère des résistances aux néonicotinoïdes et à la nicotine (Bass, Puinean et al. 2014). Etant donné les propriétés des diCT et 3,5-diCQ (toxiques par ingestion, absents du marché des pesticides, et avec une cible moléculaire probablement nouvelle), notre hypothèse était que la détoxification est le mécanisme de résistance croisée le plus probable dans d'éventuelles résistances à ces molécules (Singh, Troczka et al. 2020).

Pour tester cette hypothèse nous avons recherché dans la variabilité aphidienne naturelle des pucerons susceptibles de présenter une préadaptation à l'action toxique des 3,5-diCQ/diCT. Nous avons d'une part exploré la variabilité naturelle de *Myzus persicae* puis celle d'autres espèces de pucerons. Pour aborder ce second point, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle des espèces de pucerons éventuellement préadaptées pourraient être inféodées à des plantes naturellement riches en diCT et 3,5-diCQ. Enfin le type d'alimentation est un facteur de variation de l'expression de nombreux gènes

importants chez les insectes (cf. paragraphe C.d sur l'épigénétique et les facteurs de transcription de l'étude bibliographique). Une étude a même démontré qu'après seulement 2 générations sur une nouvelle plante hôte riche en métabolites secondaires, les activités et isoformes de GST étaient modifiées chez *Myzus persicae* (Egaas, Svendsen et al. 1991). Les mécanismes sous-jacents à ces adaptations peuvent être d'ordre épigénétique, post-transcriptionnel ou simplement régulé par des facteurs de transcription. Le diCT et 3,5-diCQ étant naturellement présents dans certaines plantes nous voulions tester si ce type d'adaptation de *M. persicae* au 3,5-diCQ est possible par le biais de son alimentation.

D'un point de vue plus général, lorsque les organismes vivent dans des environnements sous-optimaux, la gestion du stress a un coût en termes de ressources métaboliques, ce qui entraîne une diminution des composants de stockage (glucides, lipides et protéines) (De Coen, Janssen et al. 2000), de plus, l'état de santé des animaux, et donc leur capacité à répondre à un stress est corrélé à la taille des individus (Schmidt-Nielsen, 1984). Nous avons donc également testé s'il existe une relation entre tolérance aux diCT/3,5-diCQ et un marqueur de taille et de réserves énergétiques des individus : leur quantité de protéines totales.

Hypothèses de travail

- L'espèce *Myzus persicae* étant très polyphage et multi-résistante à des insecticides de synthèse et à la nicotine, il existe des résistances croisées pré-existence dans les populations sauvages impliquant des enzymes de détoxification entre des insecticides de synthèse et 3,5-diCQ/diCT.
- Les clones de pucerons les plus riches en protéines tolèrent mieux les 3,5-diCQ/diCT.
La présence dans l'environnement de diCT et 3,5-diCQ naturels a pré-adapté certaines espèces de pucerons à leur résister.
- Un clone sensible de *M. persicae* peut rapidement développer des résistances au 3,5-diCQ après 10 générations passées sur des plantes riches en cette substance.

Matériels et méthodes

Matériel biologique : pucerons et plantes

Populations et souches de M. persicae provenant du pêcher

Nous avons prélevé des foyers naturels de *Myzus persicae* se nourrissant sur leur hôte primaire le pêcher, qui contient du 3,5-diCQ. 7 populations sauvages issues de colonies et cinq souches de laboratoire ont été testées. Le détail des informations concernant ces populations/souches est recensé dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Liste des populations/souches de *Myzus persicae* testées pour leur sensibilité au diCT.

Nom	Particularités/traitements insecticides utilisés dans les parcelles de prélèvement.	Localisation d'origine	Mode d'acquisition
Souches de laboratoire			
Témoin (Mp06)	Sensible aux insecticides	Vaucluse (84)	Collection INRAE Avignon
Resistant	Résistante aux organophosphorés et pyréthriinoïdes par surproduction de carboxylestérases E4 et mutation <i>kdr</i>	Rothamsted Research (UK)	Collection INRAE Sophia
11.037.001	Résistante aux néonicotinoïdes et pyréthriinoïdes- prélevé en 2011	Saint-Martin-de-Crau (13)	Anses Lyon
12.068.006	Résistante aux néonicotinoïdes et pyréthriinoïdes – prélevé en 2012	Beaumont-Montoux (26)	Anses Lyon
13.001.045	Hautement résistante aux néonicotinoïdes, organophosphorés et pyréthriinoïdes – prélevé en 2013	Bésayes (26)	Anses Lyon
Populations sauvages			
Barbentane	Traitement à l'azadirachtine (Bio)	Barbentane (13)	Campagne de terrain INRAE
Jonquière	Traitement avec acétamipride (famille des néonicotinoïdes)	Jonquières (84)	Campagne de terrain INRAE
Chanas	Traitements huile de paraffine (traitement flonicamide en n-1)	Chanas (38)	Campagne de terrain INRAE
Sylvana	2 traitements huile de paraffine, 1 traitement acétamipride (néonicotinoïde), 1 traitement flonicamide (modulateurs des organes chordotonaux)	St Gilles (30)	Campagne de terrain INRAE
Gotheron	Traitement à l'huile de paraffine	Châteauneuf sur Isère (26)	Campagne de terrain INRAE
St Paul Vert	Traitement à l'huile de paraffine	Montfavet (84)	Campagne de terrain INRAE
St Paul Rose	Traitement à l'huile de paraffine	Montfavet (84)	Campagne de terrain INRAE

Parmi les souches, trois sont résistantes à différentes familles d'insecticides de synthèse : organophosphorés, pyréthriinoïdes et néonicotinoïdes. Elles nous ont été fournies par Benoit Barres de l'Anses de Lyon (Unité Casper) dans le but de rechercher d'éventuels cas de résistances croisées entre des insecticides de synthèse et 3,5-diCQ/diCT. Ce sont les souches 11.037.001, 12.068.006 et 13.001.045 qui ont été prélevées sur le terrain respectivement en 2011, 2012 et 2013, soit 6, 5 et 4 ans avant notre étude. A l'Anses, elles étaient élevées en masse sur plants de choux chinois (*Brassica rapa*, subspecies *chinensis*) en repiquant environ 8 femelles aptères parthénogénétiques à chaque génération. A réception de ces souches à Avignon des femelles aptères ont été placées sur poivron doux (*Capsicum annuum*) pour ponte en vue de leur mise en élevage. Ce changement d'hôte a été motivé par le fait que le piment doux ne contient ni 3,5-diCQ, ni diCT, et est pauvre en métabolites secondaires susceptibles d'opérer une pression de sélection sur les enzymes de détoxification contrairement au chou chinois (Egaas, Svendsen et al. 1991). Cette acclimatation induisant des pertes nous avons augmenté nos chances de succès en mettant à réception des souches le plus grand nombre de femelles aptères disponibles sur un plant de poivron. Une fois acclimatées elles ont été élevées en masse sur 2 plants de poivrons doux (*Capsicum annuum*) en parallèle, avec repiquage tous les 20 jours de 10 femelles aptères/plants dans les conditions de photopériode longue (16h J/8h N) à 21 °C dans des enceintes climatiques sous surveillance. Chaque plant a été individuellement ensaché pour éviter les mélanges. Les cohortes de 24h nécessaires aux tests ont été réalisées en plaçant sur une nouvelle plante 25 femelles par plant pendant 24h pour obtenir en moyenne 50 larves L1 du même âge à +/- 24h près. Les informations sur les géotypes et phénotypes de ces trois souches sont données dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Génotypes et phénotypes des trois souches de *M. persicae* fournies par l'Anses de Lyon avec ces informations.

Culture d'origine	Nouvel identifiant (renommé en 2015)	Pyréthroïdes		Carbamates	Mutation R81T [génotype]	Néonicotinoïdes			
		Mutation Kdr	Mutation SuperKdr [génotype]	Mutation MACE		Phénotype (tests biologiques)			
						Imidaclopride		Thiachlopride	
DL50 (ng/mL)	RR	DL50 (ng/mL)	RR						
Pêcher	11-037-001	RS	[MT]	absent	[RR]	199,8	5	876	10
Pêcher	12-068-006	RR	[TT]	absent	[RT]	274,3	7	1118,9	13
Pêcher	13-001-045	SS	[ML ^{bis}]	RS	[TT]	16808	410	15410	179

Ces trois souches sont résistantes aux néonicotinoïdes. 11-037-001 ne porte cependant pas la mutation R81T dans la cible de cette famille d'insecticides : le canal nicotinique à acétylcholine (nAChR). Il est donc possible qu'elle résiste grâce à une activité de détoxification accrue (Puinean, Foster et al. 2010). 12-068-006 et 13-001-45 sont porteuses de la mutation de cible à l'état hétérozygote et homozygote respectivement. La première est moins résistante que la seconde ce qui va dans le sens de la semi-récessivité de cet allèle décrite par Mottet *et al.* (Mottet, Fontaine et al. 2016). Nous n'avons pas d'information sur les activités enzymatiques des individus de ces populations, cependant, l'accumulation de mutations dans les cibles moléculaires de différentes familles d'insecticides laisse penser que ces populations ont subi un long historique de pression de sélection durant lequel elles ont probablement enrichi leurs capacités de détoxification.

Deux autres souches de laboratoire sont testées. La référence sensible aux insecticides élevée au laboratoire depuis 2008 sans pression de sélection insecticide dénommée «Mp06» (témoin) est issue d'une seule femelle aptère provenant d'un verger expérimental non traité (Sauge, Poëssel et al. 2011). Il s'agit donc également d'une souche clonale. Elle a été maintenue en masse sur plants de pêchers entre 2008 et 2015, puis sur plants de poivron doux jusqu'à aujourd'hui. La souche «resistant» correspond au clone 794J connu pour être résistant à des organophosphorés et pyréthroïdes grâce à une amplification génique de la carboxylestérase E4 et à la mutation *kdr* (van Emden, Foster et al. 2014). Cette souche d'origine anglaise (Rothamsted Research) nous a été fournie par Thierry Fricaux d'INRAE Sophia-Antipolis. Elle est connue pour avoir un fitness général faible (van Emden, Foster et al. 2014). En Angleterre et à l'INRA de Sophia, cette souche était maintenue en élevage de masse sur plants de chou chinois (*Brassica rapa*, subspecies *chinensis*). Des analyses microsatellites de l'équipe anglaise ont montré que cette souche est clonale (van Emden, Foster et al. 2014). Dans notre laboratoire nous avons maintenu cette souche sur plant de poivron doux (*Capsicum annuum*) dans les mêmes conditions que toutes les autres.

En 2017, sept populations sauvages ont été prélevées par nos soins en verger de pêchers commerciaux dans la vallée du Rhône sur des pousses ne présentant pas le symptôme typique de l'enroulement des feuilles provoqué par le puceron cigarier (*Myzus varians*) pour éviter la confusion. J'ai observé les femelles aptères sous loupe binoculaire avant leur mise en élevage pour m'assurer qu'il s'agissait bien de *M. persicae* (cornicules vertes) et non de *M. varians* (cornicules avec les extrémités noires). Des femelles aptères de *M. persicae* provenant d'une pousse infestée par verger ont été placées séparément sur des plants de poivrons doux afin de les acclimater sur ces plantes. La diversité génétique intrapopulationnelle de ces populations est théoriquement faible, puisqu'une colonie est souvent clonale lorsque l'infestation aphidienne n'est pas importante dans le verger ce qui était notre cas.

Souches de *M. persicae* provenant du tabac

En 2018 nous avons étendu notre recherche de clones de *M. persicae* potentiellement résistants au diCT et 3,5-diCQ en testant des souches provenant de culture de tabac. En effet, la capacité d'adaptation développée par ces individus pour se nourrir sur une culture riche en nicotine, un autre composé naturellement insecticide, leur confère des résistances à des insecticides de synthèse via de la détoxification (Singh, Troczka et al. 2020). Pour cela, nous avons estimé la sensibilité de 3 souches provenant de cultures de tabac ici nommées T1.33B, T2.23AC et T3.4B qui nous ont été transmises par Christophe Plantamp de l'Anses de Lyon (Unité Casper). Les phénotypes de ces populations ne sont pas connus. Cependant, T1.33B et T3.4B sont hétérozygotes au niveau de la mutation MACE et homozygotes sensibles au niveau de la mutation R81T dans nAChR. T1.33B a été échantillonnée le 27/06/17 à Eymeux (26) et T3.4B le 21/06/17 à Lapeyrouse Mornay (26). T2.23AC est homozygote sensible au niveau des deux mutations de cibles MACE et R81T. Elle a été échantillonnée sur tabac le 07/07/17 à Saint Sorlin en Valloire (26).

Ces souches ont été créées à partir d'une seule femelle parthénogénétique chacune, elles sont donc présumées clonales. Avant les expérimentations présentées ici, nous avons génotypé 8 individus de chacune de ces 3 souches et de la souche sensible de référence MP06 sur 4 microsatellites très polymorphes et d'après nos résultats ces souches sont clonales et pures (aucune diversité intrasouche n'est visible, mais toutes les souches sont différentes entre elles) dans la limite de notre sensibilité de détection.

Autres espèces de pucerons testées

Populations issues de parcelles agricoles : Les populations sauvages d'autres espèces de pucerons ont été obtenues dans des parcelles commerciales d'endive (riche en diCT) et de Colza (riche en composés soufrés, les glucosinolates). Une colonie de *Nasonovia ribisnigri* trouvée sur endive à proximité d'Arras (62), nous a été envoyée par Marc Benigni (association des producteurs d'endives de France). Un maximum de femelles aptères issues de cette colonie a été placé sur plants de chicorée (une plante de la même espèce (*Cichorium intybus*) que l'endive sur laquelle cette population s'est acclimatée facilement). Cet élevage a été maintenu en masse comme précédemment décrit pour les populations/souches de *M. persicae* testées. Cette population de *Nasonovia ribisnigri* ne supporte pas le milieu artificiel Ap3, mais tolère mieux celui de « Mittler et Dadd » (Mittler and Dadd 1964). Les biotests pour cette souche en particulier ont été réalisés avec ce milieu artificiel. Nous avons également prospecté dans les parcelles de colza sur le centre de recherche à Avignon (228 route de l'aérodrome 84 914 Avignon) en 2018 et récolté une colonie de *Brevicoryne brassicae*. Nous avons maintenu cette colonie en élevage sur colza dans les mêmes conditions que les autres populations.

Populations issues d'une placette expérimentale piège : Une placette de plein champ sur le domaine expérimental des Garrigues (GAFL INRAE Avignon), comportant 5 espèces de plantes riches en 3,5-diCQ ou diCT : patate douce (*Ipomoea batatas*, 3,5-diCQ), chicorée sauvage et endive (*Cichorium intybus*, diCT), arachide (*Arachis hypogaea*, diCT) et pissenlit (*Taraxacum* sp., diCT) a été mise en place dans le but de piéger des pucerons. Cette expérimentation a été réalisée sur deux années (2018 et 2019) durant lesquelles une prospection de la présence de colonies aphidiennes a été réalisée deux fois par semaine sur ces plantes du 21/05/2018 au 28/09/2018 et du 13/05/2019 au 27/09/2019. Les colonies détectées ont été prélevées individuellement, mises en élevage au laboratoire sur les mêmes espèces de plantes que celles où elles avaient été piégées, et évaluées pour leur sensibilité aux 3,5-diCQ ou diCT (en fonction de la plante dont elles sont issues) sur milieu synthétique Ap3 au laboratoire si l'élevage et le milieu synthétique étaient suffisamment bien tolérés par les insectes. Sur l'ensemble de colonies

trouvées, une seule s'est suffisamment bien acclimatée aux conditions d'élevages et à notre milieu artificiel AP3 pour que des biotests puissent être effectués. Il s'agit d'une population d'*Aphis carccivora* prélevée le 10 septembre 2018 sur plant d'arachides. L'identification de cette population a été faite par une systématienne spécialiste des pucerons: Armelle Coeur d'Acier (ingénieure de recherche à l'INRAE de Montpellier, UMR CBGP) comme étant *Aphis (Aphis) craccivora* Koch, 1854. Le plus gros problème que nous ayons rencontré était l'acceptation des milieux artificiels Ap3 ou « Mittler et Dadd » (Mittler and Dadd 1964) par ces populations diverses de pucerons.

Plantes support

Toutes les plantes utilisées pour les élevages, les cohortes et la placette piège ont été obtenues sous serre dans des conditions de culture standard et sans (bio)pesticides : semis en godet sur terreau horticole, repiquage dans des pots de 1 litre et mise sous fertirrigation au goutte-à-goutte. Les piments doux utilisés appartiennent à la variété yellow wonder, les arachides proviennent du Togo par approvisionnement dans le magasin « GrandFrais ». Les graines de pissenlit ont été achetées à Jardiland comme appartenant à la variété : « Vilmorin Pissenlit à cœur plein amélioré », deux variétés de chicorée ont été exposées : « Caillard chicorée sauvage barbe de capucin » et « Vilmorin Chicorée Witloof de Bruxelles », enfin la patate douce a été obtenue par bouturage de la variété D donnée par JL Poessel de l'unité de recherche GAFL de l'INRAE.

Méthodes

Biotests

La toxicité du diCT sur ces populations/souches a été évaluée grâce à des biotests menés sur milieu nutritif synthétique Ap3 mis au point pour l'alimentation des pucerons par l'UMR INRAE/INSA Biologie Fonctionnelle des Insectes et Interactions à Lyon (Febvay, Delobel et al. 1988). L'actif est mélangé au milieu Ap3 à des concentrations croissantes (0,125; 0,250; 0,5; 1 et 2 mM) sur lesquelles sont installées des larves L1 issues d'une même cohorte de 24h. Le choix de cette gamme a été fait car elle induit une réponse graduelle de mortalités corrigées allant de 0 à 100% sur la souche de référence MP06. La limite de solubilité de ces 2 molécules dans le milieu artificiel Ap3 est atteinte à 4mM nous ne pouvons donc pas aller au-delà de cette concentration dans la gamme testée. La mortalité des pucerons a été estimée 48h après mise en contact. L'effectif de pucerons testés par dose dépend des capacités de ponte de chaque population ou souche. Le Tableau 7 résume le nombre de larves qui ont pu être testées pour chacune en fonction des doses de diCT ou 3,5-diCQ. Comme les résultats de biotests sont variables dans le temps les tests sur la souche de référence ont été réalisés en même temps et dans les mêmes conditions que les souches/populations testées.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des effectifs en larves L1 âgées d'entre 0 et 24h des différentes populations/souches de pucerons utilisées pour les biotests sur milieu artificiels avec le diCT ou le 3,5-diCQ

Concentration en diCT (mM)	0	0,125	0,25	0,5	1	2	Total	Concentration en 3,5-diCQ (mM)	0	0,125	0,25	0,5	1	2	Total
11.037.001	50	50	50	50	50	50	300	MP06	90	90	94	94	94	95	557
12.068.006	50	50	50	50	50	50	300	T2.23AC	20	20	20	20	20	20	120
13.001.045	55	51	50	50	50	50	306	T3.4B	24	24	24	24	24	24	144
Barbantane	49	49	49	49	49	49	294	<i>A. craccivora</i>	75	75	75	75	75	75	450
Chanas	28	28	28	28	28	28	168	<i>N. ribisnigri</i>	35	35	35	30	46	43	224
Gotheron	66	66	66	66	66	66	396	<i>Total</i>							1494
Jonquiere	51	51	51	51	51	51	306								
MP06	150	150	150	150	150	150	800								
Resistant	55	55	55	55	55	55	330								
St_Paul_rose	70	70	70	70	70	70	420								
St_Paul_vert	90	90	90	90	90	90	540								
Sylvana	60	60	60	60	60	60	360								
T1.33B	51	45	50	50	50	50	296								
T2.23AC	50	50	50	50	50	50	300								
T3.4B	50	50	50	50	50	50	300								
<i>A. craccivora</i>	125	125	125	125	125	125	750								
<i>B. brassicae</i>	66	56	60	60	60	62	364								
<i>Total</i>							6530								

Dosage enzymatique et protéique

Les activités de deux familles d'enzymes connues pour être impliquées dans la détoxification chez les pucerons ont été dosées : les carboxylestérases (EST) et les glutathion-S-transférases (GST) dans les populations/souches de *Myzus persicae* prélevées sur pêchers, et la souche de référence MP06. Nous avons comme projet de doser les MFO également mais nous n'avons pas réussi à trouver un protocole qui le permette malgré de nombreuses tentatives d'adaptation.

Le dosage de ces deux familles enzymatiques a été mené sur les mêmes extraits protéiques obtenus par broyage d'un pool de 10 femelles aptères (pour avoir suffisamment de protéines) âgées de 10 jours (pour les populations/souches de 2017) ou 14 jours (pour les individus issus de l'évolution expérimentale) dans 100 µl de tampon hépes (50mM, pH 7) sur de la glace. La quantité d'individus ayant pu être analysés dépend de la fertilité de chaque population ou souche, elle est synthétisée dans le Tableau 8. Ces extraits bruts sont ensuite centrifugés à 15 000g pendant 15 minutes à 4°C pour culotter les débris cellulaires. 90µl de surnageant sont prélevés, ce qui constituera les extraits protéiques utilisés pour le reste des dosages. Toutes ces étapes sont réalisées sur de la glace. Les concentrations en protéines totales contenues dans chacun de ces extraits ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976) en triplicat technique. Si les échantillons ne sont pas analysés

dans la foulée, ils sont conservés à -80°C. Ils ne sont dégelés qu'une fois avant dosage des GST. Tous les échantillons ont été dosés sur deux jours (le 23/06/2017 pour les échantillons du pêcher et le 24/01/2019 pour les autres échantillons) pour limiter les erreurs expérimentales.

J'ai choisi l' α -naphtyl acétate comme substrat pour doser les EST car c'est celui qui est le plus communément utilisé pour ce genre de dosage ce qui permet à la communauté scientifique de comparer les études plus facilement entre elles (Beranek 1974). Le protocole suivi est ensuite le même que pour *G. molesta* ou *O. nubilalis* dans le premier chapitre de cette thèse.

J'ai choisi le 2,4-dinitro, chlorobenzène (CDNB) comme substrat pour doser les GST pour les mêmes raisons que l' α -naphtyl acétate (Egaas, Svendsen et al. 1991) et j'ai suivi le même protocole que pour *O. nubilalis* (deuxième publication du chapitre 1).

Tableau 8 : Nombre d'individus utilisés pour doser les activités GST et EST en fonction de leur population ou souche d'appartenance, les chiffres correspondent au nombre de répliqua de 10 individus chacun.

	11-037-001	12-068-006	13-001-045	Barben-tane	Chanas	Gotheron	Jonquière	Résist-ants	St Paul R	St Paul V	Sylvana	MP06
GST	9	10	8	9	6	9	11	9	10	14	10	11
EST	11	13	8	9	6	10	11	9	10	15	12	10

Evolution expérimentale

Nous voulons étudier ici l'éventuelle adaptation de pucerons appartenant à l'espèce *M. persicae* au 3,5-diCQ. Pour cela nous avons mesuré la sensibilité de deux lignées sœurs, issues du même clone et de la même cohorte de départ, mais élevées sur des plantes hôtes différentes pendant 10 générations parthénogénétiques. Une des deux plantes hôte étant riche en 3,5-diCQ : la patate douce et l'autre en est dépourvu : le poivron doux. Nous sommes partis de la souche de référence MP06, car elle est sensible au 3,5-diCQ, sur deux espèces de plantes l'une riche en 3,5-diCQ et l'autre en étant dépourvue afin d'observer une adaptation potentielle. Pour cela, 100 larves L1 de la même cohorte, âgées d'entre 0 et 24h ont été réparties à parts égales sur feuilles de poivron doux ou sur feuille de patate douce, riche de 3,5-diCQ. Neuf jours plus tard, les 100 premières larves L1 de la génération suivante sont placées sur des feuilles coupées de la même espèce de plantes (10 larves/feuilles) sur du papier wattman humide, dans des boîtes de pétri fermées avec du scotch micropore dans des conditions d'élevage standard (cf. paragraphe « matériel biologique »). Le reste de la descendance est sacrifiée pour réaliser des biotests sur du milieu artificiel Ap3 avec du 3,5-diCQ. Les femelles aptères sont congelées à -80°C à l'âge de 14 jours (afin d'avoir suffisamment de descendants pour la suite l'expérience) par pool de 10 en vue du dosage de leurs activités enzymatiques en EST et GST ainsi que leur quantité en protéine.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R 4.1.1 (R Core 2013) et l'interface RStudio 1.3.1093 (RStudio 2021).

Les analyses probits des biotests (fonction `drm`), les calculs de CL (fonction `ED`) et les comparaisons de CL (fonction `EDcomp`) ont été réalisés avec le package `drc` (Ritz, Baty et al. 2015).

La variation de l'activité enzymatique entre populations/souches a été analysée à l'aide d'un modèle linéaire qui incluait la population/souche et la quantité totale de protéine comme variables explicatives fixes (package R `lme4`, (Bates, Mächler et al. 2015)). L'activité des estérases a subi une transformation

log. La significativité des effets a été testée avec des tests de Chi2 de Wald (Anova dans le package car, (Fox and Weisberg 2018)). La dispersion des résidus du modèle a été inspectée à l'aide d'un tracé quantile-quantile (QQ) des résidus standardisés et leur uniformité et les valeurs aberrantes ont été inspectées à l'aide d'un tracé des résidus par rapport aux valeurs prédites. Les tests statistiques associés ont également été effectués (package R DHARMA, (Hartig 2019)).

Le lien entre le log de l'activité enzymatique et la CL50 a été analysé à l'aide d'un modèle linéaire mixte qui incluait la CL50 et la quantité totale de protéine comme variables explicatives fixes et la population comme facteur aléatoire (package R lme4, (Bates, Mächler et al. 2015)). L'analyse des résultats et des résidus a été effectuée comme précédemment.

Résultats

Populations et souches de *M. persicae* provenant du pêcher

Des courbes doses-mortalité ont pu être obtenues grâce à une régression probit des données brutes observées dont les principales informations ont été résumées dans le Tableau 9. Le détail des comparaisons deux à deux de ces résultats est donné dans l'Annexe 1.

Tableau 9 : Sensibilité au DiCT de larves L1 de *Myzus persicae* issues des 10 populations (St Paul vert, Gotheron, Sylvana, Chanas, St Paul rose, Barbantane, Jonquière, 13.001.045, 11.037.001, 12.068.006) et 2 souches clonales (MP06 et résistant). ^a nombre de larves L1 utilisées à chaque biotests. ^b rapport de résistance calculé en fonction de la population la plus sensible : St Paul vert. ^c rapport de résistance calculé en fonction de notre souche de référence MP06. ^d les groupes statistiques ont été calculés sur les CL50 avec la fonction EDcomp du package drc sous R, deux populations ou souches sont considérées comme différentes au risque de première espèce $\alpha = 0,01$.

Pop / souche	n^a	pente	CL50	+/- SE	CL95	+/- SE	RR_S^b	RR_{mp06}^c	classe stat ^d
St Paul vert	540	3,21	0,10	0,019	0,33	0,037	1	0,24	a
13.001.045	306	1,64	0,13	0,054	1,01	0,202	1,30	0,31	a
Gotheron	396	1,87	0,21	0,012	0,61	0,053	2,17	0,52	a
11.037.001	300	2,52	0,24	0,016	0,72	0,072	2,44	0,58	a
sylvana	360	1,88	0,25	0,017	0,85	0,086	2,59	0,62	ab
12.068.006	300	3,07	0,27	0,025	1,55	0,224	2,77	0,66	ab
Chanas	168	1,35	0,28	0,026	0,91	0,126	2,93	0,70	abc
St Paul rose	420	3,10	0,34	0,013	0,57	0,032	3,49	0,83	bcd
Barbantane	294	2,31	0,40	0,025	0,79	0,070	4,10	0,97	cd
MP06	800	2,12	0,41	0,037	1,67	0,157	4,20	1	d
Jonquière	306	3,44	0,65	0,035	1,41	0,117	6,71	1,60	e
résistant	330	2,34	0,75	0,045	2,24	0,231	7,80	1,86	e

Les CL50 (concentration létale médiane) en diCT des populations et souches testées sont comprises entre 0,10 mM pour la population St Paul vert et 0,75 mM pour la souche résistant. On observe des différences significatives de sensibilité entre populations, la population Jonquière et la souche résistant sont différentes de toutes les autres populations. Les moins sensibles sont Jonquière et résistant (Figure 21). Le ratio des CL50 entre la population la plus sensible, St Paul vert, et la moins sensible, résistant atteint 7,80. Une population est déclarée résistante en pratique si ce rapport atteint dix par rapport à la souche la plus sensible (Delorme, Auge et al. 1997). Il n'y a donc pas de populations de *Myzus persicae* résistantes en pratique au diCT parmi celles étudiées en 2017, que ce soit dans les populations naturelles ou dans les souches de laboratoire. Cependant des différences de sensibilités

significatives sont observées. La souche « resistant » et la population « Jonquière » se détachent des autres montrant une moindre sensibilité. A noter que les modèles probits ne s'ajustent pas toujours bien avec nos valeurs observées, ces résultats sont donc à considérer avec précaution.

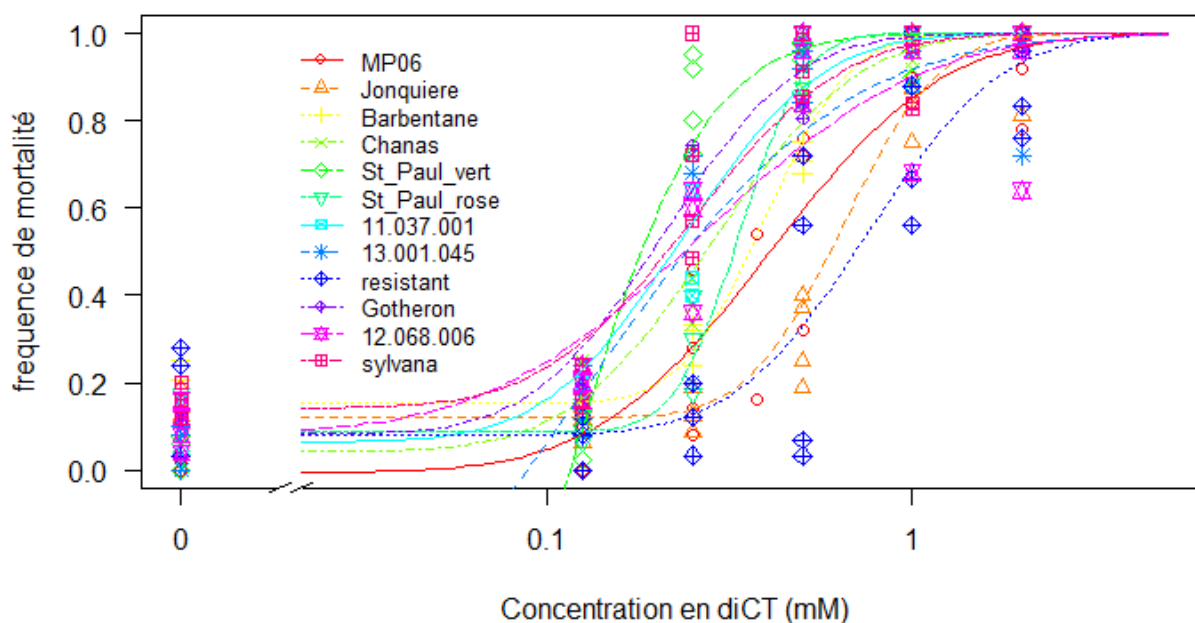
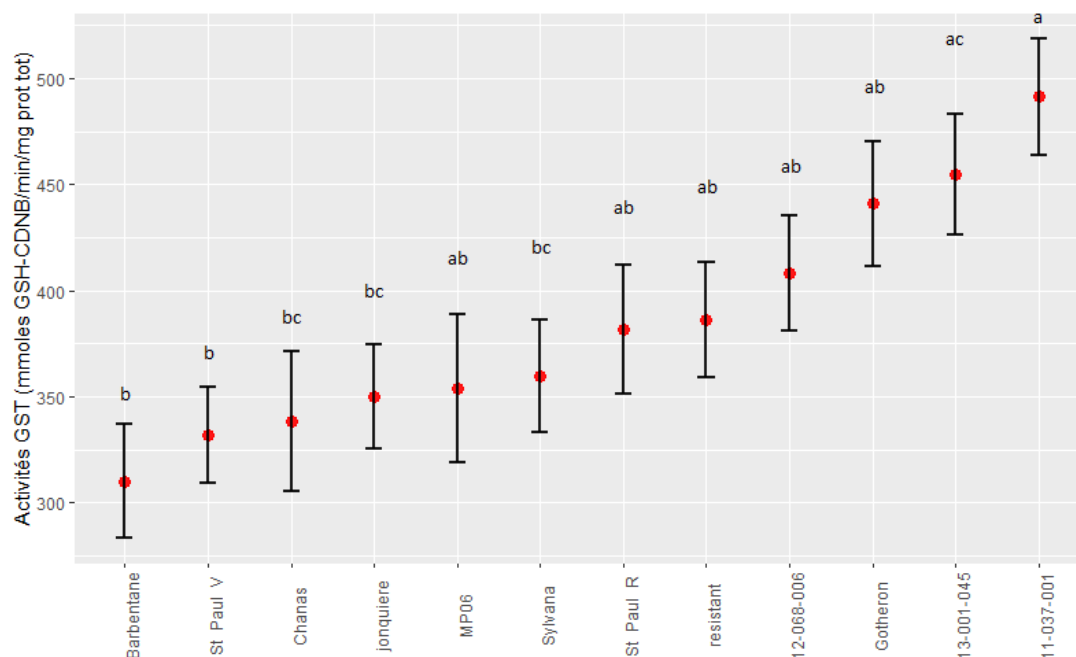


Figure 21 : Courbes dose-mortalité (régression probit) illustrant la sensibilité au diCT d'individus appartenant à des populations ou souches de *M. persicae* provenant de culture de pêcher. Les valeurs réelles sont représentées par les points.

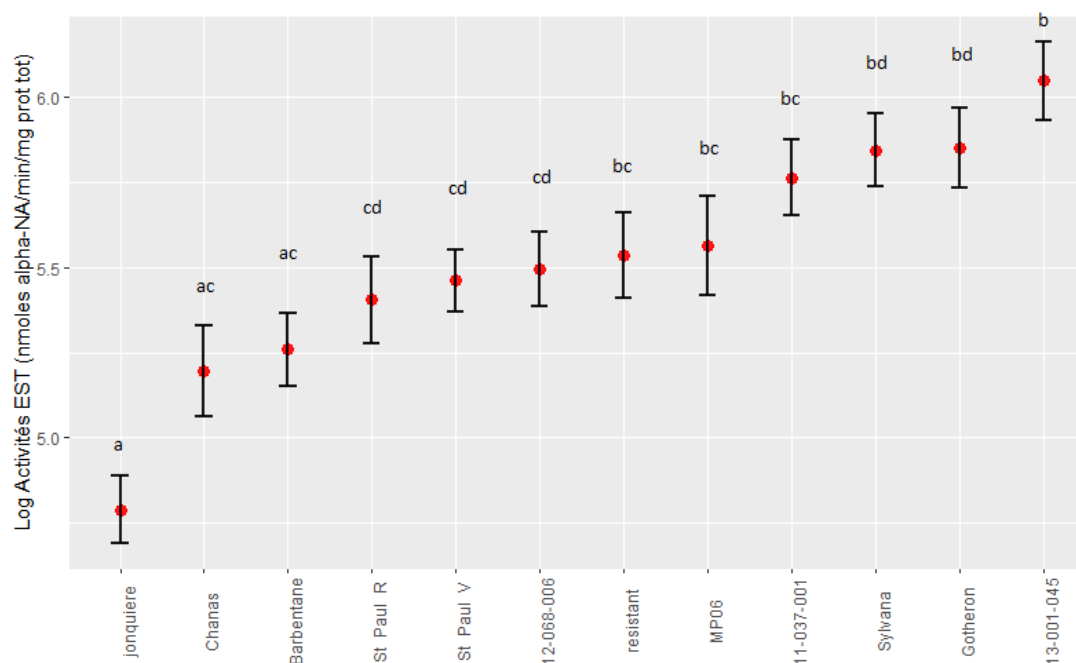
Les activités spécifiques des familles enzymatiques EST et GST ont été mesurées sur des individus issus des populations testées par biotests. Nos résultats montrent une variation continue d'activité GST ou EST au sein du panel de populations ou souches que nous avons testées. Comme pour les résultats de biotests, nous observons des niveaux d'activités spécifiques statistiquement différents en fonction des populations ou souches (pour les GST : $F=4,11$ et $p<0,0001$ et pour les EST : $F=9,90$ et $p<0,0001$) (Figure 22A). Nous notons également des différences de quantité de protéines entre populations ou souches qui sont également significatives ($F=5,33$; $p=1,205 \times 10^{-6}$) (Figure 23).

Nous n'observons pas l'importante suractivité d'EST pour la souche « resistant » attendue. La médiane de cette dernière se trouve au milieu des autres médianes, mais la dispersion de ses valeurs est importante avec un écart type de 215,92 contre 31,52 pour MP06, la souche de référence. Une aussi grande différence de dispersion ne se retrouve pas sur les activités GST bien que les échantillons soient les mêmes pour les deux analyses (écart-type de 101,51 pour « resistant » et 53,29 pour MP06). Il y a plus de variations interpopulationnelles entre activités EST que GST avec un rapport de 4,4 contre 2,8 respectivement entre les moyennes des populations ayant les plus faibles activités et celles ayant les plus fortes. Les activités entre populations sont comparées après avoir défini un modèle linéaire à effets mixtes leur correspondant en tenant compte de l'effet quantité de protéine extrait pour s'en affranchir (Figures 22 A et B). Pour les EST ce modèle a été construit sur le log de l'activité (Annexe 2). Elles sont considérées comme statistiquement différentes lorsque les résultats d'anova sur les modèles sont inférieurs au seuil $p = 0,05$ (Annexe 2). Les quatre souches (resistant, 11-037-001, 12-068-006 et 13-001-045) composées d'individus résistants à des insecticides de synthèse ont des activités EST plus élevées que ceux de la population jonquière qui est composée des individus les moins sensibles au diCT de notre étude.

Deux souches résistantes à des insecticides de synthèse 11-037-01 et 13-001-45 ont des activités GST significativement plus élevées que les populations Saint Paul vert, Sylvana, Chanas, Barbentane et Jonquièrre. La souche de référence MP06 ainsi que Gotheron, 12-006-68, Saint Paul Rouge et resistant ont des activités GST intermédiaires entre ces groupes.



A)



B)

Figure 22 : Activités spécifiques estimées des familles d'enzymes appartenant A) aux GST (en nmoles de CDNB-GSH/min/mg de protéines totales extraites) et B) aux EST (en log nmoles/min/ mg de protéines totales extraites), dans les populations ou souches de *M. persicae* prélevées sur pêcher et testées pour leur sensibilité au diCT. Les lettres au-dessus des points indiquent si les populations ont des activités enzymatiques significativement différentes en tenant compte de quantité totale de protéine dans le modèle linéaire.

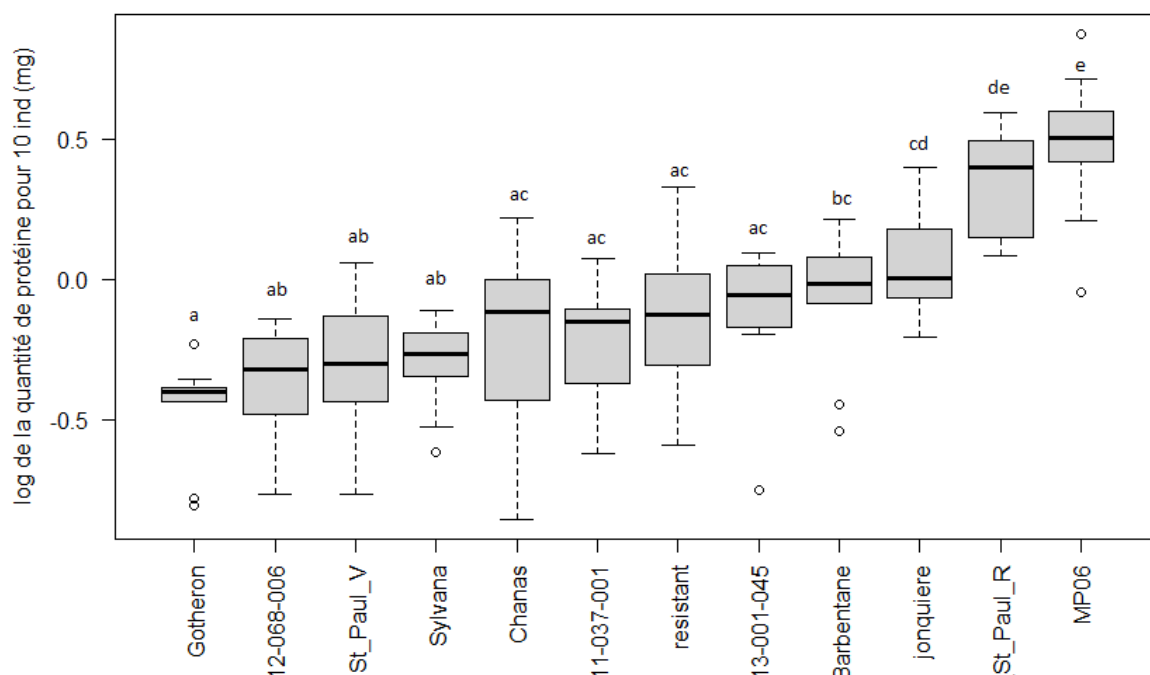


Figure 23 : Répartition des quantités de protéine extraites sur des pools de 10 pucerons adultes aptères parthénogénétiques dans différentes populations ou souches de *M. persicae* isolées sur culture de pêcher et testées pour leur sensibilité au diCT. Les différences entre populations sont considérées comme statistiquement au seuil $\alpha < 0,001$.

Nous observons une relativement grande différence de quantité de protéines extraites à partir de 10 individus en fonction des populations. Nous avons extrait 2,9 fois plus de protéines à partir dans la souche MP06 que dans la population Gotheron. Les extraits protéiques réalisés sur la souche de référence MP06 sont plus concentrés que toutes les autres populations ou souches testées. Ceux des populations Jonquière et resistant, les moins sensibles au diCT ont des teneurs protéiques intermédiaires. Et les 4 souches résistantes aux insecticides de synthèse ont des teneur protéiques très variées d'une souche à une autre.

L'analyse du lien entre sensibilité au diCT (mesuré par la CL50) et le niveau d'activité GST ne montre aucune relation (Chisq=0,50 ; df=1, p=0,48). Par contre la même analyse montre une faible relation négative entre activités EST et sensibilité au diCT (Chisq=5,034 ; df=1, p=0,025). Enfin, lorsque l'on cherche une corrélation entre quantité de protéines et sensibilité au diCT, il y a une corrélation positive très significative (F=14,10 df=1 p=0,00027) (Figure 24).

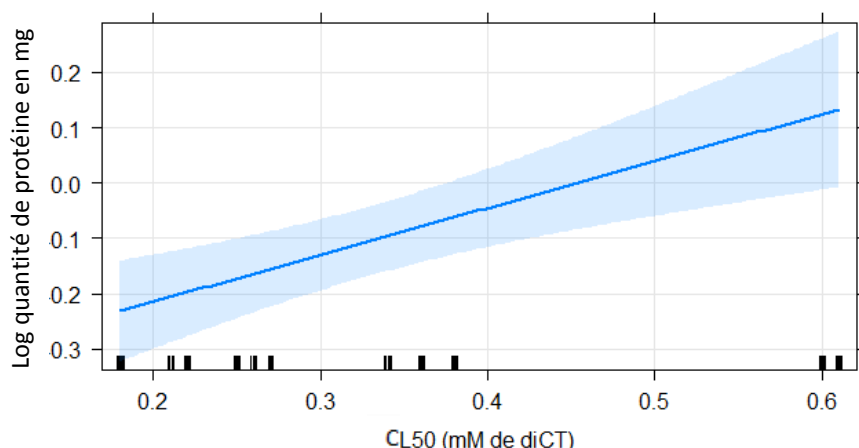


Figure 24 : représentation graphique du modèle linéaire calculé entre le log de la quantité de protéines extraites sur 10 pucerons aptères parthénogénétiques de *M. persicae* en fonction de leur sensibilité en diCT exprimé sous forme de CL50.

Souches de *M. persicae* provenant du tabac

Les CL50 en diCT (MP06 CL50=0,194 ; T1.33B CL50=0,177 ; T2.23AC CL50=0,174 ; T3.4B CL50=0,115) et 3,5-diCQ (MP06 CL50=0,331 ; T2.23AC CL50=0,336 ; T3.4B CL50=0,380) des souches provenant du tabac sont très proches entre elles et de la souche de référence MP06 (Figure 25).

L'analyse statistique de comparaison des CL50 montre qu'il n'y a aucune différence significative de sensibilité entre toutes ces souches au diCT (MP06/T1.33B $p=0,598$; MP06/T2.23AC $p=0,289$; MP06/T3.4B $p=0,598$; T1.33B/T2.23AC $p=0,913$; T1.33B/T3.4B $p=0,657$; T2.23AC/T3.4B $p=0,66$) et au 3,5-diCQ (MP06/T2.23AC $p=0,972$; MP06/T3.4B $p=0,628$; T2.23AC/T3.4B $p=0,771$). Nous observons moins de différences que pour les populations ou souches de *M. persicae* prélevés sur pêchers.

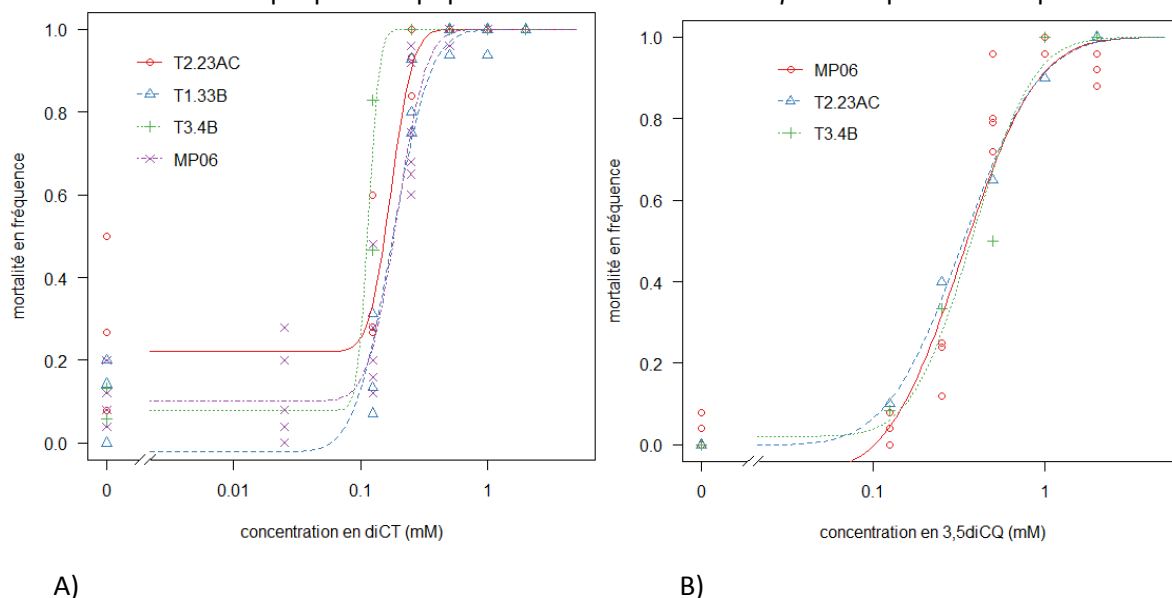


Figure 25 : Courbes dose-réponse A : au diCT et B : au 3,5-diCQ de souches de *Myzus persicae* prélevées sur culture de tabac en comparaison de notre souche de référence MP06 (REF).

Nous avons mesuré les activités enzymatiques GST et EST pour les souches T1.33B et T2.23AC (Figure

26). Nous observons une tendance des deux souches du tabac à avoir des activités GST plus faibles que la souche de référence mais cette différence n'est pas significative et faible (Anova sur modèle linéaire en tenant compte du facteur quantité de protéine : $df=2$; $F= 2.91$ $p=0.067$). Alors que des différences faibles mais très significatives sont détectées pour les activités EST entre populations (Anova sur modèle linéaire en tenant compte du facteur quantité de protéine : $df=2$, $F=29,251$ $p= 2,407 \times 10^{-08}$). Les deux souches provenant du tabac ont en moyenne des activités 1,7 et 1,6 fois moindres que MP06 pour respectivement T1.33B et T2.23AC. Le test de Tukey sur ces données nous permet de dire que la souche de référence se distingue des deux souches prélevées sur tabac mais que ces dernières sont identiques entre elles (T1.33B - MP06 : $t=-4,519$ $p<0,001$; T2.23AC - MP06 : $t=-6,554$ $p<0.001$; T2.23AC - T1.33B : $t=-1,748$ $p=0,194$).

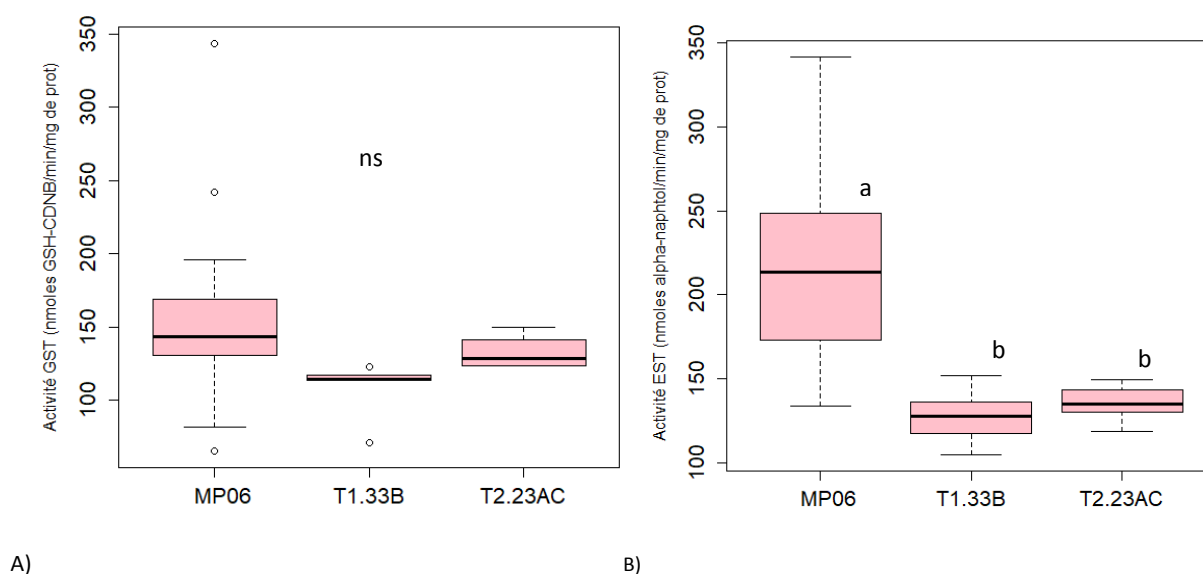


Figure 26 : Répartition des activités enzymatiques A) glutathion-S-transférase (nmoles de CDNB-GSH/min/mg de prot) et B) carboxylestérase (nmoles d' α -naphtol/min/mg de prot) de trois souches de *Myzus persicae* : la référence MP06 provenant de culture de pêcher et deux souches T1.33B et T2.23AC provenant de culture de tabac.

Les quantités de protéines totales extraites pour 10 pucerons au sein de ces 3 clones de *M. persicae* provenant des deux plantes hôtes distinctes (pêcher et tabac) ne sont pas significativement différentes ($df= 2$; $F=3,16$; $p=0,054$) (Figure 27).

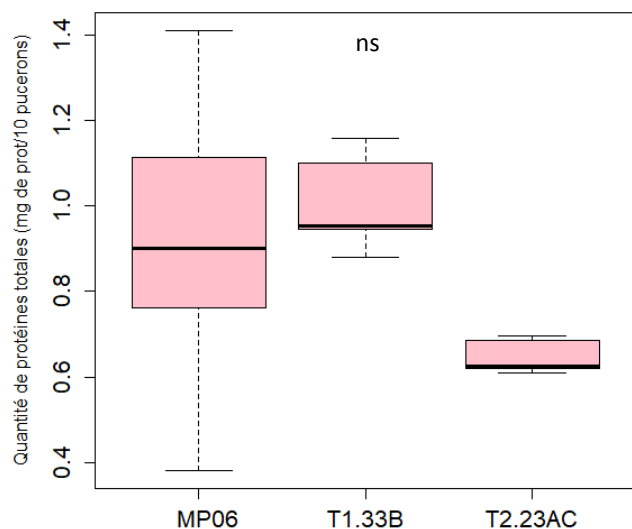


Figure 27 : Répartition des quantités de protéines totales extraites sur des pools de 10 pucerons adultes aptères parthénogénétiques dans différentes souches de *M. persicae* MP06 provenant de culture de pêcher et T1.33B et T2.23AC de tabac. Les différences entre populations sont considérées comme statistiquement au seuil $\alpha < 0,05$.

Variation de sensibilité aux diCT/3,5-diCQ de différentes espèces de pucerons provenant de cultures riches en composés de défense contre les insectes

Nous avons piégé un total de 11 colonies de pucerons sur la parcelle expérimentale de plein champ comportant des plants de patate douce (riche en 3,5-diCQ), chicorée sauvage (riche en diCT), endive (riche en diCT), arachide (riche en diCT) et pissenlit (riche en diCT), dont une seule en 2018 sur arachide et 10 en 2019 dont 5 sur différents plants d'arachides, 2 sur chicorée, 1 sur patate douce et 2 sur pissenlits appartenant aux espèces *Aphis craccivora*, *Aphis taraxacicola*, *Aphis pisum*, *Aphis fabae*. Seule une souche d'*A. craccivora* prélevée en 2018 sur arachide a pu faire l'objet de biotests. Les individus de la population d'*A. taraxacicola* ont très mal supporté l'élevage et les autres espèces d'*Aphis* ne se sont pas alimentées sur milieu artificiel Ap3 ou « Mittler et Dadd ».

Nous avons également testé la sensibilité de deux populations appartenant à deux autres espèces : *N. ribisnigri* prélevée sur culture d'endive, riche en diCT, et *B. brassicae*, prélevée sur colza riche en composés de défense.

Les résultats des biotests offrent une réponse beaucoup plus contrastée que ceux obtenus sur les souches et populations de *M. persicae* (Figure 28). Les individus de la population d'*A. craccivora* montrent une claire faculté à résister aux deux matières actives au point que les CL50 ne sont pas calculables avec cette gamme de substance active, alors que ceux de *B. brassicae* sont très sensibles au 3,5-diCQ (CL50_{*B. brassicae*}=0,09 mM ; CL50_{MP06}=0,31 ; EDcomp MP06 vs *B. brassicae* $p < 0,00001$) et que les individus de la population de *N. ribisnigri* montrent la même sensibilité que *M. persicae* au diCT (CL50_{*N. ribisnigri*}=0,19 ; CL50_{*M. persicae*}=0,21 ; EDcomp MP06 vs *N. ribisnigri* $p = 0,96$). Il est remarquable de souligner qu'avec la population d'*Aphis craccivora* c'est la première fois que nous mettons en évidence des pucerons capables de survivre à une dose de 2mM de diCT et 3,5-diCQ.

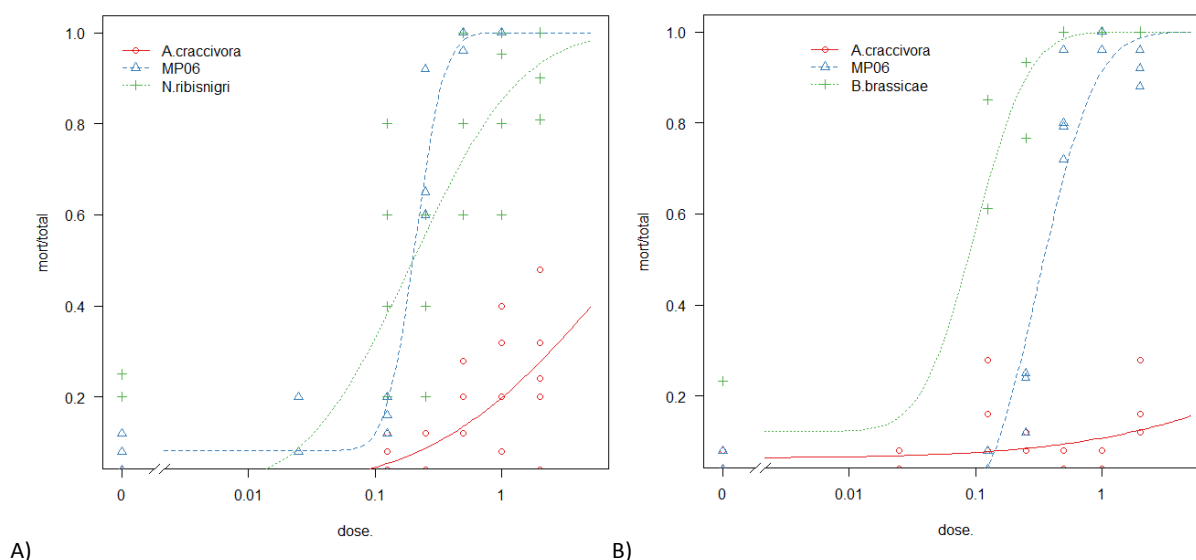


Figure 28 : Courbes dose-réponse A) au diCT, B) au 3,5-diCQ de populations de 3 espèces de pucerons différentes (*Aphis craccivora*, *Nazonovia ribisnigri* et *Brevichorinae brassicae*) prélevées sur des plantes riches en l'un ou l'autre de ces composés, comparées à une souche de référence MP06 appartenant à l'espèce *M. persicae*. La même population d'*A. craccivora* a été testée sur les 2 substances.

Nous avons mesuré les activités enzymatiques GST et EST pour les populations des deux espèces *A. craccivora* et *N. ribisnigri* (Figure 29). Nous n'observons aucune différence entre activités GST de ces deux populations et la souche de référence MP06 (Anova sur modèle linéaire en tenant compte du facteur quantité de protéine : $df=2$, $F=2,23$, $p=0,123$). Alors que des différences significatives entre populations sont détectées pour les activités EST (Anova sur modèle linéaire en tenant compte du facteur quantité de protéine : $df=2$, $F=57,15$, $p=2,747e-11$). Les deux populations appartenant à d'autres espèces que *M. persicae* ont en moyenne des activités 4,4 et 5,1 fois moindres que MP06 pour respectivement *A. craccivora* et *N. ribisnigri*. Un test de Tukey sur ces données nous permet de dire que la souche de référence de *M. persicae* se distingue des deux souches appartenant à d'autres espèces mais que ces dernières sont identiques entre elles (*A. craccivora* - MP06 : $t=-5.825$, $p<0.001$; *N. ribisnigri* - MP06 : $t=-8.725$, $p<0.001$; *N. ribisnigri* - *A. craccivora* : $t=-1.332$, $p=0.371$)

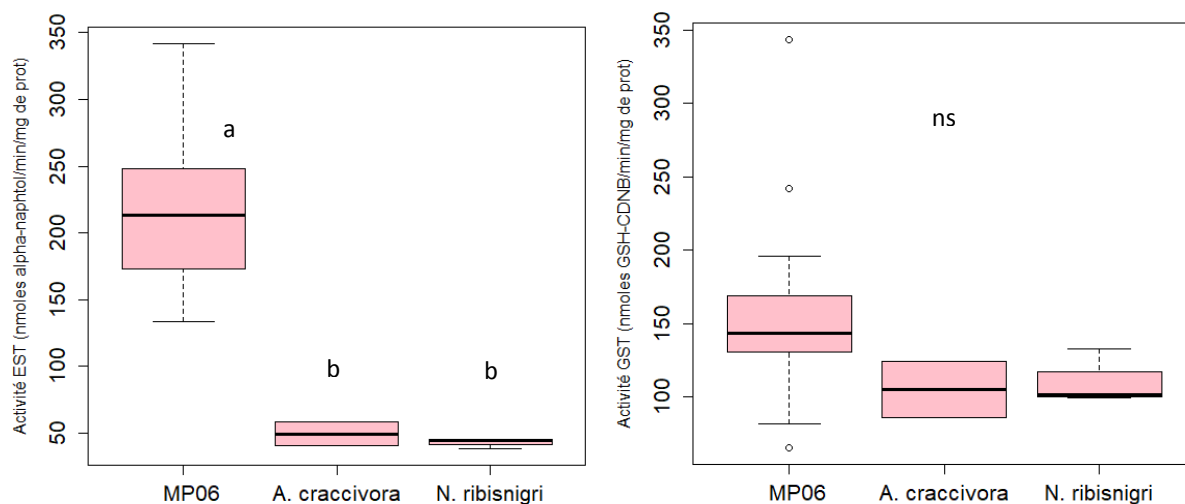


Figure 29 : Répartition des activités enzymatiques A) carboxylestérase (nmoles d' α -naphtol/min/mg de prot) et B) glutathion-S-transférase (nmoles de CDNB-GSH/min/mg de prot) de trois souches d'espèces différentes : MP06=*Myzus persicae*, *A. craccivora* et *N. ribisnigri*.

Les quantités de protéines totales extraites pour 10 pucerons au sein de ces 3 populations ou clones appartenant aux trois espèces présentées plus haut sont significativement différentes ($df= 2$; $F=4,69$; $p=0,0161$). Les individus d'*A. craccivora* et de *M. persicae* (MP06) en notre possession sont significativement moins riches en protéine que ceux de *N. ribisnigri* (*A. craccivora* - MP06 : $t=-1,54$; $p=0,274$; *N. ribisnigri* - MP06 : $t=2,53$; $p=0,040$; *N. ribisnigri* - *A. craccivora* : $t=2,91$; $p=0,016$) (Figure 30).

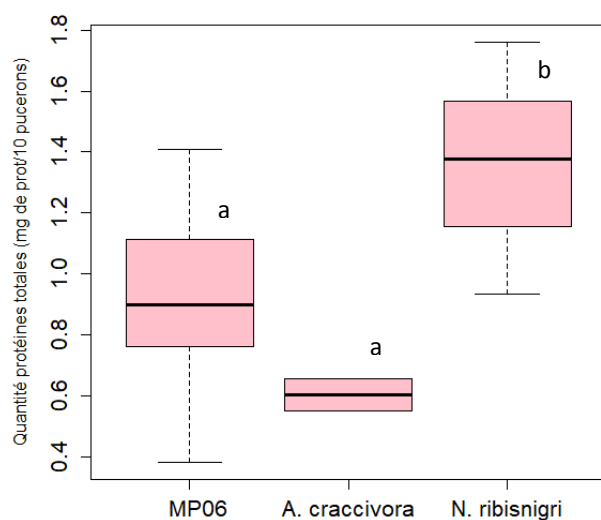


Figure 30 : Répartition des quantités de protéines totales extraites sur des pools de 10 pucerons adultes aptères parthénogénétiques dans différentes populations ou souches de trois espèces de pucerons *M. persicae*, *A. craccivora* et *N. ribisnigri* testées pour leur sensibilité au diCT. Les différences entre populations sont considérées comme statistiquement au seuil $\alpha < 0,05$.

Adaptation expérimentale sur plante riche en 3,5-diCQ

A chaque génération la sensibilité au 3,5-diCQ a été mesurée par biotest sur milieu artificiel sur les deux lignées élevées sur plantes différentes. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative de sensibilité au 3,5-diCQ observée entre les deux lignées au cours des 10 générations de l'expérimentation, sauf à la deuxième génération où la lignée élevée sur patate douce s'avère être légèrement mais significativement plus sensible au 3,5-diCQ que la lignée élevée sur poivron doux (Tableau 10).

Tableau 10 : Evolution de la sensibilité au 3,5-dicQ de deux lignées de *M. persicae* issues du clone Mp06, l'une élevée sur plants de poivrons doux (*Capsicum annuum*), et l'autre sur patate douce (*Ipomoea batatas*). ^a nombre de larves L1 utilisées à chaque biotests. ^b Concentration létale 50 en mM de 3,5-dicQ. ^c rapport de résistance calculé sur la base de la lignée élevée sur poivron doux. ^d valeur de la p-value des CL50 des 2 lignées à une génération donnée calculée avec la fonction EDcomp du package drc sous R, deux lignées sont considérées comme différentes quand la probabilité P est inférieure au seuil $\alpha = 0,01$.

Génération	Plante support	n ^a	pente	CL50 ^b	+/- SE	RR ^c	p ^d (EDcomp)	Signif
G1	Poivron	297	1,33	0,301	0,052		0,532	-
	Patate douce	260	2,68	0,269	0,019	0,894		
G2	Poivron	300	1,46	0,423	0,040		p<0,01	***
	Patate douce	300	1,85	0,291	0,019	0,688		
G3	Poivron	300	2,1	0,892	0,074		0,231	-
	Patate douce	300	3,77	0,793	0,050	0,889		
G4	Poivron	300	2,95	0,860	0,061		0,953	-
	Patate douce	300	2,7	0,856	0,050	0,995		
G5	Poivron	300	5,17	0,935	0,099		0,241	-
	Patate douce	300	2,98	0,837	0,061	0,894		
G6	Poivron	300	1,76	0,924	0,072		0,22	-
	Patate douce	300	2,06	0,799	0,080	0,865		
G7	Poivron	300	2,92	1,240	0,067		0,164	-
	Patate douce	280	2,34	1,408	0,093	1,135		
G8	Poivron	300	2,48	0,900	0,052		0,521	-
	Patate douce	300	1,75	0,966	0,084	1,073		
G9	Poivron	300	3,18	1,239	0,067		0,217	-
	Patate douce	260	2,58	1,117	0,077	0,902		
G10	Poivron	260	9,45	0,935	1,307		0,893	-
	Patate douce	300	1,42	1,151	0,105	1,231		

L'analyse des activités enzymatiques tenant compte de l'effet quantité de protéines extraites montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les activités GST des deux lignées de pucerons (Anova sur model mixte en tenant compte du facteur quantité de protéine : Chisq=1,845, df=1, p=0,174). Cependant il existe des différences marginales d'activité EST entre lignées (Anova sur modèle mixte en tenant compte du facteur quantité de protéine : Chisq= 4.9813, df=1, p=0,026). Les pucerons s'étant nourri sur poivron doux ont moins d'activité EST que ceux sur patate douce (Figure 31) mais se phénomène ne s'accroît pas au fil des générations. En effet, l'analyse des données d'activités carboxylestérases générations par génération montre qu'il y a une différence significative à la 3e (df=1, F=22,38, p=0,0021), 4e (df=1, F=51,67, p=0,00018), 6e (df=1, F=138,10, p=0,0013) et 9e (df=1, F=22,43, p=0,0021) génération avec plus d'activité dans les pucerons élevés sur poivron en comparaison de ceux sur patate douce.

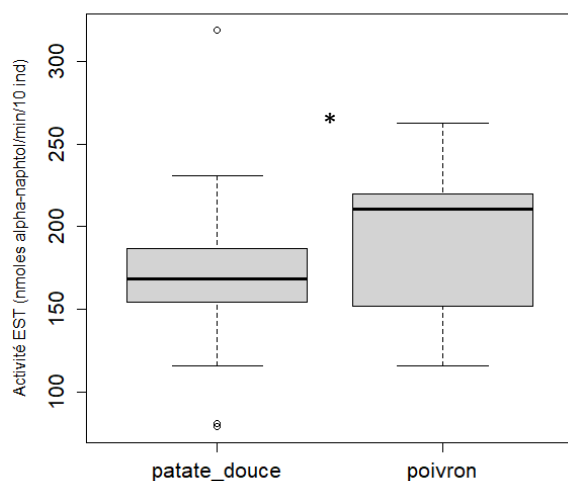


Figure 31 : Répartition des activités EST (nmoles d' α -naphtol/min/10 individus) au sein de pool de 10 pucerons adultes aptères parthénogénétiques appartenant à deux lignées sœurs se nourrissant sur des plantes différentes : la patate douce ou le piment doux sur l'ensemble des générations.

La quantité de protéine extraite ne diffère pas entre les deux lignées ($df=1$, $F=0,59$, $p=0,4453$).

Discussion

Cette étude se situe dans le contexte du développement comme bioinsecticides de deux molécules d'origine naturelle aux propriétés aphicides: le diCT et le 3,5-diCQ. La perspective de leur utilisation en agriculture pose plusieurs questions, dont une sur leur durabilité. Ainsi, nous avons comme ambition dans cette étude de déterminer si, chez *M. persicae*, une résistance préexistante à des insecticides de synthèse due à de la détoxification pouvait entraîner une résistance croisée au diCT. Nous voulions également déterminer si la présence dans l'environnement de diCT et 3,5-diCQ avait induit une pré-adaptation à ces composés chez certaines espèces de pucerons. Enfin, nous voulions savoir si un clone sensible allait développer rapidement une adaptation au 3,5-diCQ, quand cette molécule était naturellement présente dans la plante hôte. Au cours de notre expérimentation, nous n'avons pas toujours pu faire les tests sur les deux molécules cibles pour des raisons matérielles. Nous avons orienté nos choix en fonction de la pertinence scientifique. Par exemple les pucerons élevés sur patate douce ont été testés sur 3,5-diCQ, car cette plante en est riche. Toute la première partie de cette étude a été menée sur diCT car cette molécule a plus de perspective de développement industriel.

Diversité de réponse au diCT et risque de sélection de résistance croisée

Nous n'avons pas détecté de résistance préexistante suffisamment forte pour être considérée comme une résistance en pratique ($RR>10$) dans les populations ou souches de *M. persicae* que nous avons testées, qu'elles soient sensibles ou résistantes à des insecticides chimiques et qu'elles proviennent de leur hôte primaire : le pêcher ou d'un hôte secondaire : le tabac. Cependant, nous avons observé un continuum de sensibilité avec des différences significatives entre les extrêmes allant jusqu'à 7,8 fois à la CL50 entre populations ou souches de *M. persicae* provenant du pêcher. Ces différences observées dans un petit échantillon de 15 populations ou souches nous questionnent sur l'existence possible d'autres populations porteuses d'une moindre sensibilité plus marquée dans la nature. De plus, les individus les plus résistants des populations ayant le plus grand rapport de résistance peuvent être sélectionnés si la dose utilisée au champ est trop basse. Par exemple à la CL98 (0,94mM de diCT) de la souche de référence MP06, 16% des individus de la population « Jonquiere » survivent. Une sélection

peut ainsi se produire sur plusieurs générations pour donner naissance à une population entièrement résistante, d'autant plus que des phénomènes d'hormétiques peuvent survenir chez les survivants, comme cela a déjà été observé chez cette espèce pour une autre molécule d'origine naturelle extraite de plante : l'azadirachtine, ou des molécules de synthèses (Cutler, Ramanaidu et al. 2009). Il faudrait tenir compte de ces informations dans la demande de mise sur le marché et la formulation du produit commercial, afin de proposer une dose d'emploi qui soit suffisamment élevée pour éviter ces écueils.

La variation continue de phénotypes observée dans nos résultats fait écho à d'autres études. Chez un puceron du melon *A. gossypii* une étude a montré une diversité continue et variable de sensibilité à des substances actives pyréthrinoïdes entre années et populations (Hanson, Menger-Anderson et al. 2017). Dans une autre étude portant sur 49 populations de cette même espèce de pucerons, il est observé une diversité génétique interpopulationnelle très faible sur la base de marqueurs neutres alors qu'elles montrent un continuum des phénotypes de sensibilité à une variété de melon résistante (Lombaert, Carletto et al. 2009). Cette variation continue de sensibilité à des pesticides est aussi bien connue chez d'autres insectes : *O. nubilalis* (Siegwart, Thibord et al. 2017), *C. pomonella* (Reyes, Franck et al. 2007). Les variations inter-populationnelles de sensibilité au diCT/3,5-diCQ observées pourraient être partiellement imputables à des endosymbiotes comme c'est le cas pour d'autres molécules (Kikuchi, Hayatsu et al. 2012; Xia, Zheng et al. 2013; Singh, Troczka et al. 2020). Nous avons esquissé les premiers traits d'une étude pour vérifier cette hypothèse (données non présentées), et nos résultats préliminaires laissaient entrevoir l'impact négatif d'endosymbiotes secondaires sur la tolérance au diCT.

Les 3 clones testés provenant du tabac montrent une similitude de sensibilité au diCT. Cela pourrait s'expliquer par le mode de reproduction de cette sous-espèce d'insecte. En effet, *M. persicae nicotianae* est entièrement asexuée, et donc, par effet de dérive, appauvrie génétiquement (Margaritopoulos, Malarky et al. 2007). Cette observation est en accord avec les observations de Guillemaud *et al.* (2003) qui ont montré une plus grande diversité entre clones passant par une phase de reproduction sexuée au cours de l'année en comparaison de ceux qui restent parthénogénétiques toute l'année (Guillemaud, Mieuzet et al. 2003). Cette différence de diversité de réponse au diCT entre souches issues d'hôte primaire et secondaire pourrait s'expliquer, par le cycle biologique de *M. persicae* favorisant le brassage génétique sur le pêcher (Guillemaud, Mieuzet et al. 2003; Fenton, Margaritopoulos et al. 2010) même si cela demande à être confirmé en considérant un plus grand nombre de clones issus du tabac.

Résistance croisée insecticides de synthèse et diCT chez *M. persicae*

Les 3 souches de *M. persicae* résistantes à des insecticides de synthèse fournies par l'Anses sont plus sensibles au diCT que la souche sensible de référence. Nous n'observons donc pas de résistance croisée entre ce composé naturel et des insecticides de synthèse déjà commercialisés.

Des cas de résistances croisées entre des bioinsecticides d'origine naturelle et molécules synthétiques sont connus lorsque des mutations de cible sont en jeu. Par exemple entre les pyrèthres naturelles et les pyréthrinoïdes de synthèse (Jongejan and Lourens 1980). Des résistances croisées dues à de la détoxification impliquant prioritairement des MFO, mais aussi des GST et des EST sont elles aussi bien documentées et résumées dans la revue de Li *et al.* (Li, Bai et al. 2012). Par exemple, le groupe des CYP6 a été décrit comme capable de dégrader respectivement la nicotine et un néonicotinoïde (Li, Schuler et al. 2007; Li, Bai et al. 2012). Des relations entre alimentation et réponses à un insecticide OPs via des différences d'activités EST ont été observées chez *Epiphyas postvittana* montrant le lien existant entre dégradation des produits de l'alimentation et pesticides (Robertson, Armstrong et al. 1990). De plus,

l'adaptation des insectes à un hôte toxique semble favoriser le développement de résistances (Alyokhin et Chen, 2017). Nos résultats semblent montrer que la cible moléculaire du diCT est différente de celles des molécules déjà mises sur le marché et que les outils de détoxications acquis par les clones résistants ne sont pas adaptés pour modifier le diCT.

Préexistence de clones adaptés parmi d'autres espèces de pucerons

La placette composée de plantes riches en diCT ou 3,5-diCQ a piégé une population de pucerons de l'espèce *A. craccivora* qui s'est révélée insensible au diCT et au 3,5-diCQ, aux doses testées. C'est la première fois que nous observons des pucerons capables de survivre à la dose de 2mM de ces 2 molécules. C'est une espèce très polyphage avec une préférence pour les Fabaceae dont l'arachide (Blackman and Eastop 2007). Il existe des preuves génétiques et morphologiques de l'existence de races d'hôte chez cette espèce (Takahashi 1966; Coeur d'Acier, Jousselin et al. 2007). Elle est également connue pour être infectée par des endosymbiotes facultatifs (Russell, Latorre et al. 2003). La nature de ces endosymbiotes sont dépendant de la plante hôte sur laquelle elle se nourrit (Brady and White 2013). Cette espèce de puceron est bien connue sur culture d'arachide, riche en diCT. Il existe même une gamme de variétés d'arachides plus ou moins résistante à ce puceron (Javed, Iqbal et al. 2014). La diversité génétique est globalement faible au sein de cette espèce de par son mode de reproduction presque exclusivement parthénogénétique (Wongsa, Duangphakdee et al. 2017). Comme nous n'avons testé qu'une population d'*A. craccivora*, nous ne sommes pas en mesure de savoir si cette insensibilité est généralisée à tous les individus de cette espèce ou si il existe des clones sensibles au diCT/3,5-diCQ, auquel cas nous pourrions parler de résistance. Si le mécanisme d'insensibilité en jeu ici n'est pas dû à de la détoxication, il pourrait être causé par une mutation de la cible moléculaire, l'absence de cette cible ou un mécanisme compensatoire. En effet, il est peu probable que le premier grand mécanisme de résistance le plus répandu chez les pucerons : l'augmentation de l'épaisseur de la cuticule pour diminuer la vitesse de pénétration (Bass, Puinean et al. 2014) en soit la cause car ces molécules n'agissent que par ingestion. En Egypte certains clones d'*A. craccivora* ont développé des résistances croisées à 7 insecticides de différentes familles (Pirimicarbe, Carbosulfan, Acétamipride, Thiamethoxam, Fenitrothion, Malathion, et Chlorpyrifos-methyl) corrélé à une suractivité d'EST et une mutation dans l'AchE la cible des OPs et carbamates (Fouad, Abou-Yousef et al. 2016; Kandil, Abdallah et al. 2017). Dans des parcelles agricoles commerciales françaises, de pois par exemple, cette espèce de puceron peut être soumise à des pressions de sélection insecticides (Anses-Ephy 2021).

La pression de sélection naturelle dépend de la disponibilité du diCT/3,5 diCQ dans les plantes hôtes

Nous avons capturé plusieurs espèces de pucerons se développant spontanément sur des plantes riches en diCT ou 3,5-diCQ et supportant la présence de ces composés toxiques. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : soit ces molécules sont enfermées dans des compartiments cellulaires non accessibles au stylet des pucerons ou sont présentes en trop faible teneur pour avoir une action, soit ces espèces y sont insensibles. De plus, dans la troisième partie de notre étude, nous avons comparé deux lignées sœurs issues de la souche de référence MP06 mais élevées pendant 10 générations soit sur une plante dépourvue de diCT : le piment, soit sur une plante qui en est riche : la patate douce. Nos résultats ne montrent pas de moindre sensibilité de la lignée sur patate douce en comparaison de la lignée sur poivron ; ni d'activation d'activité EST ou GST au cours de ces 10 générations. Au contraire la lignée élevée sur poivron à des activités EST légèrement mais significativement plus forte que la lignée élevée sur patate douce. Alors qu'Egaas et al. (1991) ont montré que le changement d'hôte d'une population de *M. persicae* du poivron doux vers le chou chinois induisait une suractivité de GST par modification épigénétique seulement 2 générations après ce changement d'hôte (Egaas, Svendsen et al. 1991).

Nous n’observons pas ce phénomène dans notre essai et bien que nous ne l’ayons pas mesuré précisément la lignée élevée sur patate douce n’a pas montré de coût physiologique au changement d’hôte apparent ni de mortalité marquée. Il est donc possible que les pucerons n’aient pas été en contact avec le 3,5-diCQ de la patate douce. Les propriétés aphicides du 3,5-diCQ ont été découvertes car, chez les cultivars de pêcher résistants, la pique des pucerons induit le relargage de cette molécule dans l’espace intercellulaire (Poessel, Collet et al. 2014). L’utilisation de cette molécule par d’autres plantes contre les pucerons n’est peut-être pas généralisée. Par exemple, une étude a montré que chez l’arachide, les acide caféiques (dont le diCT et le 3,5-diCQ font partie) sont induits par une attaque d’un insecte broyeur (*Helicoverpa armigera*), alors que les attaques d’un insecte piqueur suceur (*Aphis craccivora*) induisent d’autres molécules (War, Sharma et al. 2016). Cela nous permet de relativiser l’impact de la présence de diCT et 3,5-diCQ dans la nature sur une pré-adaptation éventuelle, car pour qu’un mécanisme adaptatif puisse se mettre en place il faut qu’il y ait un contact entre le stylet des pucerons et ces molécules. Cela ne suffit pas aux plantes d’avoir des ressources de défense, il faut qu’elles les mobilisent. La population d’*A. craccivora* insensible piégée sur plantes d’Arachide aurait évolué vers ce caractère grâce à une pression de sélection au moment de son alimentation s’il y a doubles attaques d’insectes broyeurs et de pucerons sur une même plante ou grâce à une voie complètement inconnue indépendante de son alimentation et de l’existence de cette molécule dans la nature.

Mécanismes de moindre sensibilité

Comme pour les biotest, nous observons un continuum de niveau d’activité GST et EST entre populations testées. Nos résultats ne montrent pas de corrélation entre moindre sensibilité au diCT (mesurée par la CL50) et niveau d’activité enzymatique GST, et une faible relation négative avec les EST ; alors que ces enzymes semblent être de bons marqueurs des résistances aux insecticides de synthèse (Rufingier, Pasteur et al. 1999). La faible corrélation négative que nous observons entre niveau de sensibilité au diCT et EST semble plus être la conséquence de différences de richesse en protéines totales par individu entre populations bien que les modèles statistiques utilisés tiennent compte de ce co-facteur. Dans tous les cas ce résultat réfute l’hypothèse selon laquelle des clones de *M. persicae* pourraient dégrader les diCT/3,5-diCQ par l’augmentation de leur activité EST.

Nos résultats vont donc dans le sens d’une absence d’implication des EST et GST dans l’adaptation au diCT ce qui corrobore une étude menée en parallèle à l’INRAE Sophia Antipolis (UMR ISA équipe Défense des Insectes) portant sur le rôle de la carboxylestérase E4 dans la détoxification du 3,5-diCQ (Fricaux, Coustau et al. in prep).

L’absence de suractivité EST dans les individus de la souche « résistant » est un résultat inattendu. En effet, nous l’avons choisie car elle est connue pour surexprimer fortement la carboxylestérase E4 grâce à une amplification génique (van Emden, Foster et al. 2014). Nous ne savions pas que la résistance de cette souche s’était déjà vue annulée par le passé grâce au gene silencing de cette enzyme par l’entremise de méthylations dans son promoteur (van Emden, Foster et al. 2014). Ce phénomène s’est produit d’abord en Angleterre où la souche porteuse de ce nouveau phénotype sensible fut dénommée 794Jrev (van Emden, Foster et al. 2014). Après discussion il s’avère que cet évènement s’est également produit à l’INRAE de Sophia par deux fois, il n’est donc pas rare. Cependant, nos résultats laissent penser que cette souche contient probablement d’autres mécanismes de défense contre les xénobiotiques car c’est elle qui ressort la moins sensible au diCT parmi les populations ou souches de *M. persicae* que nous avons testées.

Nous n'avons pas réussi à mettre au point une méthode de dosage des MFO dans *M. persicae*, alors que cette famille d'enzymes joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques chez cette espèce de pucerons (Bass, Puinean et al. 2014). Néanmoins, la souche 11.37.001 est résistante aux néonicotinoïdes sans mutation de cible, elle est donc possiblement porteuse de divers autres mécanismes de résistance, dont de la détoxification pouvant impliquer des MFO (Puinean, Foster et al. 2010). Cette souche se situe dans le groupe statistique des plus sensibles au diCT. Les MFO exprimées par cette souche ne seraient donc pas suffisantes pour résister à du diCT.

L'origine de l'insensibilité de la population d'*A. craccivora* que nous avons testée pourrait nous aider à comprendre le mode d'action du diCT et du 3,5-diCQ. Nous avons initié la recherche sur cette origine en dosant les activités GST et des EST dans les individus de cette population en ayant pour hypothèse qu'une suractivité d'une de ces deux familles enzymatiques pourrait être impliquée. Nos résultats infirment cette hypothèse, avec aucune différence d'activité GST, et des activités EST significativement plus faibles que le clone de référence sensible de *M. persicae*. Cela va dans le même sens que nos premiers résultats sur *M. persicae*, qui rejettent l'hypothèse de l'implication par accroissement d'activité de ces deux familles enzymatiques dans la détoxification du diCT. Il serait intéressant de vérifier la présence d'isoformes d'EST, GST ou MFO chez *A. craccivora* pour déterminer s'il en existe certaines spécialisées dans la dégradation des diCT/3,5-diCQ. La découverte de cette population insensible aux deux molécules nous apporte aussi des arguments pour dire que leur mode d'action serait très proche, ce qui était attendu vu leur similitude moléculaire.

Nous avons observé que les populations ou souches de *M. persicae* les plus riches en protéines totales sont aussi les moins sensibles au diCT sans que cela ne confère de grand rapport de résistance. Cette différence peut s'expliquer par des variations de taille et/ou de niveaux de réserves énergétiques des individus entre souches ou populations (Foray, Pelisson et al. 2012). La richesse protéique peut être un indicateur du fitness des individus et donc de leur propension à survivre à un stress, comme cela a été observé chez une autre espèce de puceron (Ahsaei, Tabadkani et al. 2013). Les faibles variations de sensibilité observées dans la première partie de cette étude seraient alors dues à des capacités réduites des individus à répondre à un stress en fonction de leur état de santé général (Schmidt-Nielsen and Knut 1984) en absence de mécanismes de résistance à forts effets. En effet, lorsque l'on compare, les quantités de protéines totales au sein des individus de la population d'*A. craccivora* complètement insensibles aux diCT et 3,5-diCQ, à la souche de référence MP06, il n'y a pas de différence. Cela irait dans le sens de l'existence d'un autre mécanisme à effet fort, type modification de la cible moléculaire, qui masque complètement le mécanisme mineur de moindre sensibilité décrit au début de ce paragraphe.

Perspectives

Les résultats présentés ici combinés à ceux obtenus dans d'autres work packages du projet dicabio confirment une action aphicide du diCT et/ou du 3,5-diCQ sur les 6 espèces de pucerons suivantes : *Dysaphis plantaginea*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae*, *Sitobion avenae*, *Brevicoryne brassicae* et *Nasonovia ribisnigri*. Nous avons également observé que quatre espèces de pucerons sont capables de se nourrir sur des plantes riches en ces molécules : *Aphis craccivora*, *Aphis taraxacicola*, *Aphis pisum*, *Aphis Fabae*. Les 6 premières espèces appartiennent à la tribu macrosiphini alors que les 4 dernières à celle des aphidini. Nous pouvons donc bâtir une nouvelle hypothèse qu'il serait intéressant de tester : les espèces appartenant à la tribu des aphidini seraient moins sensibles à ces molécules que celles appartenant à la tribu des macrosiphini. Pour pouvoir tester cette hypothèse, il faudrait utiliser un protocole innovant d'infiltration de feuilles avec des solutions d'actifs pour pallier l'absence de milieu

artificiel adéquat pour la plupart des individus du genre *Aphis* que nous avons récoltée dans cette étude. Nous avons mis au point cette méthode en juillet 2021, cela nous ouvre donc de nouvelles perspectives (Baptée, Lecerf et al. in prep).

Conclusion

Ces résultats nous permettent de conclure qu'il existe de la variabilité de sensibilité au diCT entre populations de *M. persicae* mais qu'elle est suffisamment faible pour ne pas entraîner de résistance au champ. Cependant il faudra suivre de près l'évolution de ces variations si cette molécule est un jour appliquée à grande échelle, car alors la pression insecticide pourrait sélectionner les individus les moins sensibles. Pour une meilleure durabilité, la mise sur le marché de cette molécule devrait être faite à des doses limitant la sélection d'individus résistants, et en limitant le nombre de traitements par an. Il semble ne pas y avoir de résistances croisées entre insecticides de synthèse et le diCT, et les EST et GST ne semblent pas impliquées dans sa détoxification. Cependant, la quantité totale en protéine par individu semble être un bon indicateur de moindre sensibilité au diCT (effet faible). L'absence d'adaptation d'un clone de *M. persicae* après 10 générations passées sur une plante riche en 3,5-diCQ: la patate douce semble plutôt traduire l'incapacité de cette plante à mobiliser ce composé pour lutter contre une attaque de pucerons. La découverte d'un clone d'*A. craccivora* insensible aux diCT/3,5-diCQ semble montrer une cible moléculaire commune à ces 2 molécules avec l'existence d'un mécanisme de résistance à fort effet masquant l'effet de la quantité de protéines par individu. La piste de la spécificité d'action en fonction de la tribu d'appartenance des espèces de pucerons évoquée dans cette étude reste à explorer. En effet, ce niveau de spécificité ferait de ces molécules des agents de biocontrôle particulièrement peu impactant sur la biodiversité.

Chapitre 2.2 : Evolution des résistances du carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) au virus de la granulose (CpGV)

Les recherches menées sur cette question ont été réalisées dans le cadre des projets ANR RIB Carpores (2007-2009) et Européen PURE (2011-2015). Les personnes qui ont participé à ce travail sont : Benoit Sauphanor (IR) ; Carole Dirwimmer (CDD-AI) ; Aurélien Ducoux (stage M1) et Sandrine Maugin (TR).

Introduction

Le carpocapse *Cydia pomonella* est le principal insecte nuisible en vergers de pommiers, de poiriers et de noyers dans le monde entier. La lutte intensive à l'aide d'insecticides chimiques a conduit à la sélection de niveaux élevés de résistance aux insecticides chimiques actuellement disponibles (Boivin, Bouvier et al. 2004). *C. pomonella* est à la fois la cible de nombreux traitements et semble avoir une grande capacité d'adaptation aux contraintes environnementales. L'utilisation du *Cydia pomonella Granulovirus* (CpGV) constitue un moyen puissant et écologique de lutte contre ce ravageur, et devrait également permettre de réduire la sélection de la résistance aux insecticides chimiques. Il a été homologué pour la première fois en Europe en 1988. Depuis 2003, certains producteurs travaillant sous la charte de l'agriculture biologique ont indiqué une possible perte d'efficacité du seul isolat alors commercialisé : CpGV-M. Cette perte d'efficacité a entraîné une augmentation du nombre de traitements, des dommages sur les fruits et du nombre d'adultes pris dans des pièges à phéromones.

La sensibilité de ces populations de carpocapses au CpGV-M commercialisé a été évaluée en 2004 et 2005, en Allemagne (Fritsch, Undorf-Spahn et al. 2005) et en France (Sauphanor, Berling et al. 2006), respectivement. Dans les deux études, l'échec de la lutte contre le CpGV-M a été associé à une sensibilité réduite de la population de *C. pomonella* à la première formulation commerciale de ce virus (le rapport de résistance aux CL50 était alors de 13 000). D'après la première étude, le caractère de résistance semble être contrôlé par un seul allèle dominant situé sur le chromosome sexuel Z (Berling 2009). Mais des études ultérieures ont montré qu'un tel déterminisme génétique ne pouvait pas expliquer tous les cas de résistance et que d'autres gènes, autosomaux, expliquaient les légères variations de sensibilité à des doses intermédiaires existantes (Berling, Sauphanor et al. 2013). Dans la suite de notre étude, nous considérerons que l'allèle à fort effet situé sur Z est le principal responsable du phénotype résistant en négligeant les autres gènes à faibles effets.

Les tactiques d'alternance des insecticides et le relâchement temporel ou spatial de la pression de sélection peuvent limiter la résistance aux insecticides. Cependant l'efficacité de ces techniques de gestion des résistances repose sur l'hypothèse qu'il n'y a pas de résistance croisée entre différents insecticides utilisés (Roush and Tabashnik 1990) et que la valeur sélective des individus résistants est plus faible que celle des sensibles en absence de ce virus (Roush and McKenzie 1987). En effet, les changements génétiques associés à la résistance peuvent être accompagnés d'effets pléiotropes sur de nombreux traits d'histoire de vie. Ces coûts ont été observés chez d'autres espèces (cf. paragraphe C.b. de l'étude bibliographique). Les principales fonctions vitales connues pour être affectées par ces effets pléiotropes sont: la reproduction (fécondité, fertilité, communication sexuelle, succès d'accouplement), la croissance (durée de développement, la morphologie, la survie, la longévité), le comportement (capacité à s'alimenter, à fuir face à un stress), phénologie (synchronisation avec les saisons par exemple) (Boivin 2003). Les deux traits d'histoire de vie majeurs dans le potentiel adaptatif d'un insecte sont la durée de développement et la diapause (Roff 1980; Tauber, Tauber et al. 1986; Bradshaw, Holzapfel et al. 1998). La durée de la diapause doit permettre à un individu de survivre à des conditions environnementales défavorables, et une synchronicité entre membres d'une population pour qu'il

puisse y avoir reproduction (Leather, Walters et al. 1993; Hopper 1999). La modification de la date de levée de diapause chez les individus de *C. pomonella* résistants au CpGV-M pourrait avoir des conséquences importantes sur la gestion de cette résistance.

Hypothèse de travail

- La résistance de *C. pomonella* à CpGV-M est associée à un coût qui va limiter sa propagation dans le temps et l'espace en absence de traitement.

Matériel et méthodes

Comme les données utilisées pour cette partie proviennent de 4 années d'études 2006, 2008, 2009 et 2013, un travail d'harmonisation a été nécessaire. Cela explique pourquoi le jeu de donnée est parfois incomplet.

Individus sauvages

Les individus utilisés pour les mesures des traits d'histoire de vie : masse larvaire et nymphale, cinétique d'émergence, fécondité, fertilité proviennent directement de vergers commerciaux. Les larves diapausantes étant le stade le facile à piéger, elles ont été capturées l'année n-1 grâce à des bandes pièges cartonnées enroulées au niveau des troncs des pommiers à l'automne. La localisation de ces vergers est spécifiée en Annexe 3. Une fois piégées les larves sont identifiées, sexées, pesées, comptées puis reconditionnées dans des bandelettes de carton propres et laissées sous un abri à température extérieure pour laisser l'émergence des adultes se faire naturellement.

Souche de laboratoire

Une souche sensible de référence Sv qui a été créée à partir d'une population sauvage prélevée à St Andiol (13) et est élevée sans aucune pression de sélection insecticide au laboratoire depuis 1997.

Méthode

Aux printemps 2006, 2008, 2009 et 2013, les dates d'émergence de chaque papillon sauvage ont été notées. En 2006, les chrysalides sont pesées avant émergence. A l'émergence, les adultes ont été placés individuellement avec un partenaire vierge du sexe opposé dans des boîtes tapissées de parafilm, et contenant un abreuvoir, de manière à former des couples mixtes sauvage x souche. Les œufs produits sont récoltés et comptés au bout de 7 jours (cette opération est renouvelée une fois) puis placés dans de nouvelles boîtes où les larves néonates vont éclore. Chaque larve nouvellement née sera comptée puis utilisée pour réaliser des biotests en microplaque. Le protocole utilisé pour ces biotests et le même que celui décrit dans les deux articles du chapitre 1.

Chez les lépidoptères la femelle est hétérogamétique (ZW) et le mâle est homogamétique (ZZ). Comme le gène majeur de résistance de *C. pomonella* à CpGV-M est placé sur le chromosome sexuel Z (Asser-Kaiser, Fritsch et al. 2007) le taux de mortalité des descendants va nous permettre de connaître le génotype de son parent sauvage a posteriori. Si l'individu est sensible, 100% de sa descendance sera sensible. Si la mère sauvage est résistante, elle sera forcément hétérozygote, elle donnera donc naissance à 50% d'individus résistants (des mâles) et 50% de sensibles (des femelles). Si le mâle sauvage est hétérozygote, il donnera naissance à 50% d'individus résistants et 50% d'individus sensibles, avec des sexes-ratios équilibrés. Et enfin, si le mâle sauvage est homozygote résistant toute sa descendance sera résistante (Figure 32).

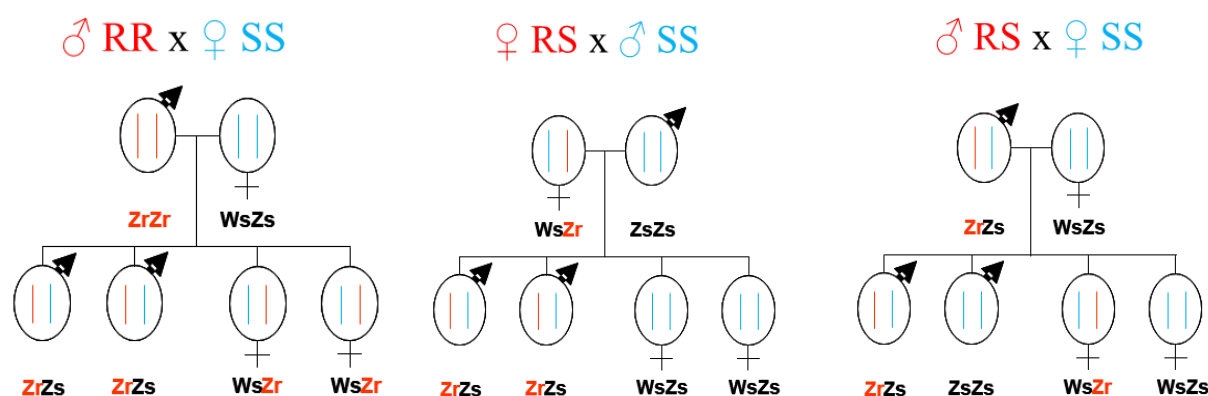


Figure 32 : Schéma théorique de la transmission de l'allèle de résistance suite à un rétrocroisement en fonction du génotype du parent porteur de la mutation située sur le chromosome sexuel Z (en rouge).

Nous avons réalisé des biotests à la concentration discriminante (6250 GV/ μ l), c'est-à-dire la concentration qui tue 100% des individus sensibles mais aucun des résistants, sur au minimum 10 larves néonates témoins (non traités) + 10 traitées par couple individuel. Le taux de mortalité corrigé est calculé grâce à la formule de Abbott (Abbott 1925). L'assignation des génotypes des individus sauvages a donc été faite grâce à l'observation des proportions de résistants dans leur descendance. Nous avons donc calculé la probabilité d'appartenir à un génotype à partir des données de mortalité corrigées des descendants (cf. paragraphe sur l'analyse de données). Les individus ayant des mortalités corrigées intermédiaires ou n'ayant pas eu suffisamment de descendants viables pour faire les biotests n'ont pas été classés et ont donc été retirés des analyses.

Au total, 5 507 individus ont été suivis pendant 4 ans : 1 458 en 2006, 1 924 en 2008, 1 119 en 2009 et 1006 en 2013. Mais seulement 906 ont pu être génotypés : 91 en 2006 ; 221 en 2008 ; 307 en 2009 et 287 en 2013. Les critères de notations ont pu changer au cours des années, ils ont été résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Nombre d'individus génotypés par type d'analyses et par année d'étude.

Variable mesurée	2006	2008	2009	2013
Masse chrysalides	91			
Masse larves		142	306	
Nombre d'œufs	91	188	307	237
Nombre de larves	91	221	307	286
Date émergence	91	206	307	287

Analyse de données

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R 4.1.1 (R Core 2013) et l'interface RStudio 1.3.1093 (RStudio 2021).

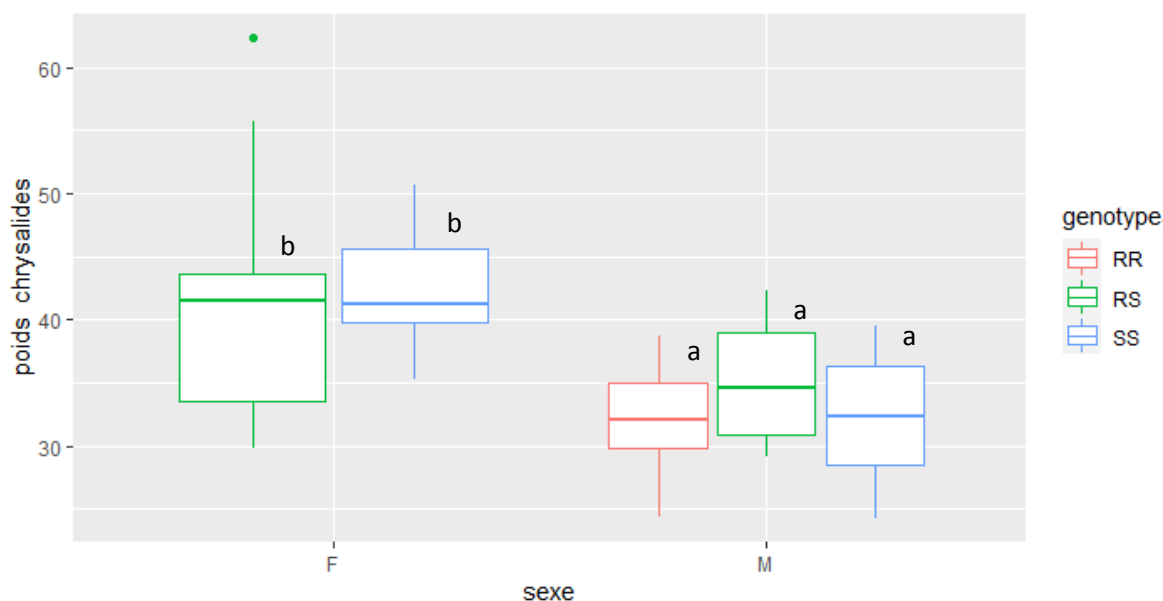
La variation de masse, de fécondité et de fertilité a été analysée à l'aide d'un modèle linéaire qui incluait l'origine des individus, l'année d'analyse et le sexe des individus sauvages comme variables explicatives fixes (package R lme4, fonction lm, Bates et al., 2015). Dans l'analyse des données de fertilité, le nombre de descendants par individu a subi une transformation ln. La significativité des effets a été testée avec des tests de Chi2 de comparaison de modèles (Anova dans le package car, (Fox and Weisberg 2018)). La dispersion des résidus du modèle a été inspectée à l'aide d'un tracé quantile-quantile (QQ) des résidus standardisés et leur uniformité et les valeurs aberrantes ont été inspectées à l'aide d'un tracé des résidus par rapport aux valeurs prédites. Les tests statistiques associés ont

également été effectués (package R DHARMA, Hartig, 2019). L'analyse des données d'émergence a été faite sur la base d'un modèle linéaire à effets mixtes, avec la parcelle d'origine en effet aléatoire, et l'année de prélèvement, le sexe et le génotype comme variables explicatives (fonction lmer, package lme4, Bates et al. 2015), mais la suite des analyses a suivi le même pipeline que précédemment.

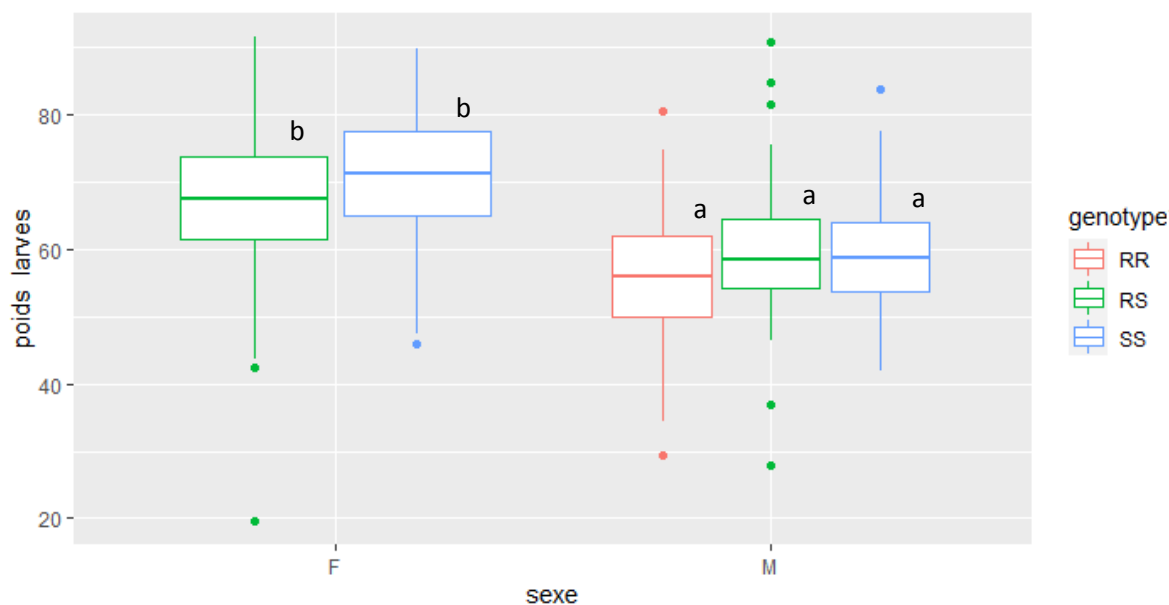
L'assignation des génotypes a été effectuée sur la base de la mortalité corrigée de leurs descendants. Ces mortalités corrigées sont arrondies sous forme de nombres entiers puis des tests de conformité aux lois binomiales supposant 0%, 50% ou 100% de descendants sensibles ont été effectués sachant que l'on considère que 95 % des individus sensibles meurent à la dose utilisée, et que 5% des individus résistants peuvent mourir à cette dose. Nous en avons déduit la probabilité d'appartenance à chacun des trois génotypes possibles (RR, RS ou SS). Lorsque la réponse était claire, c'est-à-dire, qu'une seule des trois p value obtenues est supérieur à 0,05 le génotype correspondant est attribué au parent sauvage. Sinon l'individu est éliminé des analyses.

Résultats

Les masses des larves diapausantes et des chrysalides sont identiques entre génotypes (masse larves : $F= 24,87$; $p>0,05$; masse chrysalides: $F= 22,77$; $p>0,05$), mais les femelles sont significativement plus lourdes que les mâles à ces deux stades de leur développement (masse larves : $F= 123,15$; $p<0,001$; masse chrysalides: $F= 65,72$; $p<0,001$) (Figure 33).



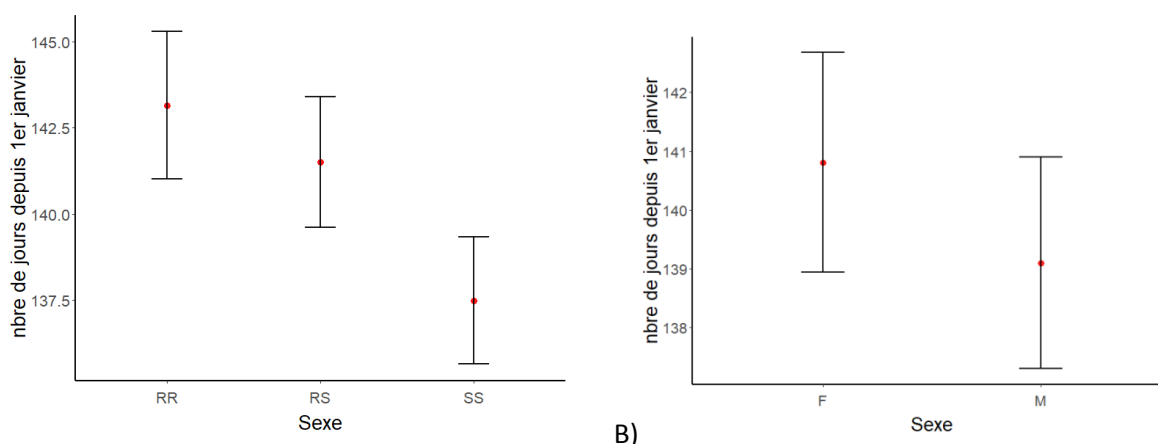
A)



B)

Figure 33 : A) Masse des chrysalides en mg sur les échantillons analysés en 2006 B) Masse des larves diapausantes en mg des échantillons de *C. pomonella* analysés en 2008 et 2009 en fonction de leur génotype et de leur sexe.

La cinétique d'émergence des adultes au printemps en fonction des génotypes peut nous donner des informations sur un éventuel coût à cette résistance se traduisant par des retards de vol au printemps. Les données obtenues sur 3 années (2008, 2009 et 2013) donnent des résultats identiques lorsque l'on compare les dates d'émergence en fonction du génotype bien que l'émergence soit très liée aux conditions climatiques. Les individus homozygotes résistants et hétérozygotes ne sont pas différents entre eux, ce qui va dans le sens d'un gène de résistance dominant qui est notre hypothèse de départ. Cependant nous observons un léger décalage temporel de 3,5 et 5,5 jours entre les individus résistants RS et RR respectivement et les sensibles, ce qui est significatif ($\text{Chisq}=17,79$ $\text{df}=2$ $p=0,0001$) (Figure 34). Nous observons un décalage encore plus ténu entre sexes de 1,8 jour avec une émergence précoce des mâles par rapport aux femelles ($\text{Chisq}=4,42$ $\text{df}=1$ $p=0,035$).



A)

B)

Figure 34 Durée estimée de l'émergence des adultes de première génération de *C. pomonella* (en jours) depuis le 1^{er} janvier de l'année étudiée en fonction de A) leur génotype de résistance à CpGV-M B) du sexe. Le modèle utilisé pour ces sorties a été construit sur 3 années (2008, 2009 et 2013).

Les femelles sauvages ont eu significativement plus de difficultés à se reproduire dans des conditions de laboratoire avec en moyenne 96,1 œufs pondus par couple en comparaison des mâles sauvages qui ont obtenu 125,4 œufs par couple ($F=56,20$; $df=1$; $p=1,5 \cdot 10^{-13}$). Aucune différence significative n'a été observée en fonction du génotype ni de l'année d'étude ($F= 9,15$ $p>0,05$) (Figure 35).

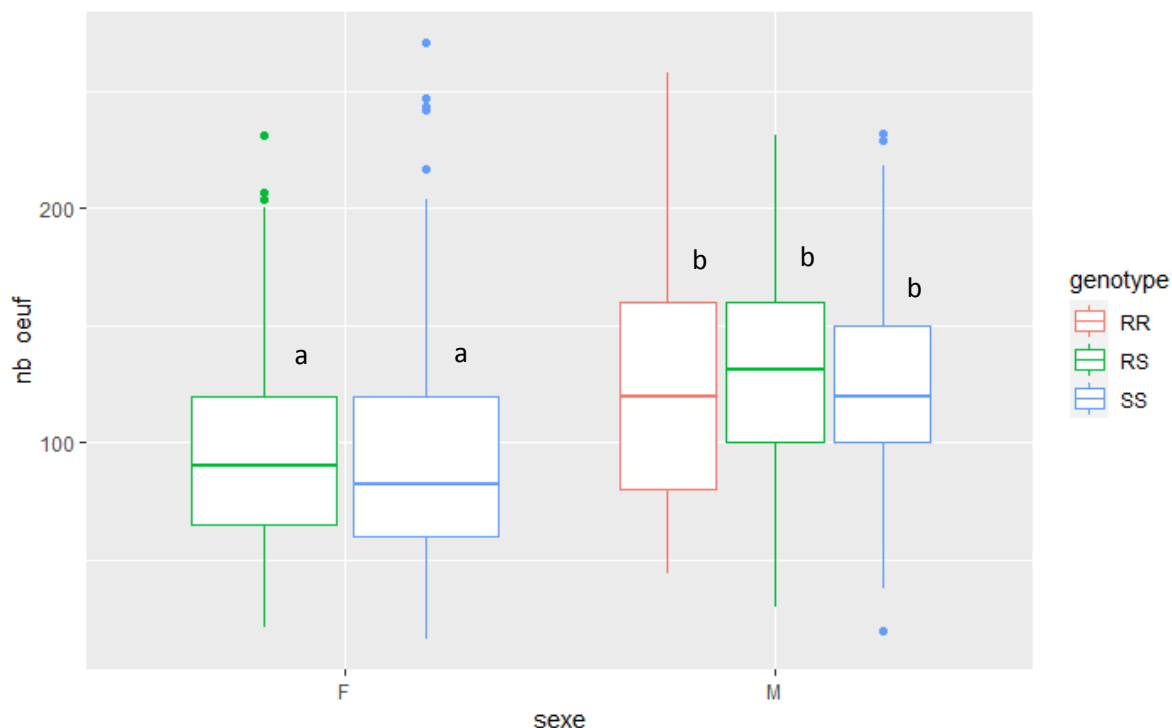


Figure 35 : Répartition de la fécondité de *C. pomonella* (nombre d'œufs pondus par couple mixte sauvage x souche) en fonction du génotype du partenaire sauvage. Le sexe spécifié sur l'axe des abscisses correspond à celui du partenaire sauvage.

Le nombre de descendants des individus sauvages a été estimé à une moyenne à 57,6 larves/couple sur 385 femelles sauvages et à 75,4 larves/couples sur 520 mâles sauvages. Comme pour la fécondité nous n'observons pas d'effet du génotype des parents sauvages sur la fertilité ($F= 33,9$ $p>0,05$). Et nous observons la même différence significative que pour la fécondité entre sexes ($F= 27,55$ $p=1,53 \cdot 10^{-7}$) (Figure 36).

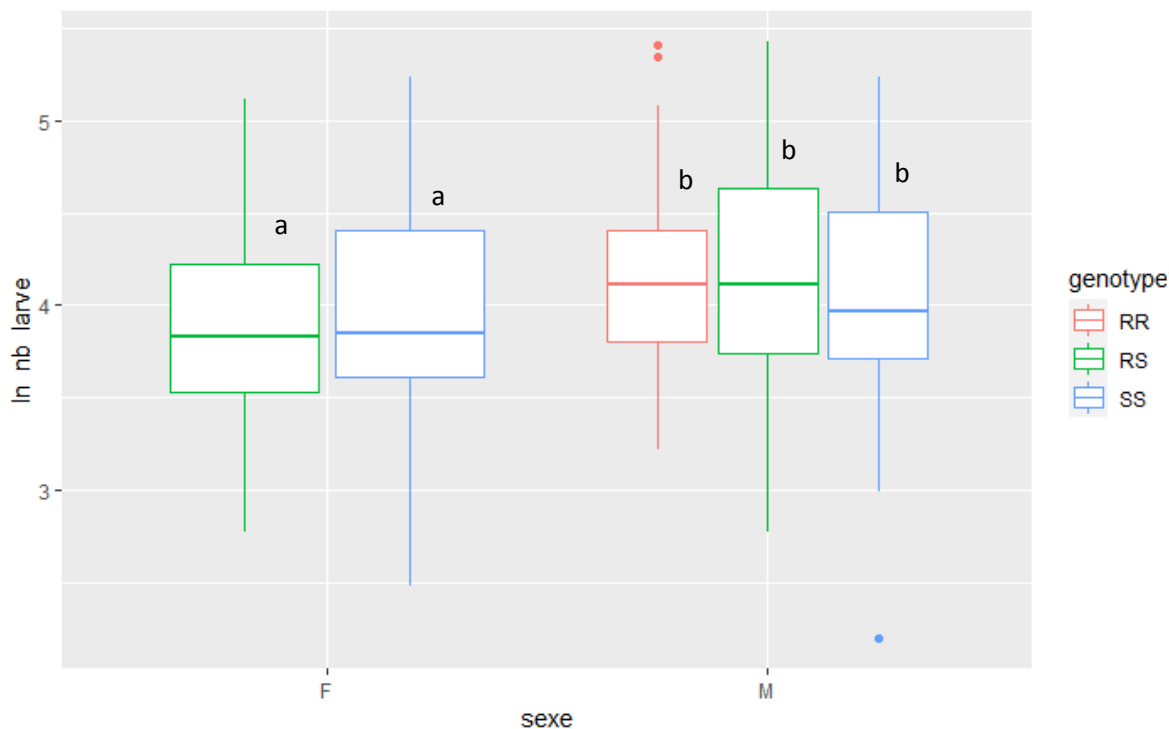


Figure 36 : Répartition des fertilités (logarithme népérien du nombre de larves néonates par couple mixte sauvage x souche) en fonction du génotype du partenaire sauvage et de son sexe. Le sexe spécifié sur l'axe des abscisses correspond à celui du partenaire sauvage.

Discussion

La résistance du carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) au virus de la granulose CpGV ne montre pas d'effet pléiotrope important en absence de pression de sélection. Certains traits d'histoire de vie observés, poids, fécondité, fertilité ne diffèrent ni entre génotypes, ni phénotypes ce qui est contraire à ce qui a été observé chez des individus de cette espèce résistants à des insecticides de synthèse (Boivin, Chabert d'Hieres et al. 2001). Les individus résistants émergent légèrement plus tardivement au printemps que les sensibles, mais cette différence est ténue. Nos résultats ne nous permettent pas de réfuter entièrement l'hypothèse selon laquelle la résistance de *C. pomonella* à CpGV-M serait associée à un coût physiologique mais ils vont en ce sens. Ils sont en phase avec ceux de Undorf-Spahn *et al.* qui ont observé le maintien d'individus résistants dans leur population pourtant composée au départ de 30% d'individus sensibles et 70% d'individus résistants à CpGV-M, et ce après 60 générations sans pression de sélection. Ce qui suggère un coût de cette résistance très bas voir inexistant en condition de laboratoire (Undorf-Spahn, Fritsch et al. 2012). Si cette résistance a des origines lointaines (variation continue) ce manque de coût pourrait être imputés à des mécanismes compensatoires qui ont mitigé les effets pleiotropes au fil des années (McKenzie and Whitten 1982; Morton 1993; Lenski 1998; Lee and Kwon 2011).

Une étude datant de 1999 a montré que des individus de *C. pomonella* homozygotes résistants au diflubenzuron, un insecticide régulateur de croissance, et à la deltaméthrine, un pyréthroïde, émergent plus précocement que des individus sensibles après 110 jours à 2°C (Sauphanor, Bouvier et al. 1999), mais les mêmes souches lorsqu'elles sont testées dans des conditions de froid naturelles ne diffèrent pas (Boivin, Bouvier et al. 2003). L'émergence des papillons issus de larves diausantes fluctue avec les variations saisonnières mais doit permettre une synchronisation avec la source de nourriture et

les partenaires sexuels (Hopper 1999). L'absence de variation marquée sur ce trait d'histoire de vie chez les carpocapses des pommes résistants à des insecticides chimiques comme au CpGV pourrait s'expliquer par la trop forte pression sélective qui pèse sur ce critère.

La fécondité et le poids larvaire du carpocapse des pommes sont dégradés chez des individus résistants au diflubenzuron ou à la deltaméthrine (Boivin, Chabert d'Hieres et al. 2001) contrairement à ce que l'on observe pour la résistance au CpGV. *Drosophila melanogaster* a également développé des résistances au DDT sans qu'aucun coût n'y soit associé (McCart and Buckling 2005) le mécanisme en jeu serait une modification d'un gène de CYP6B1 par un élément transposable. Il existe même des individus du petit ver de la farine (*Tribolium castaneum*) résistants au malathion, un carbamate, qui sont plus compétitifs que leurs homologues sensibles (Arnaud and Haubruge 2002). Cette notion d'effet pleiotrope est donc très variable d'une résistance à l'autre, et il n'y a pas de règles qui régissent les coûts aux résistances. Enfin, comme le disent Lenormand et al. dans leur review une résistance n'a pas un coût mais autant de coûts que d'environnement (en l'absence de traitement). Il est donc très difficile d'essayer de cerner toute cette complexité pour transcrire ce qu'il se passe réellement dans la nature (Lenormand, Harmand et al. 2018).

Dans l'absolu, un coût à la résistance faible voire nul devrait se traduire par le maintien voire la propagation d'individus résistants au sein des populations sauvages. La répartition de cette résistance sur le territoire français a été suivie durant 11 années de 2006 à 2016 au moyen de biotests (Siegwart, Graillot et al. 2017). Sur cette période, des individus résistants ont été observés dans tous les bassins de production malgré l'utilisation de nouveaux isolats de CpGV efficaces sur les insectes résistants (Figure 37). Les premières résistances ont été détectées en 2005 dans la région avignonnaise où les proportions d'insectes résistants restent actuellement élevées malgré une sensibilisation des acteurs locaux à cette problématique.

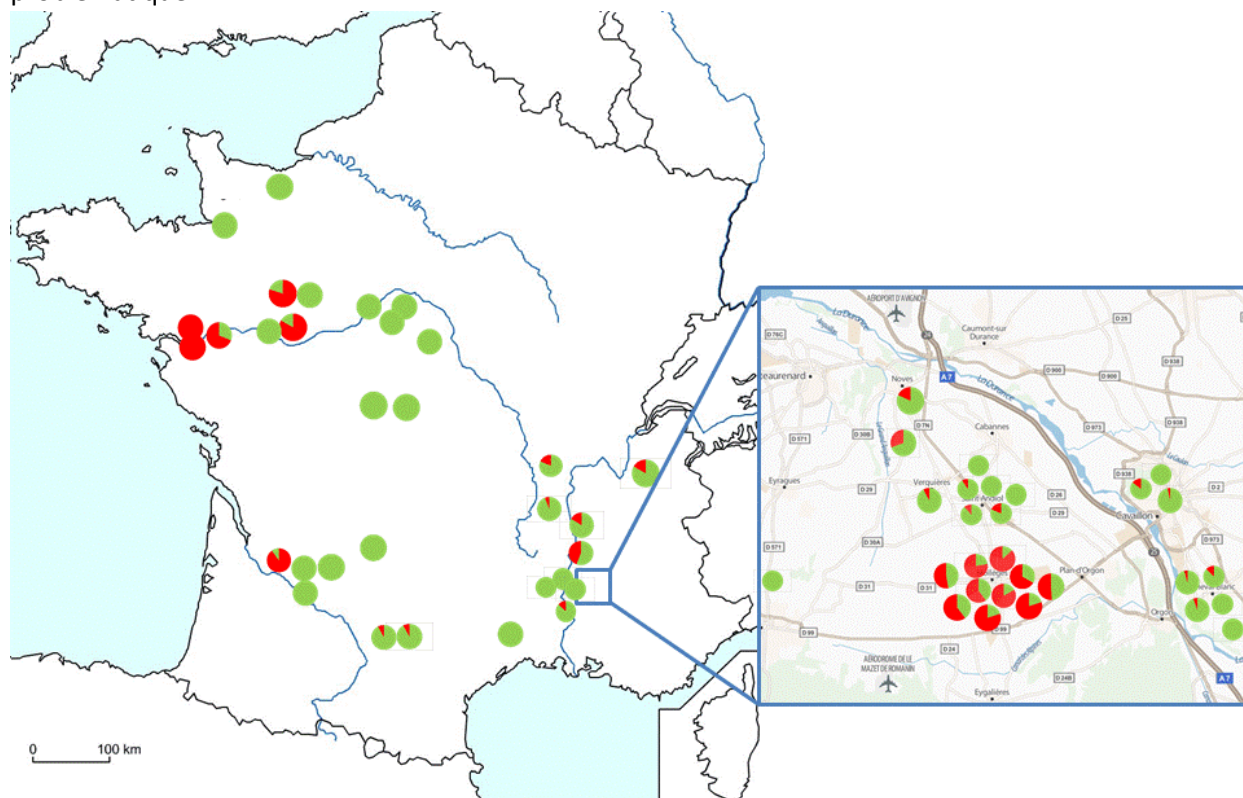


Figure 37 : Répartition des individus résistants (en rouge) sur le territoire français piégés sur 11 années d'étude de 2006 à 2016. Chaque camembert représente une population la proportion de rouge correspond à la proportion d'individus résistants sur l'ensemble des années.

Cette omniprésence a également été détectée à une échelle géographique plus large. Ainsi en Europe, plus de 40 vergers de pommiers abritent des populations de carpocapse résistantes au CpGV-M en Autriche, en République tchèque, en Allemagne, en France, en Italie, aux Pays-Bas et en Suisse (Schmitt, Bisutti et al. 2013; Zichová, Stará et al. 2013). Les auteurs de ces études expliquent ce phénomène par la préexistence de l'allèle de résistance (variation continue) sur l'ensemble de l'aire de répartition du carpocapse des pommes. Il se serait maintenu malgré la dérive génétique grâce à une bonne fitness des individus qui le portent et aurait été sélectionné suite à l'utilisation massive de CpGV-M comme insecticide en Europe.

Ces observations posent une question : si le phénotype résistant est compétitif même en absence de pression de sélection, alors pourquoi le phénotype sensible existe toujours ? Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- la première va à l'encontre de ce qui a été proposé plus haut comme explication : la modification génétique à l'origine de cette résistance est récente (mutation *de novo*). Elle se propage rapidement car cet insecte est très mobile, comme le montre l'absence de structuration de ces populations en Europe (Franck, Reyes et al. 2007) et elle va finir par se généraliser
- il existe des effets pléiotropes que nous n'avons pas réussi à détecter
- l'utilisation d'insecticides de synthèse efficaces sur les résistants au virus est pratiquée sur la majorité des zones de production de pomme. Cela casse la dynamique d'augmentation de fréquence de cet allèle tant que des résistances multiples aux insecticides de synthèse et au CpGV-M n'apparaissent pas.

Une meilleure connaissance de l'allèle responsable de ce phénotype nous permettra de répondre à cette question.

Des cas de résistance à des baculovirus associés à des coûts ou non ont déjà été décrits dans la littérature. Une souche résistante de fausse arpentuse du chou (*Trichoplusia ni*), sélectionnée en laboratoire pour sa résistance au *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* (TnSNPV) ne diminue pas en absence d'exposition au virus pendant neuf générations (Milks, Myers et al. 2002). Par contre, Fuxa et Richter (Fuxa and Richter 1989) ont montré que les larves résistantes d'une souche de laboratoire de *Spodoptera frugiperda* sélectionnée pour la résistance au *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) sont redevenues presque totalement sensibles en huit générations en l'absence de pression virale. Un tel retour au niveau initial de sensibilité a également été observé pour une population de laboratoire d'*Anticarsia gemmatalis* résistante au *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) en trois générations en l'absence de pression virale (Fuxa and Richter 1998).

Le mécanisme de résistance de *T. ni* à un baculovirus ne présentant pas de coût n'a pas encore été élucidé mais il semblerait y avoir un double blocage dans le cycle de développement viral au niveau de l'infection primaire : dans le tube digestif et secondaire : dans l'hémolymphe (Nakai, Takahashi et al. 2017). Chez *C. pomonella* le mécanisme de résistance semble plutôt bloquer toute la réplication virale au début de l'infection secondaire (Berling, Blachere-Lopez et al. 2009; Wennmann, Pietruska et al. 2021). L'origine de cette résistance fait encore l'objet de recherche, et peut être que la génomique nous permettra d'élucider ce point (chapitre 3).

Discussion du chapitre 2

La première partie de ce chapitre questionne le potentiel adaptatif préacquis par des pucerons avant l'utilisation d'un biopesticide botanique. En 1998 Futuyma définit la préadaptation comme « la possession de toutes les propriétés nécessaires pour permettre un déplacement vers une nouvelle niche ou un nouvel habitat (Futuyma 1998). Une structure est préadaptée pour une nouvelle fonction, si elle peut assumer cette fonction sans modification évolutive ».

Dans notre étude, nous avons d'abord cherché cette préadaptation à travers l'existence d'écotypes¹, pour cela nous avons échantillonné différentes populations d'une même espèce évoluant dans des environnements contrastés en termes de pression insecticides. Nos résultats confirment l'existence de différences significatives de sensibilité au diCT entre elles illustrant bien une certaine variabilité adaptative décrite en introduction générale. Celle-ci serait peut-être liée à la vigueur des individus (ici approchée via la quantité de protéine totale par individu). Cependant, elle a une action limitée ne permettant pas aux individus les moins sensibles de résister à la dose de 1 mM de diCT. Dans l'optique de l'utilisation du diCT comme produit de biocontrôle à des concentrations supérieures, cette moindre sensibilité n'apporterait aucun avantage sélectif (effet seuil). Dans la mesure où dans la réalité les doses appliquées ne sont pas toujours parfaitement maîtrisées, il est probable qu'une pression moindre puisse sélectionner les individus les moins sensibles et faire évoluer des populations vers des niveaux de résistance plus élevés (Roush and McKenzie 1987 ; (Daborn and Le Goff 2004).

Dans un deuxième temps nous avons recherché des traces de pré-adaptation aux diCT/3,5-diCQ entre espèces de pucerons. La période adaptative nécessaire à la spéciation étant sans commune mesure avec celle observée entre écotypes. Ce recul nous a permis de mettre en évidence une « réelle » résistance à nos deux produits de biocontrôle. Il existe donc dans la nature un moyen préexistant d'être insensible à ces deux aphicides. Cependant, en l'état de nos connaissances nous ne pouvons pas savoir si cette insensibilité est généralisée au sein de l'espèce *A. carccivora* ou si c'est l'apanage uniquement de certains clones ; ni si elle est due à une capacité de détoxication ou à l'existence d'une cible moléculaire différente ou encore à l'absence d'un récepteur. Les hypothèses quant à la nature de cette résistance peuvent être nombreuses, par exemple en vergers *C. pomonella* n'est pas affecté par les traitements avec du Bt grâce à son comportement alimentaire original (Andermatt, Mani et al. 1988), et seules des recherches supplémentaires pourraient nous éclairer sur ce point. Nous pouvons quand même conclure, qu'il faut rester très prudents dans l'utilisation de ces substances au champ. En effet leur grande sélectivité et faible rémanence (Poessel, Collet et al. 2014) en font de très bons candidats pour une agriculture à faible impact sur l'environnement, ce qui pourrait attirer beaucoup d'utilisateurs conduisant à un contournement rapide. Leur utilisation doit donc s'accompagner de préconisations drastiques pour gérer les résistances dès leur première mise sur le marché.

Les résultats de la deuxième partie de ce chapitre vont dans le sens d'un cout réduit à la résistance de *C. pomonella* à un granulovirus (CpGV-M) utilisé comme bioinsecticide qui laisse présager un maintien de ces résistances dans le temps et l'espace. Ces résultats questionnent un présupposé répandu : les bioinsecticides n'engendrent pas de résistances contrairement aux insecticides de synthèse (Leng, Zhang et al. 2011; Tangtrakulwanich and Reddy 2014). Les biopesticides sont souvent présentés comme

¹ Écotype : « un ensemble de souches utilisant les mêmes ressources écologiques, de telle sorte que l'apparition d'un mutant adaptatif au sein de l'écotype va conduire à l'extinction de toutes les autres souches du même écotype, mais ne va pas influencer sur la survie des souches provenant d'autres écotypes. » (Cohan, 2006)

étant des solutions dans la gestion des résistances aux insecticides chimiques mais leur propre contournement est rarement évoqué voir minimisé (Regnault-Roger, Philogène et al. 2002; Suty 2010; Villaverde, Sandín-España et al. 2016) ; (Singh 2014). Or, il se trouve que la longue co-évolution entre les produits d'origine naturels et les ravageurs laisse tout le temps nécessaire à la mise en place d'allèles ou de mécanismes plastiques même à faible fréquence dans les populations. Et agriculture intensive oblige, les faibles efficacités des produits de biocontrôle sont compensées par des utilisations massives augmentant la pression de sélection (Siegwart, Graillet et al. 2015). Je laisse donc la question ouverte : les bioinsecticides ne seraient-ils pas au contraire plus sujets à l'apparition de résistance que leurs homologues de synthèse ? Et ne faudrait-il pas les en préserver le plus tôt possible à la lumière de ce que nous avons appris après 70 ans d'agriculture moderne.

CHAPITRE 3 : En quoi la génomique modifie-t-elle l'image que nous avons de la résistance chez le carpocapse des pommes ?

La démocratisation des NGS constitue une importante avancée méthodologique dans la recherche sur les liens entre génotype et phénotype. Jusque-là notre vision des gènes impliqués dans les fonctions essentielles d'un organisme était partielle et complexe à établir. L'application des outils de génomique à des modèles d'écologie aide à répondre à des questions essentielles sur le nombre de gènes impliqués dans une adaptation, le type de variation génétique ou leur préexistence à un stress environnemental (Stapley, Reger et al. 2010). En particulier, la connaissance des bases génétiques des résistances aux insecticides pour mieux en comprendre les mécanismes a bénéficié de cette révolution NGS (Oakeshott, Home et al. 2003). J'illustrerai cette affirmation en décrivant comment le séquençage intégral et la création d'un génome de référence sur *C. pomonella* a ouvert de nouvelles perspectives sur nos connaissances de ses résistances aux insecticides. Ce chapitre présente les résultats de mes recherches, la plupart publiés dans une étude plus large présentant le génome du carpocapse des pommes (Wan, Yin et al. 2019). Les personnes qui ont participé à ce travail sont : Jérôme Olivares (TR) ; Sandrine Maugin (TR) et Bertrand Gauffre (CR). En perspectives, je présenterai les questions de recherche auxquelles je m'efforce de répondre actuellement dans des projets en cours (SMaRT, BaGERA-thèse Mathilda Idir, MULTI-RES-CpGV + future thèse Cifre Sofian Renoult).

Introduction

Le carpocapse des pommes, *C. pomonella*, est le principal ravageur des vergers de pommiers, de poiriers et de noyers dans l'ensemble de l'aire de répartition mondiale de ces espèces de fruits (Blommers 1994). Cet insecte appartient à la famille des Tortricidae. La présence de larves dans le fruit le rend impropre à la commercialisation. Les faibles marges économiques imposent une limitation drastique des infestations de fruits, qui est gérée principalement par une lutte chimique intensive. Suite à l'utilisation massive d'insecticides dans les vergers, le carpocapse a développé depuis les années 80 des résistances à différentes familles d'insecticides aux États-Unis et dans divers pays européens (Bush, Abdel-AAL et al. 1993; Knight, Brunner et al. 1994; Sauphanor and Bouvier 1995; Reyes, Barros-Parada et al. 2015). Des cas de résistance aux insecticides ont également été signalés en Amérique du Sud et en Afrique du Nord (Reyes, Franck et al. 2009; El Iraqui el Houssaini, Hmimina et al. 2012; Franck, Siegwart et al. 2012; Reyes, Barros-Parada et al. 2015).

Les mécanismes les plus décrits comme impliqués dans la résistance aux insecticides de *C. pomonella* correspondent au mécanisme métabolique de détoxification, impliquant des MFO, GST et, dans une moindre mesure, de la suractivité d'EST (Reyes, Franck et al. 2007; Reyes, Franck et al. 2009). En outre, des mécanismes d'insensibilité à une famille chimique spécifique sont connus dans certaines populations, tels que la mutation *kdr* dans le canal sodique voltage-dépendant (Bouvier, Bues et al. 2001; Brun-Barale, Bouvier et al. 2005) et une acétylcholinestérase modifiée (Cassanelli, Reyes et al. 2006), induisant respectivement des résistances aux pyréthrinoides et aux OPs. Des recherches menées à l'INRA d'Avignon depuis les années 80 montrent aussi que cet insecte est capable de développer des résistances croisées qui sont particulièrement problématiques sur le terrain. De manière générale chez les insectes, on sait qu'elle sont souvent liées à de la détoxification (Oakeshott, Devonshire et al. 2005; Li, Schuler et al. 2007; Nauen 2007; Carvalho, Azeredo-Espin et al. 2010; Farnsworth, Teese et al. 2010).

Dans leur étude globale sur la variabilité mondiale de sensibilité aux insecticides, Reyes et al. (2009)

notent que deux populations résistantes à la même chose peuvent avoir des mécanismes de résistance différents. De plus, il existe des mécanismes de résistance restants inconnus chez *C. pomonella* : par exemple, aucun des systèmes enzymatiques n'a montré une activité accrue dans une population arménienne résistante à sept insecticides de différentes familles chimiques (Reyes, *et al.*, 2009). De même, la résistance à un insecticide peut avoir évolué indépendamment plusieurs fois comme on l'a observé pour l'origine de la mutation *kdr* (Franck, Siegwart *et al.* 2012). Il est important de dresser un tableau plus complet des bases moléculaires associées à la résistance du carpocapse aux insecticides chimiques pour connaître les mécanismes de résistance mais également pour créer des outils de détection moléculaire haut débit. Les NGS ont permis d'initier des recherches plus exhaustives sur les différents gènes impliqués dans les résistances chez d'autres insectes (Ranson, Claudianos *et al.* 2002; Oakeshott, Home *et al.* 2003; Faucon, Dusfour *et al.* 2015; Meisel and Scott 2018). Dans ces études, les auteurs ont étudié un maximum de gènes potentiellement impliqués dans les différents mécanismes de résistance. Le premier bénéfice a été de faire un catalogue de gènes appartenant aux familles pertinentes. Ceci a été surtout bénéfique pour les mécanismes complexes de résistance contrairement aux cibles moléculaires qui sont pour la plupart monogéniques. Les résistances par augmentation des barrières physiques (mécanisme n°2 de la R4P) correspondent par exemple aux gènes impliqués dans la synthèse et la maturation de la cuticule de l'insecte, pour les résistances par efflux ou séquestration intracellulaire (n°3 et 4 de la R4P) les gènes de transport ABC sont listés. Le nombre de gènes par catégorie de mécanisme de résistance donne donc une information sur le rôle qu'ils peuvent jouer dans l'apparition de résistance. Les NGS permettent même d'être plus précises car au sein d'une catégorie de mécanisme certaines familles d'enzymes peuvent se différencier. Par exemple, la famille des CYP qui appartient au mécanisme de détoxification ressort comme majoritaire dans ces études et semble donc jouer un rôle important dans les mécanismes de résistance des insectes (Ranson, Claudianos *et al.* 2002). Peu d'orthologues ont été trouvés parmi ces gènes entre *D. melanogaster* et *A. gambiae*, ce qui laisse penser que leur origine provient plus probablement d'évènements de duplication avant la divergence entre ces deux espèces (Oakeshott, Home *et al.* 2003). Cette hypothèse fait écho avec l'organisation de ces gènes en cluster qui peut être une marque de duplication génique (Reams and Neidle 2004). Une telle organisation peut présenter un avantage sélectif par autostop génique puisque lorsqu'un allèle mutant est sélectionné il va emporter avec lui les gènes proximaux. Si ceux-ci sont également des gènes de détoxification modifiés ou amplifiés, cela augmente les capacités de l'insecte dans ce domaine (Oakeshott, Home *et al.* 2003).

Objectifs et questions de recherche

Le premier objectif de cette étude a été d'identifier et d'annoter manuellement et de façon la plus exhaustive possible les gènes qui pourraient être impliqués dans les résistances aux insecticides de synthèse ou d'origine naturelle dans le génome du carpocapse des pommes nouvellement séquencé. Ce travail a été réalisé dans l'objectif d'utiliser ces connaissances pour élucider les mécanismes moléculaires en place dans ces phénomènes adaptatifs. Le second objectif a été d'essayer de déterminer quels gènes pourraient être responsables de résistance croisée à la deltaméthrine et l'azinphos-méthyl chez cet insecte.

Les questions de recherche ici posées sont les suivantes :

- Est-ce que le nombre de gènes candidats et leur répartition dans les différentes familles de gènes sont comparables à ce qui a déjà été observé chez d'autres espèces ?
- Est-ce que les gènes candidats sont répartis de manière aléatoire le long du génome, ou en cluster ?
- Quelle mutation est impliquée dans la résistance croisée de *C. pomonella* à deux substances actives de familles chimiques et mode d'action différent ?

Matériel et méthode

Insectes

Trois souches de laboratoire résistantes (Rgv, RΔ et Raz) et une sensible (Sv) ont été utilisées dans cette étude. Une population sauvage a été collectée en 1995 dans un verger de pommiers aux Vignères (commune proche d'Avignon) où la deltaméthrine n'a pas permis de contrôler les populations de carpocapses. La souche résistante RΔ dérive de cette population sauvage par sélection pendant 10 générations à des doses croissantes de deltaméthrine. La souche sensible Sv a également été obtenue à partir de cette même population. La sélection des individus sensibles a été possible grâce à un phénotypage des descendants de couples individuels sur une dose discriminante de deltaméthrine. Les frères et sœurs des individus sensibles ont été conservés et reproduits entre eux. Ce protocole a été répété sur 10 générations (Sauphanor, Bouvier et al. 1998). Les souches Sv et RΔ proviennent donc de la même population source et ne diffèrent que par leur capacité à résister à la deltaméthrine. Nous avons donc jugé approprié de comparer les variations génomiques de ces deux souches sœurs. Ces deux souches ont été conservées en élevage de masse sur milieu artificiel (Guennelon, Audemard et al. 1981). La seconde souche résistante, Raz, provient d'une population collectée dans un verger de pommiers de la région de Lerida (Espagne), et a été fournie par le Dr. Jesus Avilla en 2004. Les insecticides principalement utilisés pour réduire les populations de *C. pomonella* dans ce verger étaient à base d'azinphos-méthyle, un OP devenu inefficace sur les insectes cibles. Comme pour RΔ, les 10 premières générations de cette population résistante ont été sélectionnées à l'INRA d'Avignon par exposition à des concentrations croissantes d'azinphos-méthyle induisant une mortalité de 50%. Cette souche a ensuite été élevée en masse comme les deux précédentes pendant plus de vingt ans. Enfin, la souche Rgv a été créée à partir d'une population résistante au virus de la granulose (CpGV) récoltée à l'automne 2004 dans un verger conduit selon la charte de l'agriculture biologique dans la commune de St-Andiol, Bouches-du-Rhône. Des échecs de traitements au virus de la granulose isolat M (CpGV-M) avaient été mis en évidence plusieurs années de suite. Les insectes résistants ont été sélectionnés à la concentration discriminante de 2 500 granules viraux/ μ l définie comme létale pour 95 % des individus sensibles (Sauphanor, Berling et al. 2006). Le caractère de résistance a été introgressé pendant 9 générations dans le fond génétique de la souche Sv par rétrocroisements suivi de sélection à la dose discriminante (Berling, Blachere-Lopez et al. 2009).

Sv n'a jamais été exposée aux insecticides. RΔ et le Raz ont été soumis à une pression de sélection à chaque génération en exposant les larves à la deltaméthrine (2 mg L⁻¹) et à l'azinphos-méthyle (375 mg L⁻¹) respectivement. Les insecticides ont été pulvérisés à la surface du milieu artificiel avant la pénétration des larves nouvellement écloses (Sauphanor, Brosse et al. 2000). Cette pression de sélection a été relâchée pendant quelques générations au cours des dix dernières années. Quant à la souche Rgv, très stable, une pression de sélection à la dose discriminante n'a été opérée qu'une fois par an.

Les mécanismes de résistance et bases génétiques de ces trois souches avaient été étudiés avant ce projet de génomique, et partiellement élucidés. La souche RΔ est connue pour avoir une mutation appelée *kdr* dans le gène para qui est la cible moléculaire des pyréthriinoïdes (Brun-Barale *et al.*, 2005). On sait également qu'elle a des activités de détoxification accrues avec une activité 7,3 fois supérieure en MFO. La souche Raz porte une mutation appelée MACE dans le gène de l'acétylcholinestérase *ace1* qui est la cible moléculaire des OPs (Cassanelli, Reyes et al. 2006). Cette souche a également une capacité de détoxification remarquable puisque ses MFO sont 37,6 fois plus actives que celles de la souche Sv et que ses glutathion-S-transférases sont 2,8 fois plus actives (Reyes and Sauphanor 2008). Enfin le mécanisme de résistance de Rgv est encore mal connu. Nous savons seulement qu'il existe un allèle à

très fort effet qui est dominant et situé sur le chromosome sexuel Z, et qu'il existe aussi des allèles à effets plus faibles sur des autosomes (Berling, Sauphanor et al. 2013).

Génome de référence

En 2017, nos partenaires chinois nous ont donné une première version du génome de référence du carpocapse des pommes, obtenu après séquençage via des techniques illumina suivies par une deuxième série de reséquençage avec la technique Pac-Bio (CpomGenome-1 OGS01). Une deuxième version améliorée a ensuite été fournie et publiée en 2019 (Wan, Yin et al. 2019).

Annotation du génome

L'objectif est de créer une solide base de données de gènes candidats impliqués dans les résistances (Figure 38). Pour cela, j'ai tout d'abord recherché tous les gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux insecticides chimiques sur la base de l'annotation automatique du génome (premier jeu de gènes officiel, CpomGenome-1) en utilisant la liste de mots clés suivante définie selon mes connaissances des bases génétiques de résistances : P450 ; carboxylesterases ; glutathione S-transferase ; acetylcholin receptor ; octopamine receptor ; muscarinic receptor ; tryptamine receptor ; tyramine receptor ; dopamine receptor ; receptor ecdysone ; ryanodin receptor ; cuticular ; chitinase ; acetylglucosaminyl transferase ; ABC-transporter ; multidrug resistance ; glucuronyltransferase ; peroxidase ; alcohol dehydrogenase ; sulfotransferase ; oxydase ; oxydoréductase ; fucosyltransferase ; phenoloxidase avec le logiciel Ugene (Okonechnikov, Golosova et al. 2012).

Une fois qu'une première liste de gènes a été obtenue grâce à cette recherche par mot clef, nous avons exploré chacune de leurs séquences d'acides nucléiques et d'acides aminés. Les séquences protéiques de tous ces gènes ont été blastées dans la base de données NCBI pour vérifier l'identité de ces gènes et éliminer les candidats inappropriés ou partiels (NCBI 2021). L'annotation de chaque gène candidat a donc pu être précisée et catégorisée dans les différents sous-groupes enzymatiques par exemple. Cette étape de vérification a également été accompagnée d'un PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) afin de vérifier si les domaines protéiques correspondant à chaque famille de gènes étaient bien présents dans le gène annoté.

En parallèle de cette approche, toutes les séquences protéiques des gènes non caractérisés (Unknown protein) dans CpomGenome-1 OGS01, la première version du génome de référence, ont également été passées au crible grâce à un système de Blast dans la banque de gènes NCBI pour vérifier si des gènes supplémentaires pouvaient être ajoutés à la liste. Puis, nous avons créé une sous-base de données listant les séquences d'acides aminés consensuelles des principaux domaines protéiques caractérisant les différentes familles de gènes définies. Pour cela nous avons extrait ces séquences depuis la base de données d'NCBI intitulée conserved domains (NCBI-Conserved_domains 2021) (Annexe 4). Nous avons recherché la présence de ces domaines protéiques dans le génome de référence sans a priori pour identifier des gènes supplémentaires.

Enfin, un transcriptome a été créé avec l'outil en ligne Gensas (Humann, Lee et al. 2019). Pour cela toutes les données de RNAseq sur *C. pomonella* actuellement publiées sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP083782>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP060413> ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP181710+>) ont été regroupées et chargées sur le serveur Gensas. Les reads ont été mappés sur la deuxième version du génome de référence avec TopHat (Trapnell, Pachter et al. 2009) et Hisat2 (Zhang, Park et al. 2021). Les prédictions ont été faites avec Braker (Hoff, Lomsadze et al. 2019). La structure des gènes candidats déjà identifiés est ainsi vérifiée et corrigée en les comparant à ce transcriptome. Nous utilisons également un deuxième outil pour manipuler ce transcriptome : IGV (Thorvaldsdóttir, Robinson et al. 2013). Dans ce cas toutes les données de RNAseq sont fusionnées en un seul consensus avec l'outil StringTie (Pertea, Pertea et al. 2015). Les annotations automatiques ont identifié 17 184 gènes sur l'ensemble du génome de *C. pomonella* alors que notre transcriptome « maison » en compte 29 687.

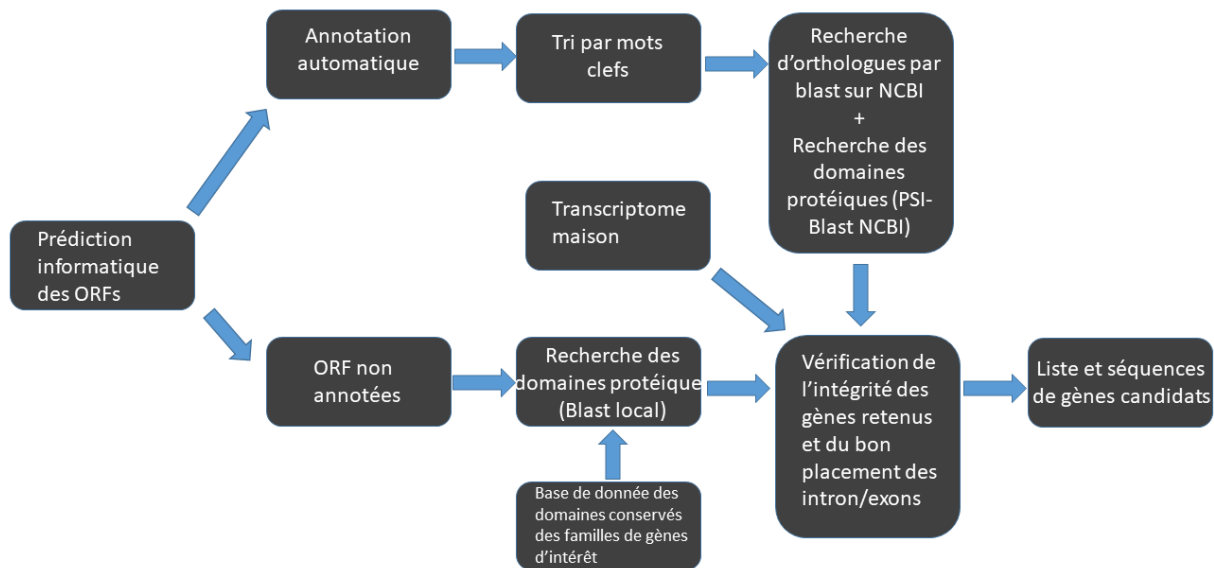


Figure 38 : Pipeline suivi pour annoter des gènes d'intérêt et construire la base de données.

Phénotypage des souches : biotests

Les courbes dose-réponse de nos 3 souches résistantes et de la sensible ont été établies sur 4 substances actives de synthèse : la deltaméthrine (pyréthrianoïde), le thiaclopride (néonicotinoïde), le chlorpiriphos-éthyl et le phosmet (des OPs) ; et le virus de la granulose isolat M (CpGV-M). La méthode de biotest suivie est la même que celle décrite dans le chapitre 1. Les insecticides ont été utilisés sous forme de produits commerciaux : Imidan® (phosmet), Calypso® (thiaclopride), le Decis® (deltaméthrine) Dursban 4® (chlorpiriphos éthyle), et pour CpGV-M, la carpovirusine 2000®. Des solutions ont été préparées extemporanément dans de l'eau distillée.

Reséquençage des souches résistantes et GWAS

Les individus survivants des biotests ont été sortis du milieu artificiel au moment de la lecture des tests (7 jours après installation des néonates sur du milieu pollué d'insecticide ou non) et individuellement congelés à -80°C pour faire des tests additionnels sur leur protéome ou leur transcriptome une fois l'analyse de génomique effectuée. Les individus utilisés pour le séquençage de nos souches étaient des adultes appartenant à la même génération que ceux qui ont été testés en laboratoire mais ce ne sont pas les survivants des biotests. 10 adultes de chaque sexe et de chaque souche ont été placés dans de l'alcool à 70°C et envoyés pour séquençage par les partenaires chinois. Suite à un problème d'envoi, le séquençage pour la souche RΔ a été fait sur larves âgées de 7 jours provenant des témoins des biotests. Leur sexage n'a donc pas pu être réalisé.

Six individus parmi les 10 ont été sélectionnés au hasard pour chaque souche, et chaque individu a été séquençé avec une couverture de ~40x, ce qui a donné un total de 474,6 Go de données.

Nos partenaires ont réalisé une étude d'association pangénomique (GWAS) à l'aide d'un logiciel appelé PLink (Chang, Chow et al. 2015) afin d'identifier les polymorphismes mononucléotides (SNP) associés à la résistance à la deltaméthrine et à l'Azinphos méthyl. Les données de séquençage de tous les échantillons ont été mappées à l'assemblage du génome en utilisant BWA-mem (Li and Durbin 2009) avec les paramètres par défaut. Les lectures superposées dans l'alignement ont ensuite été supprimées

par les outils Picards (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). Les variants entre les fichiers bam des échantillons de chaque groupe ont été recherchés par samtools (Li, Handsaker et al. 2009) et bcftools (Danecek and McCarthy 2017). Avant l'analyse d'association, les variants stockés dans les fichiers vcf ont été filtrés par bcftools, qui a supprimé les variants dont la profondeur de lecture était supérieure à 100 ou dont la qualité était inférieure à 20 %, et par PLINK avec les trois seuils : "--geno 0,05 --maf 0,01 --hwe 0,001", qui supprime les variants dont le taux de génotype manquant est supérieur à 5 %, une fréquence d'allèles mineurs inférieure à 1 % ou une valeur p du test exact de l'équilibre de Hardy-Weinberg inférieure à 0,001. Une analyse d'association a été réalisée entre les souches résistantes et les souches sensibles correspondantes à la question de recherche (pour les résistances à CpGV-M Raz est considérée comme sensible, pour les résistances aux insecticides chimiques Rgv est considérée comme sensible) par PLINK avec les paramètres suivants : --adjust --allow-extra-chr --allow-no-sex --assoc. Des scripts Perl ont été adaptés pour filtrer les variants indel pour réduire la complexité de la GWAS à l'identification des SNPs liés à la résistance aux insecticides chimiques.

Nous avons suivi la même méthode pour chercher les SNP liés à la résistance au CpGV-M, mais les paramètres de Plink ont été laissés sur leurs valeurs par défaut : geno 0,1 --maf 0,01 --hwe 0,001.

Le séquençage Sanger des SNP d'intérêt a été réalisé sur les 12 locus d'intérêts décrits dans les résultats englobant 19 SNPs sur 8 individus de chaque souche issus des témoins des biotests. Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume de 25 µl contenant le mélange suivant : 1X GoTaq® Flexi Buffer, 1,5 mM MgCl₂, et 0,1 mg/ml d'albumine de sérum bovin, 200 µM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce sens et Reverse (Tableau 12), 1 unité de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) et 4 µl de matrice d'ADN. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 3 minutes à 95 °C suivies de 35 cycles à 95 °C pendant 45s, 55 °C pendant 1 min, et 72 °C d'élongation pendant 1,5 min avec une étape d'extension finale à 72 °C pendant 10 min. La qualité des amplifications a été vérifiée par migration de 2µl de produit de réaction sur gel d'agarose 2%. Elles ont été considérées comme correctes lorsque les amplicons avaient la taille attendue et aucune hybridation aspécifique. Les produits d'amplification de 4 individus sur les 8 ont été séquencés avec la technologie Sanger. Pour les SNP 2 et 4 correspondant à des mutations déjà connues dans les cibles moléculaires d'insecticides (*kdr* et MACE), nous avons utilisé une technique de PCR-RFLP déjà au point dans notre laboratoire pour déterminer ces génotypes (Franck, Siegwart et al. 2012).

Tableau 12 : Liste des amorces utilisées pour le reséquençage Sanger des SNPs identifiées dans deux souches de *C. pomonella* résistantes à des insecticides chimiques.

	Amorces sens 5' - 3'	Amorces reverse 5' - 3'
SNP1	GGAATACCATTCGAAAACC	AGGATCTCCACCAAATACCC
SNP2	GGCCCATGATTGAATGTCTG	TTTGACCCTAAGAGAAGATTGG
SNP3	GGTAATGCACTGAGGAAACC	GGAGGCAACTGTATGTGAGC
SNP4	TAGAGAGCATGTGGGATTGC	AATTCGTAGCCCTTGATCG
SNP5	GTGAACCATGAACTGGACCTAC	TAGGAAGGAGACCAATGCTG
SNP6	GCTGGAGTGTGGATGTTGTC	CCTTCGCTCCTTTGATAGTG
SNP7	AAGCGAACCATAATGAGCAC	AAGAAAGGGAGCCAGCATAAC
SNP8	CTGAGTGGAAACATGATCTGG	GATACAAGTCGCACGCTCTC
SNP9	CCAGAGAGTCTCCAACAATTG	AGCATGCACTTTAATCTCACG
SNP10	TGGACCTATGGTTCAAAGTTAG	TGCTAGAAAGGTGAAATTTGG
SNP11	TTCTGTGTCGAACTGAAATGG	CCTGGTGATGGTGATGGAC
SNP12	GAATGGTGAAGTGTGAAG	GACTGCTCGTTGATGTG

Les produits PCR ont été envoyés pour séquençage Sanger au prestataire GATC Biotech.

Mesure du niveau d'expression de CYP6B2

Nous avons travaillé sur la même génération que les insectes qui ont été séquencés. Le niveau d'expression du gène CYP6B2 a été mesuré dans 8 individus par souche, la moitié ayant ingéré de la deltaméthrine à la concentration de 0,145 mg/l l'autre non. Les individus sont ceux qui ont été phénotypés, il s'agit de larves âgées de 7 jours ayant servi aux biotests, extraites du milieu artificiel au moment de la lecture et directement congelées à -80°C. L'ARN total a été extrait individuellement des échantillons congelés avec le Micro Kit RNeasy® Plus de Qiagen (Qiagen). Un traitement à la DNase a été effectué à l'aide du kit RNase-Free DNase (Qiagen) comme décrit par le fabricant. La pureté et la concentration de l'ARN total ont été évaluées par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop ND-2000 (ThermoFisher) et l'intégrité a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

L'expression des gènes a été évaluée par transcription inverse suivie d'une PCR quantitative. L'ARN total (200ng) a été utilisé pour la synthèse du premier brin d'ADNc, en utilisant des amorces oligo-(dT)₁₅ et le Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Liège, Belgique) selon les instructions du fabricant. La qPCR a été réalisée dans une plaque à 384 puits en utilisant un cycleur CFX384 (BioRad, Hercules, CA, USA). L'amplification par qPCR a été réalisée en utilisant le kit Takyon No Rox SYBR Core dTTP blue (Eurogentec, Liège, Belgique) dans un volume final de 10 µl contenant 20 ng d'ADNc et 250 nM d'amorces sens et reverse. Le programme d'amplification utilisé était le suivant : 4 min à 95°C, 40 cycles de 10 sec. à 95°C, et 1 min. à 60°C. Pour confirmer la spécificité de l'amplicon, chaque programme de qPCR a été suivi d'un test de courbe de fusion en augmentant les températures de 60 à 95°C, avec des pas de 5s et de 0,5°C chacun. Chaque souche et traitement ont été dosés sur 4 répliques biologiques et chaque réaction a été effectuée dans un triplicata technique indépendant et comprenait un contrôle sans matrice, un contrôle avec réactif seul et un contrôle sans transcriptase inverse. Les cycles de quantification (Ct) ont été définis sur la base de la moyenne des trois répliques techniques, puis la moyenne a été calculée au sein des répliques biologiques. La moyenne géométrique du niveau d'expression de l'actine (ACT) a été utilisée comme contrôle interne (gène de ménage) pour normaliser les données d'expression des gènes cibles. Nous avons utilisé les deux paires d'amorces suivantes :

- pour l'actine (le gène régulateur) : Sens 3' CGGCATCCACGAAAACCCACCT 5' et reverse 3' TGGAAGGAGGAGCCAGTGCGG 5'
- pour CYP6B2 (le gène candidat) : Sens 3' CTGGAAGTCAAGAGAGGGGGGGCTCA 5' et reverse 3' GCACCGACTATAGGCTGCTCCTT 5'

La paire d'amorces pour le gène d'actine avait déjà été publiée (Yang, Li et al. 2013) la seconde paire dans le gène de CYP6B2 a été choisie grâce au logiciel PRIMER3. Nous avons calculé l'efficacité de ces deux couples d'amorces qui étaient respectivement de 98,8 et 98,9%.

Analyses statistiques et bioinformatiques

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R 4.1.1 (R Core 2013) et l'interface RStudio 1.3.1093 (Allaire 2012). Les analyses probits des biotests (fonction `drm`), les calculs de CL (fonction `ED`) et les comparaisons de CL (fonction `EDcomp`) ont été réalisés avec le package `drc` (Ritz, Baty et al. 2015). Les annotations des séquences individuelles ont été manipulées sur le logiciel BioEdit (Hall, Biosciences et al. 2011).

Les recherches de SNP ont été réalisées avec le logiciel Plink (Chang, Chow et al. 2015).

Le calcul des niveaux d'expression de CYP6B2 a été réalisé avec la méthode de calcul 2- $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl 2001). Pour comparer les niveaux d'expression, nous avons réalisé un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (fonction `kruskal_test`). Un test ad-Hoc de Wilcoxon Mann Whitney a été ensuite réalisé.

Résultats

Annotation du génome

Le Tableau 13 fournit un relevé synthétique du nombre de gènes identifiés chez *C. pomonella* pour différents mécanismes susceptibles d'être impliqués dans la résistance aux insecticides chimiques (consortium R4P).

Tableau 13 : Synthèse de notre base de données composée des gènes identifiés comme étant susceptibles d'être impliqués sur les bases d'une annotation automatique puis vérifiée manuellement.

Mécanisme de résistance	Numérotation R ₄ P ¹	Famille de gène	Nb gènes dans <i>C. pomonella</i>	Nb gènes dans <i>A. aegypti</i>
Barrière physique	2	cuticule	124	154
Efflux / séquestration intracellulaire	3 / 4	ABC transporteur	59	49
		EST	73	28
Détoxification	5 / 6 / 7	GST	30	30
		MFO	137	173
		UGT	30	43
Surexpression de cible / modification / compensation	8 / 9 / 10	Other detox	147	178
		Récepteur	40	11
		canal ionique	3	33
Protection contre effets cytotoxiques	11	autres cibles	2	0
		Red/Ox	22	28
Total			667	727

¹ numérotation des mécanismes de résistance telle que défini par R₄P dans l'article et 2016.

Les gènes de détoxification représentent 62,5 % des ORF répertoriés dans notre base de données disponible en Annexe 5. Alors que les cibles moléculaires des insecticides (récepteurs synaptiques, canal ionique et autre) ne représentent que 8,8 % des gènes candidats. Les autres gènes sont répartis entre 18,6% de protéines/enzymes impliquées dans la synthèse de la cuticule et 8,8% de transporteur ABC connu pour être impliqué dans la multirésistance aux médicaments. En comparant ces premiers résultats avec les travaux de Faucon *et al.* 2015, nous observons les mêmes proportions de familles de gènes dans les gènes candidats sélectionnés (Figure 39). Cela nous conforte dans le fait que nous disposons d'une liste assez complète. En regardant plus en détail, nous avons trié les MFO par familles CYP sachant que dans la littérature, les familles les plus souvent impliquées dans les cas de résistance sont les CYP4, 6 et 9. Nous trouvons respectivement 40, 67 et 11 gènes candidats parmi ces 3 familles de P450.

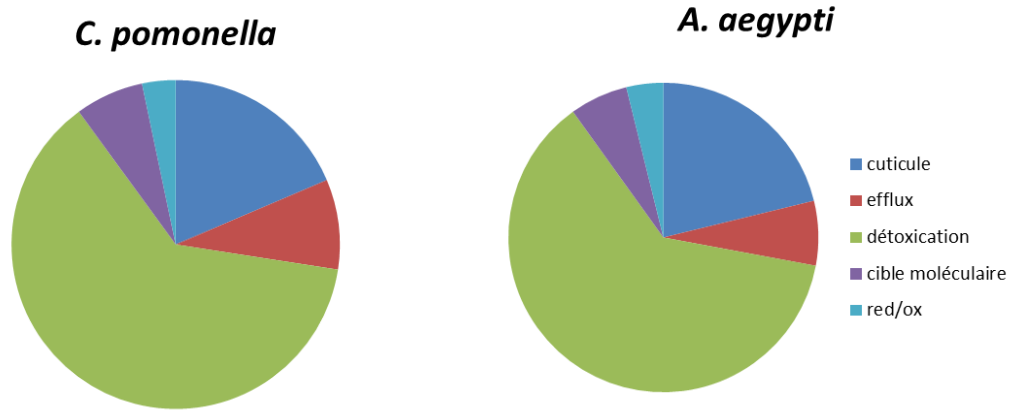


Figure 39 : Comparaison des proportions des différents mécanismes de résistance en fonction du nombre de gènes appartenant à chaque catégorie dans les génomes de deux espèces d'insectes

Lors du travail d'annotation manuelle de gène, j'ai remarqué la présence de gènes situés en tandem. Cette observation s'est particulièrement avérée pour les gènes appartenant à la famille des MFO qui sont pour beaucoup organisés en cluster (Figure 40). 16 clusters de gènes comprenant trois gènes de MFO ou plus ont été dénombrés. Le plus grand se situe sur le chromosome 20 avec 11 gènes, dont trois gènes CYP6AE. 57% des CYPs sont situés dans des clusters de 3 ou plus illustrant le fait que *C. pomonella* pourrait avoir accru ses capacités de détoxification pour faire face aux toxines phytochimiques ou synthétiques.

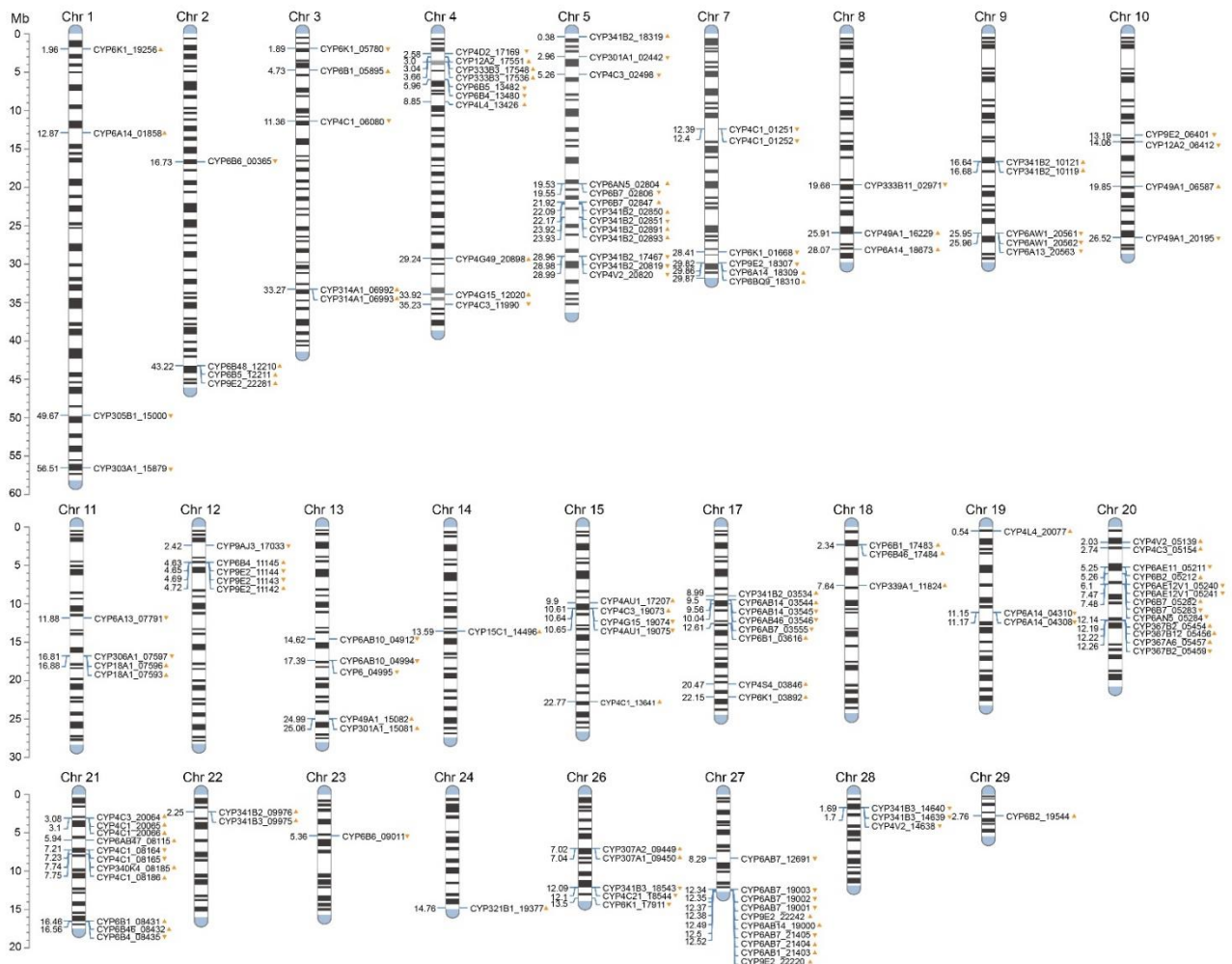


Figure 40 : Localisation des gènes de MFO dans le génome de *C. pomonella*

Recherche des bases génétiques des résistances dans des souches de laboratoire

Phénotypage

Les analyses des résultats des biotests sont résumées dans le Tableau 14 et les courbes dose-réponse obtenues avec le CpGV-M sont présentées dans la Figure 41 à cause de l'impossibilité de faire une analyse probit due à un rapport de résistance trop élevé. La souche Raz est bien résistante à un des deux OPs testés : le phosmet avec un RR50 de 16,43. Cette souche montre aussi une moindre sensibilité au thiaclopride et à la deltaméthrine (RR50 respectivement de 2,99 et 3,68). L'absence de résistance de cette souche au chlorpiriphos éthyle est inattendue. La souche RΔ, est bien résistante à la deltaméthrine (RR50 : 13,54), et présente une moindre sensibilité au Phosmet (RR50 = 3,54). La souche Rgv est entièrement sensible à tous les insecticides de synthèse, ce qui était attendu.

Tableau 14 : Analyse probit de biotests sur 4 souches de *C pomonella* exposées à 4 substances actives insecticides. ^a CL50 valeur estimée suivie de l'intervalle de confiance 95% entre parenthèses. ^b Rapport de résistance obtenu en divisant la CL50 de Sv par celle de la souche testée. ^c significativité par rapport à Sv obtenue par la fonction EDcomp du package drc sur R (***) = $p < 0.005$; ** = $p < 0.001$; * = $p < 0.05$)

Insecticide	Souche	n	pente	CL50 (95% IC) ^a	R/S ^b	signif
Thiaclopride	Sv	168	1,76	7,75 (6,12 - 9,38)		
	Raz	192	2,05	23,15 (18,79 - 27,51)	2,99	***
	RΔ	168	1,19	11,86 (8,42 - 15,29)	1,53	
	Rgv	168	2,15	8,13 (6,49 - 9,78)	1,05	
Deltaméthrine	Sv	168	1,34	0,28 (0,18 - 0,36)		
	Raz	168	0,92	1,03 (0,49 - 1,56)	3,68	**
	RΔ	216	0,55	3,82 (1,30 - 6,34)	13,64	***
	Rgv	120	1,21	0,45 (0,27 - 0,63)	1,61	
Chlorpiriphos-éthyle	Sv	144	1,43	195,79 (139,18 - 252,39)		
	Raz	192	1,13	243,83 (107,7 - 379,93)	1,25	
	RΔ	120	1,31	136,26 (89,91 - 182,59)	0,70	
	Rgv	144	2,22	204,05 (160,97 - 247,13)	1,04	
Phosmet	Sv	217	1,31	5,36 (4,11 - 6,61)		
	Raz	264	0,75	88,05 (55,92 - 120,18)	16,43	***
	RΔ	192	2,35	18,96 (15,24 - 22,69)	3,54	***
	Rgv	280	1,23	4,88 (3,84 - 5,91)	0,91	

Les biotests effectués avec CpGV-M montrent que Sv et RΔ sont entièrement sensibles à CpGV-M alors que Rgv et Raz sont très résistants, au point qu'un calcul de CL50 n'est pas possible car nous n'atteignons pas plus de 40% de mortalité à la dose la plus forte. L'allure des courbes nous laisse penser que ce rapport est supérieur à 10 000 ce qui est cohérent avec les résultats de Berling (2009) pour la souche Rgv. Les mortalités sont significativement différentes entre Sv et Rgv ou Raz à chaque concentration testée partir de 250 granules/μl (χ^2/SS corr yates > 21,82 ; $p < 0,001$).

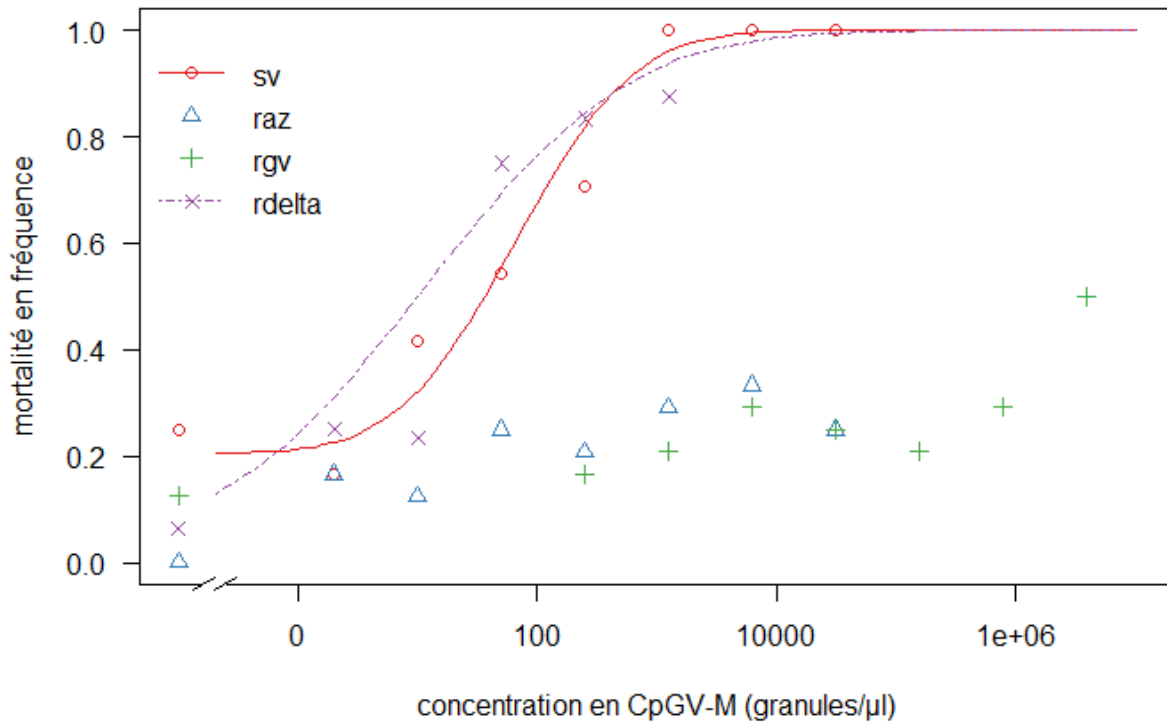


Figure 41 : Courbe dose-mortalité des 4 souches de *C. pomonella* entièrement séquencées

Reséquençage et analyse de génomique

Résistance à des insecticides chimiques

En comparant les séquences ADN des ORFs des souches Sv et Raz grâce au logiciel Plink, 109 SNPs (non synonymes ou synonymes) avec des fréquences d'allèles significativement différentes situées dans les régions exoniques des gènes candidats présentés dans le paragraphe précédent ont été identifiés. Entre Sv et RΔ, 242 SNP ont été identifiés significativement différenciés situés dans les régions exoniques ou promotrices des gènes associés à la résistance. Parmi tous ces SNPs, 19 ont été trouvés à la fois dans Raz et RΔ étant probablement impliqués dans des résistances croisées (Figure 42).

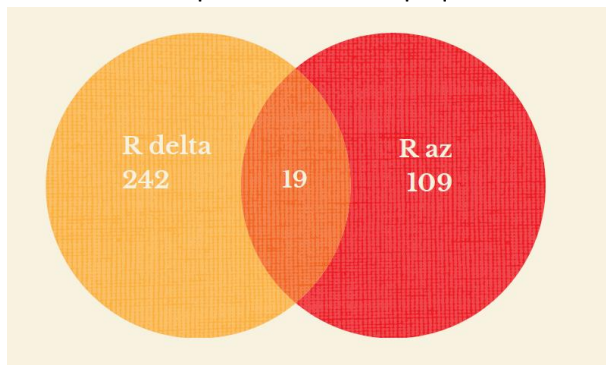


Figure 42 : Diagramme de Venn présentant le nombre de SNP dans les deux souches de *C. pomonella* résistantes à des insecticides chimiques en comparaison de la souche sensible Sv.

Nous avons alors réalisé un séquençage Sanger des régions avoisinantes de ces 19 SNPs sur 4 nouveaux individus de nos souches de laboratoire pour vérifier que nous retrouvions bien ces mutations. La somme des génotypes obtenus par reséquençage et les 6 séquences obtenues par NGS sont synthétisées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Génotypes au niveau des 19 SNPs qui ressortaient de l'analyse GWAS entre souches de *C. pomonella*. Ces données ont été acquises par reséquençage sanger bas débit et par NGS, le chiffre désigne le nombre d'individus et les lettres le génotype. Les lettres rouges désignent l'allèle muté.

SNP	RΔ	Raz	Sv	Rgv
1	10 GG	8 GG 2 GC	2 GG 7 GC 1 CC	2 GG 3 GC 1 CC
2	10 TT	7 GG 2 GT 1 TT	10 TT	6 TT
3	1 GG 4 GC 1CC	6 CC	1 GC 5 CC	2 GG 3 GC 1 CC
3 bis	1 GG 4 GC 1CC	6 CC	1 GC 5 CC	2 GG 3 GC 1 CC
4	10 TT	1 CT 9 CC	10 CC	6 CC
5	10 CC	10 CC	3 CC 4 CG 3 GG	6 CC
6	9 AA 1 AC	4 AC 6 CC	1 AA 6 AC 3 CC	1 AA 1 AC 4 CC
6 bis	9 AA 1 AC	1 AA 6 AC 3 CC	1 AA 6 AC 3 CC	1 AA 1 AC 4 CC
6 ter	10 TT	1 TT 6 TA 3 AA	3 TT 4 TA 3 AA	1 TT 1 TA 4 AA
7	3 CC 3 CG	5 CG 1 GG	1 CG 5 GG	4 CG 2 GG
7 bis	1 TT 2 TC 7 CC	10 CC	10 CC	1 TC 5 CC
7 ter	4 CC 6 CA	6 CA 4 AA	1 CA 9 AA	4 CA 2 AA
7 qua	4 CC 6 CT	6 CT 4 TT	1 CT 9 TT	4 CT 2 TT
8	5 AA 3 AG 2 GG	3 AG 6 GG	10 GG	6 GG
9	3 TT 2 TA 1 AA		6 AA	
10	6 TT		1 TT 4 TG 1 GG	
10 bis	6 TT		3 TC 3 CC	
11	5 TT 4 CA 1 AA	10 CC	3 CC 4 CA 3 AA	6 CC
12	6 TT	6 TT	4 CT 2 CC	2 TT 3 CT 1 CC

Après avoir aligné ces nouvelles séquences, un travail d'annotation manuelle des séquences SNP par SNP a été réalisé.

Le SNP1 correspond à une mutation codante dans le gène *ace2*. Cette mutation entraîne un changement d'acide aminé : acide aspartique vers acide glutamique. Ces deux acides aminés sont chargés négativement, ils ne diffèrent entre eux que par un atome de carbone. Lorsque l'on aligne des protéines *ace2* d'insectes, on se rend compte que cette mutation est dans une partie non conservée de l'enzyme. De plus, cet allèle est présent à une fréquence allélique de 0,5 dans les individus sensibles aux insecticides chimiques (Sv+Rgv). Il est donc peu probable que ce SNP soit impliqué dans un mécanisme de résistance à des insecticides chimiques. Le SNP2 est une mutation dans le gène *ace1* entraînant une modification d'un acide aminé dans l'AchE. Les SNP3 et 3bis se trouvent dans le gène du sodium channel protein 60E. Elles se situent au milieu du 6e intron. D'après nos données de reséquençage, ces mutations sont présentes chez des individus résistants à la deltaméthrine, au virus de la granulose et un individu sensible (Tableau 15). Elles sont présentes à des fréquences intermédiaires dans les deux souches sensibles aux insecticides chimiques, ne sont ni codantes ni en bordure d'exon, il y a donc peu de chance pour qu'elles jouent un rôle dans la résistance aux pyréthriinoïdes. Le SNP4 est situé dans le gène *para* et correspond à la célèbre mutation *kdr*. Une observation détaillée du gène *para* (porteur de la mutation *kdr*) qui fait 43 192 pb (sur le chromosome 17) nous a révélé les lacunes d'une annotation automatique. Nous avons donc repris manuellement à l'aide de notre « transcriptome maison » toutes les annotations de ces gènes. Les SNP5, 6 et 7 sont tous situés sur des gènes appartenant à la catégorie des récepteurs d'octopamine qui sont à la fois la cible de certains insecticides neurotoxiques mais ils sont aussi impliqués dans divers mécanismes de résistances au stress. Le SNP5 est localisé dans le récepteur d'octopamine beta1. Cette mutation entraîne le changement d'une Leucine chez les résistants en une valine chez les sensibles. Ces deux acides aminés sont hydrophobes. Il est cependant intéressant de voir que la Leucine est le résidu qui est le plus courant entre orthologues dans cette zone de la protéine qui est relativement bien conservée entre espèces de lépidoptères. Ces deux mutations se trouvent dans la première zone transmembranaire de ce récepteur (TM1). Les trois SNPs regroupés sous « SNP6 » se situent dans un gène qui appartient à la famille des octopamine/tyramine receptor. Il

semblerait que les deux derniers aient le plus de chance d’avoir un impact sur la conformation de la protéine. En effet, le deuxième provoque le remplacement d’un acide aminé polaire mais sans charge par un acide aminé chargé positivement et le troisième d’un acide aminé chargé positivement par un hydrophobe. Les protéines des autres espèces alignées ont toutes un acide aminé hydrophobe à ce locus. Comme pour le SNP5 c’est l’allèle « sensible » qui diffère des autres. Le gène portant les 4 SNPs regroupés sous l’appellation SNP7 appartient à la même sous-famille que le gène précédent. Comme pour le SNP3, une erreur dans le cadre de lecture détecté in silico a modifié les premières prévisions de mutation. Aussi les quatre mutations détectées sur ce gène entraînent :

- SNP7 un changement de A -> P dans une zone très peu conservée
- SNP7bis un changement de A -> V dans une zone peu conservée
- SNP7ter mutation silencieuse
- SNP7Quatro un changement de I ->T dans une zone peu conservée

Le SNP8 se situe dans un récepteur muscarinique. Il est intéressant de noter que cette mutation est présente dans les deux souches résistantes aux produits chimiques, et absentes des deux souches sensibles. Cette mutation entraîne le remplacement d’un aa simple (Glycine) non chargé par un aa chargé positivement complexe et long : l’arginine. Cette mutation ne se situe pas dans une zone très conservée. Les trois SNPs regroupés sous l’appellation SNP 9 et 10 sont situés dans le promoteur d’une enzyme : la CYP6B2, appartenant aux MFO. Il s’agit donc d’un très bon candidat pour une fonction de résistance croisée. Enfin les SNP11 et 12 sont localisés dans des promoteurs de gènes de cytochrome P450 famille 12A et 49A respectivement, deux MFO mitochondriales. Une analyse avec le logiciel MatInspector de la structure de ces promoteurs montre que ces mutations ne se situent pas dans des zones qui se lient à des protéines.

Résistance au virus de la granulose

Lorsque que l’on visualise le nombre de SNPs ayant des fréquences significativement différents ($p\text{-value} < 10^{-6}$) entre les souches résistantes aux CpGV-M, Rgv et Raz, et les sensibles, Sv et RΔ, sur une fenêtre glissante de 1000 pb le long du chromosome 1 (correspondant au chromosome sexuel Z) à l’aide du logiciel Plink un pic apparaît dans une zone vers 53 millions de paires de bases (Figure 43).

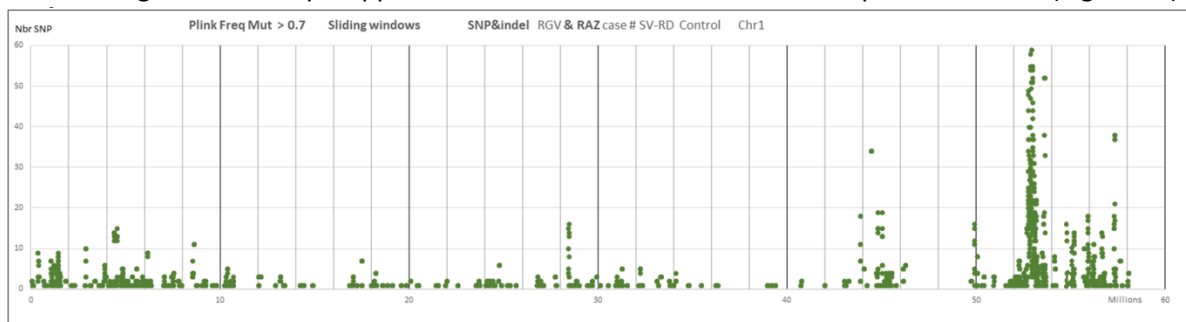


Figure 43 : Nombre de SNP et d’indel le long du chromosome Z lorsque l’on compare des individus résistants à des individus sensibles au CpGV-M

La zone qui se situe entre 53 608 954 et 53 613 038 pb est porteuse de 51 SNP ou indel, dont une de 92 pb, avec des p-values inférieures à $3,30 \times 10^{-07}$. Cette zone est porteuse de nombreux transcrits mais aucune ORF n’est trouvé. Des recherches de miRNA et piRNA n’ont pas été concluantes non plus.

Niveau d’expression de *CYP6B2*

Les niveaux d’expression du gène CYP6B2 ont été mesurés dans des insectes (*C. pomonella*) résistants et sensibles à des insecticides chimiques qui ont été mis en contact ou non avec de la deltaméthrine

pour déterminer les niveaux d'expression basale ou induite de cette enzyme de détoxification. Les analyses statistiques montrent qu'il existe une différence significative entre les états d'expression de CYP6B2 dans la souche Sv par rapport aux deux souches résistantes aux insecticides chimiques (Kruskal-Wallis chi-carré = 11,037, df = 4, p-value = 0,02615) (Figure 44). Nous pouvons conclure que ce gène est constitutivement surexprimé dans les deux souches résistantes (environ 200 fois dans Raz et 70 fois dans RΔ) mais qu'il n'est pas induit 7 jours après un traitement avec de la deltaméthrine.

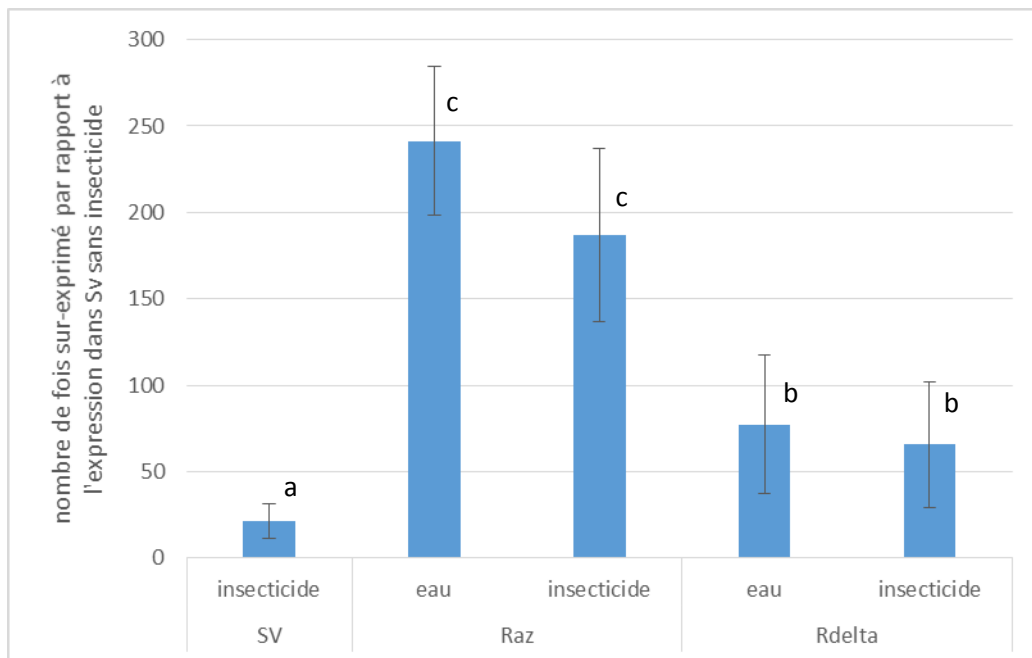


Figure 44 : Niveau d'expression du gène CYP6B2 au sein de trois souches de *C. pomonella* après avoir été exposées ou non à de la deltaméthrine. Ces niveaux ont été calculés en comparaison de la souche sensible de référence en absence de cet insecticide.

Ces résultats laissent penser que les 3 SNPs dans le promoteur de CYP6B2 sont à l'origine d'une surexpression constitutive de cette enzyme.

Discussion

Généralités sur génome de *C. pomonella* et résistance

Une première annotation du génome du carpocapse des pommes nous a permis d'identifier 667 gènes candidats pouvant être impliqués dans divers mécanismes de résistance aux (bio)insecticides. Le nombre et la proportion de gènes dans chaque catégorie fonctionnelle sont comparables à ce que l'équipe de Faucon *et al.* (2015) a pu observer chez l'espèce de moustique *Aedes aegypti*. Parmi ceux-ci les gènes de MFO sont, pour plus de la moitié, regroupés en clusters. Le cluster le plus grand comprend 11 gènes, dont trois de la sous-famille des CYP6AE. Des clusters de cette sous-famille de CYP ont déjà été décrits pour être impliqués dans des résistances aux insecticides chez d'autres lépidoptères *Helicoverpa armigera* et *Chilo suppressalis* (Wang, Shahzad *et al.* 2014; Wang, Shi *et al.* 2018). Une analyse génomique comparative entre *Drosophila melanogaster* et *Anopheles gambiae* révèle une faible orthologie des gènes et peu de synténie chromosomique contrairement à ce qu'on observe chez des groupes de gènes orthologues déjà identifiés et originaires d'ancêtres communs. Chez *A. gambiae*, l'expansion indépendante des gènes paralogues est une cause de la formation de clusters pour les gènes localement dupliqués (Ranson, Claudianos *et al.* 2002). Une organisation en cluster serait donc la

signature du mécanisme d'amplification génique (Oakeshott, Home et al. 2003). Or l'amplification génique est un mécanisme génétique bien connu dans l'acquisition de résistance à certains insecticides (Devonshire and Field 1991). Plusieurs auteurs suggèrent que ce type d'architecture génomique peut également être gage d'une grande évolutivité (Oakeshott, Home et al. 2003; Puinean, Foster et al. 2010; Lucas, Miles et al. 2019).

Importance de CYP6B2 dans les résistances croisées

Tout d'abord, l'analyse de GWAS a mis en avant 2 mutations de cible bien décrites et connues pour avoir des effets forts : *kdr* (SNP4) (Brun-Barale, Bouvier et al. 2005) et MACE (SNP2) (Cassanelli, Reyes et al. 2006) dans les résistances aux pyréthrinoides et aux OPs respectivement. Ce résultat valide donc les décisions que nous avons prises pour cette étude. Parmi les autres SNP mis en avant par cette analyse, les trois localisés dans le promoteur de la CYP6B2 ont fait l'objet d'une étude approfondie. Les résultats de biotests sur nos souches confirment les différentes résistances attendues ainsi que l'existence de résistances croisées entre familles chimiques suggérant des mécanismes généralistes en plus des mutations de cible moléculaires. Le gène codant pour la MFO CYP6B2 est constitutivement surexprimé (en moyenne 200 fois) dans les deux souches résistantes aux insecticides chimiques (Raz et Rdelta) comparativement à la souche de référence sensible. Pour confirmer l'implication de cette enzyme dans la détoxification d'insecticides chez *C. pomonella* nos partenaires chinois ont opté pour l'utilisation de la technique RNAi. Leurs résultats vont dans le même sens que les nôtres : une plus grande sensibilité à l'azinphos-méthyle et à la deltaméthrine mais pas au thiaclopride a été observée lorsque ce gène est éteint par RNAi (Wan, Yin et al. 2019). Ce résultat est intéressant car il montre que cette résistance croisée est spécifique à certaines familles chimiques seulement. Cependant leurs résultats bien que significatifs ne sont pas très marqués (baisse de mortalité inférieure à 20% après exposition à la deltaméthrine ou l'azinphos méthyl avoir éteint CYP6B2 via RNAi). Cela peut être imputé au fait que la technique de RNAi fonctionne très mal sur tous les lépidoptères, probablement à cause de la présence dans l'hémolymphe de ces insectes d'une DNase inhibant la réaction immunitaire attendue (Guan, Li et al. 2018).

Autres candidats prometteurs

D'autres mutations pointées par l'analyse par association de génome menée ici pourraient également être impliquées dans des résistances croisées. Il est moins probable que les deux autres mutations (SNP1 et SNP3) dans des cibles moléculaires primaires (*ace2* et un autre canal sodium) soient impliquées, la première conduit à un remplacement d'acide aminé par avec des caractéristiques proches dans une zone peu conservée du gène et le second se situe au milieu d'un intron. Il est possible que la première soit présente via un phénomène d'autostop.

Nos résultats mettent aussi en lumière d'autres mécanismes possibles dans ces phénomènes de résistances croisées. Les récepteurs à octopamines sont par trois fois pointés par nos analyses. L'octopamine est un neurotransmetteur spécifique aux insectes (Orchard 1982). Cette voie a été décrite plusieurs fois comme étant impliquée dans la capacité d'un individu à gérer un stress comme le froid, l'alcool ou encore des drogues (Davenport and Evans 1984; Scholz, Franz et al. 2005; Srithiphaphrom, Lavallee et al. 2019). Il existe une souche de drosophile qui porte une mutation dans ce récepteur entraînant une moindre tolérance au stress (Evans and Maqueira 2005). L'Amitraze est la seule substance active qui cible directement ce récepteur. En Europe, elle a été retirée du marché en 2004. Elle était surtout utilisée contre les acariens qui ont développé des résistances notamment le tique *Rhipicephalus microplus* (Corley, Jonsson et al. 2013). Dans notre cas il est intéressant de noter que la mutation du SNP5 est présente uniquement chez la souche sensible. Comme chez *D. melanogaster* cela peut être un marqueur d'une inadaptation au stress (hyper sensibilité de la souche sensible). Le récepteur beta1 sur laquelle elle se situe est principalement exprimé dans les tubes de Malpighi qui

sont les organes excréteurs (Lam, McNeil et al. 2013). Deux acides aminés avant le locus du SNP5, une mutation (*I61F*) a été décrite chez la tique *Rhipicephalus microplus* comme responsable en partie de résistance à l'amitraze (Corley, Jonsson et al. 2013).

Une autre découverte de notre étude a été l'implication possible des récepteurs muscariniques à acétylcholine (mAChR) dans les résistances à la deltaméthrine et le phosmet. Ils sont localisés sur la cellule présynaptique, se lient et réagissent à l'acétylcholine (ACh). Activés en présence d'une grande quantité d'ACh et sont impliqués dans la régulation négative du relargage d'ACh dans la fente synaptique (Corbel, Stankiewicz et al. 2006). Ils peuvent également être des cibles directes d'OP et de carbamates, des insecticides qui miment l'ACh en se logeant directement sur le mAChR au niveau du site de fixation de l'ACh (Beukel, Dijcks et al. 1997). Vu que les pyréthrinoides et les OP conduisent tous les deux à l'augmentation d'ACh dans la fente synaptique, ces deux familles chimiques vont être responsables de l'activation des récepteurs muscariniques. Il est donc cohérent que le SNP8 soit présent dans nos deux souches résistantes à l'une ou l'autre de ces deux familles chimiques. Cette mutation ne se situe pas dans une zone très conservée mais pourrait pointer vers une cible secondaire commune à deux grands modes d'action.

Les deux derniers SNP étudiés sont localisés dans des promoteurs de deux gènes de CYP mitochondriaux. Les familles de CYP les plus souvent impliquées dans des cas de résistance ou de tolérance aux insecticides appartiennent aux familles des CYP4, CYP6 et CYP9 (Zhu, Moural et al. 2016). Chez le moustique (*A. aegypti*) il a été décrit que des mutations codantes dans le gène de CYP12F (AAEL001960) étaient retrouvées dans des populations résistantes et non dans des sensibles (Faucon, Dufour et al. 2015). Mais je n'ai pas trouvé dans la littérature de cas de résistance décrivant une surexpression de CYP mitochondriaux, là encore une étude complémentaire de validation fonctionnelle serait nécessaire pour conclure sur l'implication de ces deux gènes dans des résistances croisées.

Tous les SNPs qui m'apparaissent comme intéressants sont ceux pour lesquels tous les individus sensibles sont homozygotes sensibles, et inversement pour la mutation SNP5. Une démarche plus drastique de filtre des SNPs pourrait donc être opérée en prenant ce critère en compte pour faire de nouvelles recherches de variants.

Résistance aux CpGV-M toute une histoire à découvrir

Nos résultats d'association de génome pointent un locus dans la zone des 53 millions de paires de bases sur le chromosome 1 qui n'est autre que le chromosome sexuel chez le carpocapse des pommes. Ce résultat est cohérent avec les connaissances que l'on a sur la présence d'un gène majeur de résistance à CpGV-M situé sur ce chromosome (Asser-Kaiser, Fritsch et al. 2007). Cependant la zone pointée par notre analyse de GWAS ne correspond pas une ORF, bien que les transcrits y soient nombreux. Il pourrait donc s'agir d'ARN non codant dont il reste encore à déterminer la fonction. Ces transcrits pourraient être par exemple des long non codant RNA ou des transposons. Les deux étant connus pour être impliqués dans la régulation des voies immunitaires chez les insectes (Satyavathi, Ghosh et al. 2017; Gilbert, Peccoud et al. 2021). Leur structure palindromique laisse penser qu'ils jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La délétion de 92 paires de bases pourrait nous servir de marqueur simple à détecter pour vérifier l'importance de ces ARNs dans la résistance à ce granulovirus. Les nouveaux isolats viraux de CpGV capablent d'infester les carpocapses résistants ne portent pas dans leur génome une autre délétion dans le gène *pe38*. Est-ce que c'est l'ARN de *pe38* et pas la protéine qui est en cause via une interaction directe entre ARN du virus et ARN de l'hôte ?

Conclusions et perspectives de ce chapitre

Le premier séquençage complet du génome du carpocapse des pommes a ouvert des possibilités nouvelles dans l'étude des mécanismes des résistances aux insecticides de cet insecte ravageur. Cette

première étude nous a permis d'entrevoir le grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans ces phénomènes, ainsi que la complexité des interactions qui pourrait en découler. 417 gènes candidats manuellement annotés codent pour des enzymes de détoxification illustrant bien l'importance de ce mécanisme pour cette espèce. Si l'approche GWAs/génomique a permis de retrouver deux mutations bien connues et déjà décrites dans nos souches de laboratoire (la mutation *kdr* dans la souche résistante aux pyréthrinoïdes et la mutation MACE dans la souche résistante au phosmet), elle a surtout permis d'ouvrir la piste de mécanismes plus complexes. Nous avons mis en évidence l'importance de la CYP6B2 dans une résistance croisée à la deltaméthrine (pyréthrinoïde) et au phosmet (OP). Deux cibles secondaires encore méconnues pour cette espèce semblent aussi être des candidats intéressants.

Nous avons poursuivi l'étude des bases génétiques des résistances aux insecticides chimiques en adoptant plusieurs approches expérimentales :

- évolution expérimentale à partir d'une population sauvage porteuse de résistances croisées à plusieurs familles chimiques et au spinosad suivie de séquençages NGS
- phénotypages de populations sauvages suivis du séquençage de leur ADN total en pool afin de faire une analyse de GWAS

Ces recherches actuellement en cours sont l'objet du sujet de doctorat de Mathilda Idier (co-encadrement avec Bertrand Gauffre (INRAE-PSH) et Benoit Barres (Anses-Casper))

La découverte l'année dernière de populations de *C. pomonella* résistantes à CpGV-M, CpGV-R5 et CpGV-V15, nous a conduits à appliquer les mêmes approches pour tenter d'élucider les bases génétiques de cette résistance croisée ou multiple. L'objectif plus finalisé étant de trouver un nouvel isolat ou mélange d'isolats efficace sur les insectes ayant développé plusieurs résistances. Cela fait l'objet du contrat de recherche MULTIRES CpGV que je coordonne avec Bertrand Gauffre actuellement en cours.

DISCUSSION

Les enjeux de cette thèse, tels que définis en introduction générale, sont (i) de préciser et comprendre les mécanismes et l'histoire évolutive des résistances aux insecticides de synthèse pour optimiser leur gestion sur le terrain, et améliorer la durabilité des substances actives encore homologuées ; et (ii) de tirer profit des connaissances et techniques expérimentales acquises sur les insecticides de synthèse pour les transposer aux bio-insecticides et ainsi améliorer leur durabilité.

La connaissance et la compréhension des résistances passent d'abord par une détection fiable. Cette dernière n'est toutefois pas si triviale car chaque outil à notre disposition a des défauts dont il faut avoir conscience. Ce recul est nécessaire pour faire le bilan de ce que nos recherches peuvent apporter aux agriculteurs. Les exemples de résistances présentés dans ce document correspondent à des moments différents dans leur « cycle de vie », allant de « avant l'utilisation de l'insecticide » à « après son retrait du marché ». Cette chronologie nous apporte une vision des particularités des différents moments du « cycle de vie » des résistances, et donc des connaissances qui sont utiles à un temps donné (préexistence de mutations, mécanismes impliqués, coût à la résistance, résistances croisées). Si l'on considère qu'une quelconque pression de sélection entrainera une adaptation, alors nos connaissances concernant les résistances aux insecticides de synthèse peuvent être mobilisées pour les bio-insecticides qui seront les futures victimes de ce mécanisme évolutif (Siegwart, *et al.*, 2015).

Détection des résistances actuelles

Les différentes méthodes pour détecter les résistances aux pesticides ont été listées et comparées dans la revue de R₄P (R4P, 2016). Elles peuvent être classées en trois catégories : les analyses biochimiques, les biotests et les analyses moléculaires (NGS inclus). Les méthodes biochimiques sont surtout utiles pour caractériser les mécanismes des résistances en vue ensuite d'orienter les recherches vers des gènes impliqués. La méthode des biotests reste la plus puissante et la plus fiable car elle donne une indication sur le phénotype, sur lequel agit la sélection naturelle (Biron, Loxdale *et al.* 2006). Les biotests prennent donc en compte tous les allèles exprimés, toute la diversité inter-individuelle, toutes les modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles, etc. C'est une force mais aussi une faiblesse car leur interprétation et leur variabilité dans le temps est souvent source de confusion (Blouquy, Mottet *et al.* 2021). Par exemple, dans le chapitre 2.1, l'évolution expérimentale de deux lignées de *M. persicae* a montré de la variabilité de réponse au 3,5-diCQ entre générations. Cet exemple souligne l'importance de réaliser en parallèle les biotests que l'on souhaite comparer. Les méthodes de biotests en microplaques utilisées dans les chapitres 1 et 3 montrent des résultats fiables pour les trois espèces de lépidoptères testées (*C. pomonella*, *O. nubilalis* et *G. molesta*) mais cela reste une méthode bas débit, gourmande en main d'œuvre et nécessitant une grande quantité d'insectes vivants de même âge et de même stade. Il faut donc que l'insecte puisse être mis en élevage au moins sur une partie de son cycle de vie, ce qui est rarement sans conséquence sur les populations prélevées qui doivent s'adapter aux conditions de laboratoires et subissent souvent des goulots d'étranglement génétique. L'enjeu principal de ces biotests est paradoxal : détecter le plus de diversité phénotypique possible (grande variance) tout en ayant une bonne estimation du niveau de résistance (petite variance) au sein d'une population. Les populations d'insectes testés sont, sauf cas particulier comme les pucerons qui peuvent avoir une reproduction parthénogénétique, constituées de mélanges de génotypes. Une

standardisation la plus rigoureuse possible du matériel biologique (âge, stade, sexe, plante hôte) permet de limiter les variations interindividuelles (Robertson, Savin et al. 2007; Sun 2013; Blouquy, Mottet et al. 2021) et ainsi obtenir des courbes doses-réponses plus fiables. Des variations subsistent toutefois car ces techniques sont très sensibles à l'environnement. L'idéal serait de travailler sur des clones plutôt que sur des populations, mais cela reviendrait à réaliser un biotest par individu sauvage prélevé dans la nature, la difficulté étant de pouvoir réaliser un échantillonnage suffisamment grand et diversifié pour être représentatif de la diversité génétique existante dans les populations sauvages. J'ai entrepris cette démarche pour certains clones de pucerons (chapitre 2.1) et malgré tout nous observons de la variabilité individuelle qui complique l'interprétation de nos biotests. Le meilleur moyen que nous ayons trouvé pour contourner ce problème est d'augmenter le nombre d'individus testés lorsque cela est possible (Blouquy, Mottet et al. 2021). Malgré la grande technicité nécessaire, cette méthode est inévitable pour détecter et caractériser de nouvelles résistances (rapport de résistance, spectre de résistance), mais elle atteint ses limites lorsque l'on souhaite suivre un grand nombre de populations pour étudier la dynamique spatiale des résistances. Il devient alors intéressant d'utiliser des méthodes moléculaires. Jusqu'à maintenant et dans le cadre de la surveillance des résistances sur le territoire français, un ou quelques allèles seulement étaient recherchés par trio bioagresseur/culture/substance active (R4P 2021b). Mais la complexification des mécanismes de résistance, couplée à la démocratisation des NGS, nous amène à faire évoluer nos méthodes. C'est ainsi qu'actuellement, 3 doctorats sont en cours au sein de R₄P et chacun est centré sur un type de bioagresseur (insectes, adventice, champignon phytopathogènes). Ces recherches utilisent des méthodes de GWAS pour élucider les bases génétiques de résistances de façon plus exhaustive, afin d'améliorer les outils de détection se servant de marqueurs moléculaires. Malgré la publication d'études utilisant les NGS pour déterminer les bases génétiques des résistances de divers insectes (Ranson, Claudianos et al. 2002; Oakeshott, Home et al. 2003; do Nascimento, Fresia et al. 2015; Faucon, Dufour et al. 2015; Meisel and Scott 2018; Kothera, Phan et al. 2019), les marqueurs génétiques qui leur sont associés ne sont pas utilisés comme outils de surveillance à ma connaissance. Leur inconvénient principal est de ne pouvoir détecter que les résistances connues. Un avantage est que, au vu des fortes convergences adaptatives entre espèces, les connaissances acquises pour un organisme donné peuvent être mobilisées pour d'autres insectes. Les suivis haut débit et spatialisés des résistances pourraient également aider à répondre à d'autres questions de recherche comme par exemple : Existe-t-il une structuration des résistances en fonction des paysages agricoles, des pratiques phytosanitaires et/ou des conditions pédoclimatiques ? La capacité de dispersion des individus résistants est-elle différente de celle des individus sensibles ? Quelles sont les zones à risque de propagation d'une résistance ? A quelle vitesse une résistance disparaît-elle en absence de pression de sélection dans la nature ?

Dans nos recherches utilisant les résistances comme exemple de micro-évolution, nous nous sommes focalisés sur la molécule d'ADN car c'est elle qui contient l'information sur la structure d'un organisme, et c'est elle qui sera transmise aux générations futures. Bien que ce soit les protéines, et donc le phénotype, qui sont en contact avec les pressions environnementales, la nature et la fonction de ces protéines produites varient tellement dans le temps, entre tissus et entre cellules, qu'il est difficile d'en tirer des conclusions. Au cours de la vie d'un individu, toutes les protéines qui constituent son corps seront renouvelées au moins une fois (Hallgrímsson and Hall 2005). Se concentrer sur le génome facilite donc notre travail. Cependant, en faisant ce choix, nous passons forcément à côté d'informations qui pourraient nous éclairer sur la compréhension des phénomènes de résistance. Les recherches sur les niveaux d'expression des gènes et sur les modifications post-transcriptionnelles *via* l'utilisation des

outils de transcriptomique et de protéomique (Biron, Loxdale et al. 2006; Nedelkov and Nelson 2006; Karr 2008) sont donc essentielles pour compléter nos connaissances. Il me semble également intéressant de mener des recherches sur l'importance des mécanismes d'épigénétique, en particulier en termes de rapport de résistance, de flexibilité, de stabilité dans la descendance (Brevik, Bueno et al. 2021; Yang, Wei et al. 2021), afin de quantifier la part « environnementale » des mécanismes de résistances. En fonction de son importance, elle pourrait ensuite être prise en compte (ou non) dans le développement de nouvelles SA, dans les outils de détection, dans la compréhension des phénomènes adaptatifs chez l'insecte, et dans les préconisations faites pour la gestion de résistance sur le terrain.

Pertinence, robustesse et intérêt de nos recherches pour les agriculteurs

Une veille des résistances

L'étude des résistances présente aussi un intérêt plus concret pour les agriculteurs. Les résistances entraînent des échecs de traitement mais les échecs de traitement ne sont pas forcément la conséquence de résistance. Ces échecs de traitements au champ peuvent être imputés à diverses causes comme la qualité du traitement, les conditions météorologiques, la synchronisation avec le stade de vie sensible du ravageur, les résistances, etc. La détection des résistances dans une parcelle apporte donc une information aux agriculteurs pour qu'ils modifient et adaptent leurs pratiques. Le réseau R₄P, dont je fais activement partie, a des missions de surveillance des résistances aux pesticides sur le territoire français dans le cadre du réseau de Surveillance Biologique du Territoire (SBT). Les biotests étant encore le meilleur moyen de détecter des résistances, nous sommes confrontés au faible nombre de populations testées, et nous ne pouvons donc pas effectuer une surveillance exhaustive du territoire sur l'ensemble des ravageurs « à risque » (R4P 2021b). Nous focalisons notre attention sur les cas pour lesquels des échecs de traitements ont été observés depuis plusieurs années et dans une zone géographique délimitée. Le choix des types de biotests se fait en fonction du mode d'action de l'insecticide (contact, ingestion, fumigant) et en fonction du stade de sensibilité de l'insecte, puisque ce sont deux critères importants à prendre en considération pour être pertinent avec les pratiques mises en place au champ. Le mode d'action de la substance testée doit orienter le mode d'exposition dans les biotests (Sun 2013), par exemple un insecticide agissant par ingestion doit être mélangé à la nourriture. Le stade cible de l'insecticide sur le terrain doit être celui qui est testé au laboratoire, par exemple chez *C. pomonella* c'est le premier stade larvaire (néonates).

Une indication des niveaux de résistances

La question de la transférabilité directe de nos résultats de biotests vers ce qui est observé au champ nous est souvent posée. D'un point de vue personnel, il est vain d'essayer de faire cette gymnastique car, dans la nature, les zones que le traitement n'atteint pas sont beaucoup plus importantes que dans les biotests pour lesquels les insectes sont directement en contact avec l'insecticide, sans possibilité de fuite. Les doses utilisées en biotests sont donc toujours bien inférieures à ce qui est utilisé sur le terrain. Cependant, on observe de bonnes corrélations entre observations de terrain et analyse de laboratoire (Siegwart, Graillot et al. 2017; Siegwart, Thibord et al. 2017; Bothorel, Robert et al. 2018). Il est communément admis qu'un seuil de 10 du rapport de résistance à la DL50 est nécessaire pour qu'une résistance en pratique puisse être déclarée pour les insecticides. Ce seuil est bien inférieur pour les

herbicides, pour qui un rapport de résistance de 3 peut déjà entraîner des échecs de traitements au champ (Manalil, Busi et al. 2011; Busi, Neve et al. 2013). En effet, la plus grande proximité phylogénétique entre culture et adventice plutôt qu'entre culture et insectes ravageurs limite la marge entre la dose qui tue les adventices et celle qui est phytotoxique pour les cultures. Les doses d'herbicides utilisées au champ sont donc relativement proches du point d'inflexion de leurs courbes dose réponse comparativement à celle des insecticides (Ahmed and Chauhan 2015). Un faible rapport de résistance est donc suffisant pour qu'une partie des individus d'une population d'adventices survivent à la dose au champ, ce qui n'est généralement pas le cas pour les insecticides (Roush and McKenzie 1987). Ce constat est surtout vrai pour les insecticides de synthèse, peu onéreux à produire et actifs à faibles doses, et pour lesquels les doses autorisées au champ vont bien au-delà de la DL98. Les produits de biocontrôle, plus onéreux ou difficiles à extraire/produire, sont généralement moins efficaces et vont probablement diminuer cette marge. Il faudra donc revoir ce seuil à la lumière de l'évolution des pratiques au champ.

Des informations pour adapter les traitements

La découverte de la résistance d'*O. nubilalis* aux pyréthrinoïdes dans la région Centre a conduit à l'arrêt de l'utilisation de cette famille chimique dans cette zone géographique. Ce changement a été possible grâce à l'arrivée sur le marché d'une nouvelle substance active présentant un mode d'action différent, le chlorantraniliprole (Bassi, Rison et al. 2009). Une cartographie plus détaillée sur l'ensemble du territoire français a pu être mise en place à l'aide du marqueur kdr (mutation dans la cible moléculaire des pyréthrinoïdes) pour essayer de délimiter la zone impactée par ce phénomène. De manière similaire, le suivi des résistances du carpocapse des pommes au CpGV-M a permis d'élaborer des stratégies d'alternance, entre les isolats viraux efficaces sur les insectes résistants dans les zones touchées et entre les trois isolats commercialisés dans les zones sans détection de résistance. Au vu du faible coût de cette résistante, et comme discuté dans le chapitre 2.2, il est toutefois difficile de savoir si ces stratégies d'alternance ont réellement retardé la propagation de la résistance au CpGV-M. De plus, le nombre de parcelles suivies est trop limité pour permettre la mise en place d'une gestion à une échelle cohérente par rapport aux capacités de dispersion des insectes étudiés.

Cycle de vie et gestion des résistances

Les cas étudiés ici se situent à différents moments du « cycle de vie » d'une résistance (cf. paragraphe A.d. de l'étude bibliographique). Les résistances aux diCT/3,5-diCQ ont été étudiées avant leur utilisation en agriculture dans le cadre d'une démarche prospective. Quant aux résistances d'*O. nubilalis* à des produits de synthèse, elles correspondent à des premières détections de résistance pour ces substances actives dans des parcelles commerciales après un long usage de celles-ci (date de première homologation en France : 1986 pour la lambda-cyhalothrine ; 1978 pour la deltaméthrine). En ce qui concerne *C. pomonella*, la résistance à CpGV-M était en phase d'expansion quand elle a été suivie tandis que celles à la deltaméthrine et au diflubenzuron correspondent à des événements passés pour des substances actives anciennes (date de première homologation en France : 1989 pour le diflubenzuron, qui a été retiré du marché en 2009) et qui ne sont plus que marginalement utilisées contre ce ravageur (cas de la deltaméthrine). Les centres d'intérêts de nos recherches sont différents à chaque étape de l'évolution d'une résistance. Avant la commercialisation de l'insecticide, l'existence d'allèles pouvant conférer des résistances et leurs fréquences dans les populations naturelles est l'enjeu principal. Une fois que la première résistance en pratique est détectée, ce sont les mécanismes et le spectre de

résistance qui importent. Lors de la propagation d'une résistance, les connaissances sur l'existence et la nature d'un coût physiologique deviennent primordiales pour limiter son expansion. Enfin, lorsqu'une résistance est généralisée et que les substances actives ne sont plus utilisées, il est important de comprendre les bases génétiques des résistances croisées pour savoir si les allèles acquis par le passé peuvent être défavorables à de nouveaux moyens de lutte.

La gestion des résistances sur le terrain à l'aide des connaissances acquises tout au long du « cycle de vie » des résistances est une utilisation directe de ce travail de recherche. La première stratégie de gestion préconisée est toujours de diversifier la pression de sélection en utilisant toute autre technique de contrôle (hors insecticides) pour faire baisser les niveaux de populations (culturelle, variétale, lutte physique...) (Phillips, Graves et al. 1989; Roush 1993; Georghiou 1994). Ensuite, et en fonction du spectre d'action et du rapport de résistance, des stratégies d'alternance et de modulation de doses peuvent être proposées. Un suivi de la propagation permet ensuite d'étendre ces propositions et de proposer des actions jouant sur le coût (s'il existe), en préservant des réservoirs sensibles par exemple (Roush 1993; Georghiou 1994; Gryspeirt and Grégoire 2012). Nos observations tendent à montrer que le trade-off entre la capacité à résister à un stress ou à une attaque de pathogène, et la capacité reproductive (fitness) ne sont pas systématiques. Les effets pleïotropes liés à une résistance varient en fonction de l'environnement (Jessup and Bohannan 2008). Une meilleure connaissance de ces interactions « environnement-effets pleïotropes » pourrait être un levier important dans la gestion des résistances. Par exemple, un coût à la résistance qui n'existe qu'à basses températures peut impacter la capacité des insectes à résister au froid (Baker and Porter 2008; Franck, Siegwart et al. 2012). Nos résultats expérimentaux sur *C. pomonella* résistant au CpGV-M, obtenus en condition de laboratoire, n'offrent donc qu'une vision limitée de ces effets. La rapide détection de cette résistance dans des parcelles très éloignées en Europe nous conduit toutefois à nous interroger sur son origine. L'absence de coût important pour cette mutation serait-elle à l'origine de son omniprésence en Europe, comme c'est le cas pour *kdr* ?

De manière plus générale, les (bio)insecticides ont une durabilité limitée dans le temps, et ils devraient être considérés comme un bien commun et faire l'objet de mesures collectives pour les préserver afin de limiter leurs effets secondaires tout en maintenant une production agricole suffisante. Les modèles de surveillance et de gestion collective des résistances à l'échelle des territoires/pays sont ceux qui ont montré le plus d'intérêt (R4P 2021a). Mettre au point des ateliers pour la conception collective de plans de surveillance des résistances en France semble important pour impliquer tous les acteurs agricoles, dans une démarche responsable. Il est également essentiel de développer des outils d'identification/détection rapides et haut débit afin d'adapter en temps réel les stratégies de lutte à l'échelle des territoires. Nos avancées scientifiques n'auront de réelles utilités sur les acteurs de l'agriculture que si elles s'accompagnent d'une communication large et ciblée. Il faudrait donc adapter nos supports de diffusion pour que l'information soit disponible pour tous, par exemple sous forme de cartes des résistances libres d'accès sur internet.

Bases génétiques des résistances

Les résistances aux insecticides de synthèse que j'ai étudiées ont montré un déterminisme complexe, avec des rapports de résistance faibles à moyens et une grande variabilité entre populations et même entre individus (chapitre 1). 70 ans d'utilisation intensive d'insecticides en agriculture ont sélectionné de nombreux allèles conférant des résistances (Ranson, Claudianos et al. 2002; Oakeshott, Home et al.

2003; Faucon, Dusfour et al. 2015; Meisel and Scott 2018). L'utilisation de substances actives insecticides moins persistantes et plus spécifiques pourrait modifier le processus sélectif en faveur d'une diversité de mécanismes à effets partiels jusque-là masqués par des allèles à effets forts, comme discuté dans les conclusions du chapitre 1 (Roush and Tabashnik 1990). Un parallèle peut aussi être fait avec les résultats du chapitre 2.1, qui montrent deux profils de moindre sensibilité au diCT, l'un étant un trait quantitatif avec des faibles rapports de résistance (probablement lié à la fitness des individus), l'autre un trait qualitatif. Le premier est probablement lié à la somme de petits effets d'un grand nombre de gènes (QTL) (Firko and Leslie Hayes 1990), alors que le phénotype tranché du second trait suggère qu'il est associé à un gène majeur. Ce dernier cacherait l'effet de gènes à effets partiels s'ils étaient aussi présents. Cela soulève la question de la difficulté que nous rencontrons pour quantifier l'effet de chaque mutation/mécanisme. Pour mesurer avec précision l'effet de chaque gène, il faudrait disposer d'outil de validation fonctionnelle de gènes performant de type RNAi (Homem and Davies 2018). Chez les lépidoptères, l'utilisation de la technique de CrispR-cas9, pour obtenir des souches mutantes au niveau de la nucléase empêchant le RNAi, pourrait être très utile (Guan, Li et al. 2018). Une fois les effets individuels de chaque gène déterminé, il faudrait ensuite étudier les effets cumulés tenant compte de leurs interactions.

Mobiliser nos connaissances pour augmenter la durabilité des bioinsecticides

La demande en pesticide d'origine naturelle se fait de plus en plus forte pour remplacer les substances actives de synthèse qui ne sont plus homologuées (Cf. paragraphe D. de l'étude bibliographique). La quantité de recherche nécessaire à la découverte puis au développement de nouveaux biopesticides est énorme. Assurer la durabilité de cette nouvelle génération de pesticides est un enjeu de taille pour l'agriculture.

Au regard des phénomènes de résistance, les insecticides d'origines naturelles peuvent être catégorisés en deux sous-groupes : ceux capables d'évolution (et qu'on laisse évoluer) et ceux qui sont fixés. Les micro et macro-organismes font partie de la première catégorie alors que les extraits (de plante, de micro-organismes), les stimulateurs de défense des plantes et les sémiocimiques font partie de la seconde (Fauvergue, Rusch et al. 2020).

Le cas de résistance de *C. pomonella* à CpGV-M est un bon exemple de la première catégorie de bioinsecticides. Assurer la durabilité de ce type de bioinsecticide peut donc passer par une mise en contact entre agents de bio-contrôle et les ravageurs de l'année pour stimuler/provoquer l'évolution des premiers. Mais quelle est la bonne échelle de temps et quelle est la taille et la répartition d'un échantillonnage cohérent pour parvenir à prendre en compte un maximum de diversité chez l'insecte ? Actuellement les produits de biocontrôle (sauf pour les macro-organismes) font l'objet de demandes d'autorisation de mise sur le marché comme les insecticides chimiques (Anses-Ephy 2021). Les modifier pour qu'ils s'adaptent à la pression parasitaire d'une année et/ou d'une région pose des problèmes de durée et de coût d'enregistrement auprès des autorités qui régulent la commercialisation des pesticides (Fauvergue, Rusch et al. 2020). Même si une partie des biopesticides ont un potentiel adaptatif qui pourrait être utilisé pour contrer les phénomènes de résistance, leur utilisation reste donc difficile dans le cadre d'une agriculture standardisée. En attendant que la législation évolue elle aussi vers plus de flexibilité, la recherche utilise les sources de variabilité présentes dans la nature pour proposer de nouvelles solutions lorsque des problèmes de résistances se généralisent. C'est ainsi que suite à la généralisation de la résistance de *C. pomonella* au CpGV-M, de nouveaux isolats efficaces sur ces

tordeuses résistantes ont été recherchés dans la nature puis « forcés » à se multiplier plusieurs fois sur la souche résistante au laboratoire avant d'être homologués puis mis sur le marché (Berling, Blachere-Lopez et al. 2009). Ceci illustre l'hypothèse de biologie évolutive proposée par Leigh Van Valen et connue sous le nom de « reine rouge » : « l'évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour maintenir son aptitude face aux évolutions des espèces avec lesquelles elle coévolue » (Van Valen 1977). Le postulat de base de cette hypothèse est que la « reine rouge » ne s'arrête pas de courir. Si un système de coévolution systématique n'est pas mis en place, la recherche est condamnée à chercher en permanence de nouveaux produits. C'est ainsi qu'en 2020, nous avons identifié un nouveau cas de multi-résistance de *C. pomonella* à deux nouveaux isolats viraux en plus de CpGV-M (Siegwart, Maugin et al. 2020), et que nous avons initié un nouveau projet de recherche. Notre objectif étant de moduler à nouveau les capacités évolutives du virus pour résoudre ce problème de résistance. Notre démarche s'inscrit dans ce que les politiques, repris par certains scientifiques, appellent les « nature based solutions » (Cohen-Shacham, Walters et al. 2016) et qui se définissent comme des actions visant à protéger, gérer durablement et restaurer des écosystèmes naturels ou modifiés, afin qu'ils répondent efficacement et de manière adaptative aux défis sociétaux, tout en offrant des avantages en termes de bien-être humain et de biodiversité.

Les extraits naturels issus de plantes, comme le diCT/3,5-diCQ, sont de bons exemples de biopesticides « non-évolutifs » ou inertes. La pression de sélection qu'occasionnent les insecticides d'origine biologiques conduit à des adaptations des ravageurs et, comme une co-évolution de l'agent de biocontrôle n'est pas possible, des phénomènes semblables à ce qu'on a pu observer pour les insecticides chimiques se produisent (Siegwart, *et al.*, 2015). L'enjeu est donc de connaître et anticiper les éventuelles résistances, et ceci est d'autant plus important qu'une fois installées, elles seront difficiles à contourner. Mobiliser les connaissances acquises sur les mécanismes et la gestion des résistances aux insecticides chimiques pour les appliquer à ce cas de figure devient alors un atout. Les résultats obtenus dans le chapitre 2.1 ne montrent pas de forte implication des carboxylestérases ni des glutathion S-transferases dans de moindres sensibilités de *M. persicae* au diCT/3,5-diCQ, ce qui laisse à penser que les mécanismes d'insensibilité mis en œuvre sont différents de ceux connus pour les résistances aux OPs. Cependant, les profils de variation continue de sensibilité entre différents clones ou populations de *M. persicae*, probablement due à la taille des individus, ressemblent beaucoup à ce qu'on a observé pour des insecticides de synthèse (Firko and Leslie Hayes 1990). De plus, le profil d'insensibilité tranché du clone d'*A. craccivora* ressemble à ce que l'on peut observer pour une résistance à des insecticides de synthèse monogénique à effet fort (Daborn and Le Goff 2004). Sachant que si la pression de sélection est faible (faible dose), c'est le premier type de résistance (plus difficile à gérer) qui est sélectionné tandis que les fortes doses sélectionnent le second (Daborn and Le Goff 2004), il faudrait veiller à ce que l'efficacité des produits de bio-contrôle soit suffisamment bonne pour limiter ces difficultés. La durabilité des bioinsecticides est souvent négligée au profit de recherche sur leur efficacité (Kumar 2015), ce qui est le plus souvent le problème principal de ces produits. Ces deux notions sont toutefois très corrélées entre elles, comme d'autre l'on constaté pour les cultures OGM (Guillemaud, Lombaert et al. 2016).

Par analogie avec les insecticides de synthèse, l'augmentation de la complexité des produits utilisés pourrait permettre d'améliorer la durabilité des bioinsecticides (Koul, Singh et al. 2004). Pour les mêmes raisons, les bonnes pratiques d'utilisation des insecticides de synthèse mises en place pour gérer les résistances (utilisation de moyens de lutte alternatifs, alternance, mosaïque, mélanges) devraient donc être appliqués aux produits de bio-contrôle.

Enfin, et toujours de manière similaire aux insecticides de synthèse, les spectres et niveaux de résistance sont particuliers à chaque trio ravageur/agent de biocontrôle/culture. Chaque cas doit donc être étudié précisément pour trouver les meilleurs moyens de gestion. Par exemple, la fausse-arpenreuse du chou (*T. ni*) a développé des résistances au Bt qui se sont révélées croisées négativement à un nucleopolyedrovirus (Sarfraz, Cervantes et al. 2010). La gestion de cette résistance est donc facilement résolue par une alternance d'utilisation de ces deux substances actives. Au contraire, la résistance de *C. pomonella* à CpGV-M est forte (RR> 13 000) et exempte de coût important, le recours à des techniques alternatives comme des filets semble donc plus adaptée à ce cas particulier.

Les observations que j'ai pu faire sur diverses espèces d'insectes ayant développées des résistances à des (bio)insecticides m'amènent à me poser des questions plus fondamentales sur l'évolution des capacités évolutives en général. En effet, quelques espèces semblent avoir les capacités à survivre à tous les stress pendant que la majorité s'éteint massivement. Sur 450 espèces d'insectes ayant développé des résistances, seules 12% sont résistantes à au moins 3 substances actives (Georghiou 1986). Cette réflexion m'amène à poser ici des perspectives élargies sur mes recherches.

PERSPECTIVES

Résistances et biologie évolutive : quelles leçons ?

Les résistances des insectes aux insecticides sont des exemples de micro-évolution qu'il est intéressant d'analyser dans le cadre des théories de biologie évolutive. Le darwinisme repose schématiquement sur le principe d'une variation continue et aléatoire du vivant qui, une fois triée par le jeu du hasard (dérive génétique) ou par l'environnement (sélection naturelle), conduit à des phénomènes de différenciation pouvant aller jusqu'à la spéciation (David and Samadi 2011; Lefevre, Raymond et al. 2016). Ce schéma a depuis été enrichi dans un cadre néo-darwinien. Par exemple, des modèles statistiques ont montré que les taux de mutations dans un génome ne sont pas aléatoires (Martincorena, Seshasayee et al. 2012). En regardant les résultats publiés sur les résistances ainsi que mes propres résultats, je me demande si cette variabilité du taux de mutation pourrait expliquer la très grande rapidité d'apparition (Sparks, Dripps et al. 2012) et la forte convergence génique des allèles de résistance (Rinkevich, Du et al. 2013) ? Dans des environnements changeant, la question de la réversibilité de l'effet d'un stress sur le génome (épigénétique) est également importante. Quel est le pas de temps est nécessaire pour avoir une probabilité importante de fixation d'une modification dans l'ADN ? C'est une piste que j'aimerais étudier par la suite dans le cadre d'une collaboration avec les membres du réseau R₄P.

Les 2 spécificités dans nos exemples de résistance aux insecticides

Les 2 spécificités des résistances aux insecticides au regard des lois de l'évolution, rapidité d'apparition de résistance et convergence génétique, ont déjà été discutées de nombreuses fois. Elles sont souvent attribuées à (i) un nombre d'individus très important chez les espèces de ravageurs (et mal estimé par les modélisateurs) (Karasov, Messer et al. 2010) et (ii) par une contrainte physiologique forte sur une cible moléculaire vitale (Daborn and Le Goff 2004). Mais dans ce cas pourquoi les « ravageurs secondaires » qui ne sont pas en compétition pour la ressource avec les ravageurs principaux développent rarement des résistances, alors même qu'ils ont aussi des fertilités élevées et sont également soumis aux mêmes pressions de sélection sur les mêmes cibles moléculaires ? C'est

pourquoi, j'ai souhaité rediscuter ces points à travers les exemples de résistances présentés dans ce doctorat.

- Rapidité d'apparition de résistance

Il semblerait que la richesse des insectes en gène de défense contre certains xénobiotiques joue un rôle important dans la rapidité avec laquelle ces espèces arrivent à mobiliser des mécanismes de détoxification contre des insecticides ou d'autres xénobiotiques (Rosenheim, Johnson et al. 1996; Hufbauer and Roderick 2005; Heidel-Fischer and Vogel 2015). Dans leur méta-analyse portant sur 615 espèces d'insectes, et comparant les piqueurs suceurs (moins en contact avec des xénobiotiques) aux broyeurs (plus en contact avec des xénobiotiques), Rosenheim et al. (1996) montrent que les insectes piqueurs-suceurs ont des capacités de détoxification moins importantes tout en étant moins sujets aux résistances (Rosenheim, Johnson et al. 1996). Une comparaison de plusieurs études de génomique sur l'induction de gènes de détoxification dans 4 espèces du genre *Spodoptera* montre que les enzymes de détoxification peuvent avoir de larges spécificités de substrat, englobant à la fois les substances phytochimiques et les pesticides synthétiques (Amezian, Nauen et al. 2021)(ref). Chez *C. pomonella*, nous avons vu qu'il existe au moins 520 gènes (si on enlève les cibles moléculaires qui sont spécifiques à des modes d'action insecticides) qui peuvent être mobilisés ou modifiés pour permettre à l'insecte de survivre et de se reproduire en présence d'insecticides. Cela démultiplie les possibilités, et donc les probabilités, d'acquérir des résistances *via* le jeu de mutations aléatoires. Cependant, cet argument ne suffit pas à expliquer l'écart entre le taux d'apparition des résistances observé et ceux prédits par les modèles (Cf paragraphe A.b de l'étude bibliographique).

- Convergence génétique

La mutation *kdr* que nous avons mis en évidence chez *O. nubilalis* ajoute une observation supplémentaire aux nombreux constats de convergence génétique entre espèces pour la résistance aux pyréthriinoïdes. Dans notre exemple, elle est associée à divers mécanismes de détoxification, laissant penser que l'apparition de cette mutation est ancienne. L'existence de cette mutation dans des populations qui ne peuvent pas se reproduire entre elles (Thomas, Bethenod et al. 2003) suggère que son origine provient soit d'un événement unique avant la séparation des deux populations, soit de deux évènements distincts après cette séparation (convergence). Les faibles effets pléiotropes de *kdr* sont un argument en faveur de la première hypothèse (Foster, Woodcock et al. 1999; Sakyi, Sarfo et al. 2005; Brito, Linss et al. 2013). En effet, si cette mutation est apparue il y a longtemps par hasard, son absence de coût est en faveur de son maintien dans les populations avant l'utilisation des pyréthriinoïdes. Cependant, les marqueurs génétiques à proximité de cette mutation chez d'autres espèces tendent à indiquer que des évènements distincts de mutation ont eu lieu, ce qui augmente le nombre d'évènements de mutation au même locus (Franck et al. 2012, Rinkevich et al. 2012b, Rinkevich et al. 2012a). Non seulement de nombreuses espèces portent cette mutation *kdr*, mais au sein d'une même espèce, plusieurs évènements seraient à l'origine de ce changement sur un locus précis ; Il me semble que la probabilité qu'ils soient uniquement dus au hasard est donc faible. L'effet Baldwin (Cf paragraphe C.d de l'étude bibliographique) pourrait pour partie apporter une explication à cette convergence. Les mécanismes moléculaires responsables de cet effet pourraient être expliqués par une augmentation de la fréquence de mutation à un locus déterminé suite à des méthylation de l'ADN induites par des stress environnementaux (épigénétique). En effet, il a été montré que la déméthylation endommageait les cystéines qui étaient alors plus facilement transformées en thymine (Zhou, He et al. 2020). Cette hypothèse mériterait d'être étudiée de manière plus approfondie, en vérifiant par exemple s'il existe un déséquilibre du taux de mutation de cystéines vers des thymines à l'origine de résistance.

Chez *O. nubilalis* comme chez *C. pomonella*, la mutation *kdr* correspond à l'échange d'une cystéine en une thymine.

Des espèces avec des capacités d'évolution élevées ?

A l'intérieur d'un génome, le taux de mutation est variable entre gènes, et c'est aussi le cas entre espèces et même entre populations d'une même espèce (Martincorena, Seshasayee et al. 2012). De ce constat, qui met en évidence que les mutations ne sont pas purement aléatoires, est né un questionnement sur le déterminisme de la capacité à évoluer (Heams, Philippe et al. 2011). L'évolutivité définit la capacité d'un organisme ou d'une population à évoluer, et cette aptitude est elle aussi soumise à l'évolution (Earl and Deem 2004). Dans leur étude par modélisation, Earl et Deem ont montré que la diversité protéique d'un trait augmente de façon linéaire avec la sévérité et la fréquence des changements environnementaux. L'évolutivité est donc sélectionnée dans un environnement perturbé. Les populations qui sont sujettes à des changements environnementaux importants sont sélectionnées pour leur plus grande évolutivité. Un parallèle peut être fait avec certains insectes invasifs d'origine exotique qui sont considérés comme des ravageurs. Ils ont subi des goulots d'étranglement successifs, combinés à des pressions de sélection fortes et répétées, notamment insecticides, qui devraient se traduire par une moindre diversité génétique que des espèces endémiques, or ce n'est pas le cas (Rosenheim, Johnson et al. 1996).

On peut également se poser la question de l'évolution de l'évolutivité, pour le cas du carpocapse des pommes, et imaginer l'impact de l'arrivée d'un nouveau stress notamment parasitaire (Earl and Deem 2004). En effet, il serait intéressant d'évaluer si des populations de carpocapse des pommes ont acquis une évolutivité élevée à cause des nombreux stress environnementaux subis (traitements insecticides entre autres) mais aussi au vu des multiples résistances qu'elles ont développées. D'après Earl et Deem (2004), l'exposition à des stress augmente aussi la probabilité de s'adapter à d'autres stress comme l'attaque de parasites, or *C. pomonella* a développé récemment des résistances à CpGV-M, CpGV-R5, CpGV-V15 (Siegwart, et al., 2020), après avoir développé des résistances à de nombreux insecticides de synthèse et au spinosad (Reyes et al. 2009). Le risque d'apparition de résistances croisées entre insecticides d'origine naturel ou non serait plus élevé chez les espèces ayant déjà développé d'autres résistances (Alyokhin and Chen 2017). Dans mes futures recherches, j'aimerais essayer de déterminer si le carpocapse des pommes possède une capacité évolutive plus importante que d'autres espèces et, si cela est vrai, est-ce que cette capacité évolutive inclue la résistance à un insecte parasitoïde, *Mastrus ridens* (Hymenoptera, Ichneuminidae), récemment introduit en Europe dans le cadre d'un programme de lutte biologique par acclimatation. Ce moyen de lutte suppose une co-évolution entre le ravageur cible et le parasitoïde introduit. Si jamais ces deux types d'organismes présentent des rythmes évolutifs différents, est-ce que la durabilité de cette lutte biologique est également remise en cause ?

Epilogue

Il y a 60 ans, Rachel Carson a fait valoir qu'en plus de leurs nombreux effets écologiques néfastes, les insecticides finissent par éroder la gestion durable des ravageurs, car ils tuent les parasitoïdes et les prédateurs qui s'attaquent aux ravageurs tandis que ces derniers deviennent résistants et nécessitent des quantités toujours plus importantes de pulvérisations pour être contrôlés (Carson, 1968). Suite à ce constat, le demi-siècle qui vient de s'écouler a connu une évolution des types de pesticides utilisés pour en limiter les effets secondaires sans que les rendements agricoles ne soient impactés. En effet, l'augmentation de la population humaine couplée à des habitudes alimentaires toujours plus riches, encourage une exploitation intensive des ressources de notre planète. J'ai le sentiment que nous arrivons maintenant aux limites de cet équilibre rendement/effets secondaires, c'est-à-dire que si l'on souhaite réellement limiter d'avantage les effets secondaires de l'agriculture en Europe (et dans le monde), cela passera par une réduction des rendements et surtout par un changement de paradigme sur la place de l'espèce humaine dans notre environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, W. S. (1925). "A method of computing the effectiveness of an insecticide." Journal of Economic Entomology **18**: 275-277.
- Acta-phytosanitaire, E., Ed. (2019). 55e index acta phytosanitaire 2019. Paris.
- Adolfi, A., B. Poulton, et al. (2019). "Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector, *Anopheles gambiae*." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(51): 25764-25772.
- Agianian, B., P. A. Tucker, et al. (2003). "Structure of a Drosophila sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products." Journal of molecular biology **326**(1): 151-165.
- Agreste. (2020). "https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/IraGcu2040/2020_40inforapgdescultures.pdf."
- Ahmed, S. and B. S. Chauhan (2015). "Efficacy and phytotoxicity of different rates of oxadiargyl and pendimethalin in dry-seeded rice (*Oryza sativa* L.) in Bangladesh." Crop protection **72**: 169-174.
- Ahsaei, S. M., S. M. Tabadkani, et al. (2013). "Differential accumulation of energy by the colour morphs of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) mirrors their ecological adaptations." European Journal of Entomology **110**(2).
- Akbar, S. M., R. M. Aurade, et al. (2014). "Mitochondrial P-glycoprotein ATPase contributes to insecticide resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera)." Cell biochemistry and biophysics **70**(1): 651-660.
- Allaire, J. (2012). "RStudio: integrated development environment for R." Boston, MA **770**(394): 165-171.
- Alyokhin, A. and Y. H. Chen (2017). "Adaptation to toxic hosts as a factor in the evolution of insecticide resistance." Current opinion in insect science **21**: 33-38.
- Amezian, D., R. Nauen, et al. (2021). "Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects-An overview." Pesticide Biochemistry and Physiology: 104822.
- Andermatt, M., E. Mani, et al. (1988). "Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions." Entomologia Experimentalis et Applicata **49**(3): 291-295.
- Anses-Ephy. (2021). "<https://ephy.anses.fr/>."
- Anthony, N., T. Unruh, et al. (1998). "Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, *Myzus persicae*." Molecular and General Genetics MGG **260**(2): 165-175.
- Arias, O., E. Cordeiro, et al. (2019). "Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Implications for insect resistance management programs." Pest Management Science **75**(11): 2948-2957.
- Arnaud, L. and E. Haubruge (2002). "Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle." Evolution **56**(12): 2435-2444.
- Arthur, W. (2003). "Micro-, macro-, and megaevolution." Keywords and concepts in evolutionary developmental biology: 243-260.
- Asser-Kaiser, S., E. Fritsch, et al. (2007). "Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance." Science **317**(5846): 1916-1918.
- Attig, L., A. Gabory, et al. (2010). "Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows." Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care **13**(3): 284-293.
- Baer, C. F., M. M. Miyamoto, et al. (2007). "Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences." Nature Reviews Genetics **8**(8): 619-631.
- Baker, M. B. and A. H. Porter (2008). "Use of sperm precedence to infer the overwintering cost of insecticide resistance in the Colorado potato beetle." Agricultural and Forest Entomology **10**(3): 181-187.
- Balabanidou, V., L. Grigoraki, et al. (2018). "Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance." Current opinion in insect science **27**: 68-74.
- Balachowsky, A. S. (1966). Entomologie appliquée à l'agriculture. Paris.

- Baldwin, J. M. (1896). "A New Factor in Evolution." The American Naturalist **30**(354): 441-451.
- Baptée, L., E. Lecerf, et al. (in prep). "Infiltration de solutions insecticide dans des feuilles de vigne et de tabac pour la réalisation des biotests." Cahier des techniques de l'Inra.
- Bass, C. and L. M. Field (2011). "Gene amplification and insecticide resistance." Pest Management Science **67**(8): 886-890.
- Bass, C., A. M. Puinean, et al. (2014). "The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **51**: 41-51.
- Bassi, A., J. Rison, et al. (2009). "Chlorantraniliprole (DPX-E2Y45, Rynaxypyr®, Coragen®), a new diamide insecticide for control of codling moth (*Cydia pomonella*), Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and European grapevine moth (*Lobesia botrana*)." Nova Gorica **4**(5): 39-45.
- Bates, D., M. Mächler, et al. (2015). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1–7. 2014.
- Beaubrun en famille Diant, I. (2014). « Chlordécone » : Le douloureux réveil. L'évaluation et la prévention de l'impact sanitaire et environnemental de ce pesticide en Martinique. MEDECINE ET PHARMACIE. POITIERS, université de Poitiers. **Docteur**.
- Beranek, A. (1974). "Esterase variation and organophosphate resistance in populations of *Aphis fabae* and *Myzus persicae*." Entomologia Experimentalis et Applicata **17**(2): 129-142.
- Berenbaum, M. R. and R. M. Johnson (2015). "Xenobiotic detoxification pathways in honey bees." Current opinion in insect science **10**: 51-58.
- Berling, M. (2009). Durabilité du contrôle du carpocapse des pommes et des poires (*Cydia pomonella*) avec le virus de la granuloose (CpGV): Résistance *versus* Virulence. Science. Pau, France, Pau et des pays de l'Adour. **Doctorat**: 156.
- Berling, M., C. Blachere-Lopez, et al. (2009). "Cydia pomonella granulovirus Genotypes Overcome Virus Resistance in the Codling Moth and Improve Virus Efficiency by Selection against Resistant Hosts." Applied and Environmental Microbiology **75**(4): 925-930.
- Berling, M., C. Blachere-Lopez, et al. (2009). "Cydia pomonella granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts." Appl Environ Microbiol **75**(4): 925-930.
- Berling, M., B. Sauphanor, et al. (2013). "A single sex-linked dominant gene does not fully explain the codling moth's resistance to granulovirus." Pest Management Science **69**(11): 1261-1266.
- Bertin, A. and S. Mangenot (2008). "Structure et dynamique de la particule cœur de nucléosome." médecine/sciences **24**(8-9): 715-719.
- Beukel, I. v. d., F. A. Dijcks, et al. (1997). "Differential Muscarinic Receptor Binding of Acetylcholinesterase Inhibitors in Rat Brain, Human Brain and Chinese Hamster Ovary Cells Expressing Human Receptors." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **281**(3): 1113-1119.
- Bhutani, N., D. M. Burns, et al. (2011). "DNA demethylation dynamics." Cell **146**(6): 866-872.
- Biron, D. G., H. D. Loxdale, et al. (2006). "Population proteomics: an emerging discipline to study metapopulation ecology." Proteomics **6**(6): 1712-1715.
- Bishop, D. H., M. L. Hirst, et al. (1995). "Genetic engineering of microbes: virus insecticides a case study" Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends **53**: 249.
- Blackman, R., G. Malarky, et al. (2007a). "Distribution of common genotypes of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in Greece, in relation to life cycle and host plant." Bulletin of Entomological Research **97**(3): 253-263.
- Blackman, R. L. and V. F. Eastop (2007b). "Taxonomic issues." Aphids as crop pests **1**: 1-29.
- Blanton, A. G. and B. F. Peterson (2020). "Symbiont-Mediated Insecticide Detoxification as an Emerging Problem in Insect Pests." Frontiers in microbiology **11**: 2422.
- Blissard, G. W. and G. F. Rohrmann (1990). "Baculovirus diversity and molecular biology." Annual Review of Entomology **35**(1): 127-155.
- Blommers, L. H. M. (1994). "Integrated Pest Management in European Apple Orchards." Annual Review of Entomology **39**(1): 213-241.
- Blouquy, L., C. Mottet, et al. (2021). "How varying parameters impact insecticide resistance bioassay: An

- example on the worldwide invasive pest *Drosophila suzukii*." *Plos One* **16**(3): e0247756.
- Boaventura, D., B. Buer, et al. (2020). "Toxicological and molecular profiling of insecticide resistance in a Brazilian strain of fall armyworm resistant to Bt Cry1 proteins." *Pest Management Science*.
- Bohnenblust, E. W., J. A. Breining, et al. (2014). "Current European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, injury levels in the northeastern United States and the value of Bt field corn." *Pest Management Science* **70**(11): 1711-1719.
- Boivin, T. (2003a). Pléiotropie de la résistance aux insecticides : estimation, manifestations écologiques et modélisation chez le carpocapse des pommes *Cydia pomonella* (L.). Science de la vie. Avignon, Université d'Avignon. **PhD**.
- Boivin, T., J.-C. Bouvier, et al. (2003b). "Phenological segregation of insecticide resistance alleles in the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): a case study of ecological divergences associated with adaptive changes in populations." *Genetics Research* **81**(3): 169-177.
- Boivin, T., J. C. Bouvier, et al. (2004). "Variability in diapause propensity within populations of a temperate insect species: interactions between insecticide resistance genes and photoperiodism." *Biological Journal of the Linnean Society* **83**(3): 341-351.
- Boivin, T., C. Chabert d'Hieres, et al. (2001). "Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*." *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **99**(3): 381-386.
- Booth, J., E. Boyland, et al. (1961). "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione." *Biochemical Journal* **79**(3): 516-524.
- Bothorel, S., C. Robert, et al. (2018). Resistance to pyrethroid insecticides in cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*) and rape winter stem weevil (*Ceutorhynchus picitarsis*) populations in France. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC-WPRS*. Zagreb (Croatia). **136**: 89-104.
- Bourguet, D., J. Chaufaux, et al. (2003). "Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*." *Theoretical and Applied Genetics* **106**(7): 1225-1233.
- Bourguet, D., T. Lenormand, et al. (1997). "Variation of dominance of newly arisen adaptive genes." *Genetics* **147**(3): 1225-1234.
- Bouvier, J. C., R. Bues, et al. (2001). "Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera : Tortricidae): inheritance and number of genes involved." *Heredity* **87**: 456-462.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**.
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. *Advances in Genetics*. E. W. Caspari and J. M. Thoday, Academic Press. **13**: 115-155.
- Bradshaw, A. D. (2006). "Unravelling phenotypic plasticity – why should we bother?" *New Phytologist* **170**(4): 644-648.
- Bradshaw, W., C. Holzapfel, et al. (1998). "Hourglass and rhythmic components of photoperiodic time measurement in the pitcher plant mosquito, *Wyeomyia smithii*." *Oecologia* **117**(4): 486-495.
- Brady, C. M. and J. A. White (2013). "Cowpea aphid (*Aphis craccivora*) associated with different host plants has different facultative endosymbionts." *Ecological Entomology* **38**(4): 433-437.
- Braendle, C., G. K. Davis, et al. (2006). "Wing dimorphism in aphids." *Heredity* **97**(3): 192-199.
- Brengues, C., N. J. Hawkes, et al. (2003). "Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene." *Medical and veterinary entomology* **17**(1): 87-94.
- Bretschneider, T., R. Fischer, et al. (2012). "Tetronic acid insecticides and acaricides inhibiting acetyl-CoA carboxylase." *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals* (eds C. Lamberth and J. Dinges), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Brevik, K., E. M. Bueno, et al. (2021). "Insecticide exposure affects intergenerational patterns of DNA methylation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*." *Evolutionary Applications* **14**(3): 746-757.
- Brevik, K., L. Lindström, et al. (2018). "Transgenerational effects of insecticides—implications for rapid pest evolution in agroecosystems." *Current opinion in insect science* **26**: 34-40.
- Brito, L. P., J. G. B. Linss, et al. (2013). "Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on

- Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost." Plos One **8**(4).
- Bronner, C., G. Fuhrmann, et al. (2009). "UHRF1 links the histone code and DNA methylation to ensure faithful epigenetic memory inheritance." Genetics & epigenetics **2**: GEG. S3992.
- Brun-Barale, A., J. Bouvier, et al. (2005). "Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L, and development of a diagnostic test." Pest Management Science **61**: 549-554.
- Bush, M., Y. Abdel-AAL, et al. (1993). "Parathion resistance and esterase activity in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from North Carolina." Journal of economic entomology **86**: 660.
- Busi, R., P. Neve, et al. (2013). "Evolved polygenic herbicide resistance in *L. olivum rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation." Evolutionary Applications **6**(2): 231-242.
- Bylesjö, M., D. Eriksson, et al. (2007). "Data integration in plant biology: the O2PLS method for combined modeling of transcript and metabolite data." The Plant Journal **52**(6): 1181-1191.
- Cahenzli, F., T. Strack, et al. (2018). "Screening of 25 different natural crop protection products against *Drosophila suzukii*." Journal of Applied Entomology **142**(6): 563-577.
- Cardoso, P., P. S. Barton, et al. (2020). "Scientists' warning to humanity on insect extinctions." Biological Conservation **242**: 108426.
- Carson, R. (1968). "Silent spring". J. Public Health **58**, 2043.
- Carvalho, R. A., A. M. L. Azeredo-Espin, et al. (2010). "Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance." BMC Genomics **11**(1): 1-13.
- Casida, J. E. and G. B. Quistad (1998). "Golden age of insecticide research: past, present, or future?" Annual Review of Entomology **43**(1): 1-16.
- Cassanelli, S., M. Reyes, et al. (2006). "Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.)." Insect Biochemistry and Molecular Biology **36**(8): 642-653.
- Catania, F., M. Kauer, et al. (2004). "World-wide survey of an Accord insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*." Molecular ecology **13**(8): 2491-2504.
- Cattel, J., F. Faucon, et al. (2020). "Combining genetic crosses and pool targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*." Evolutionary Applications **13**(2): 303-317.
- Chanawong, A., P. I. Mackenzie, et al. (2017). "Exemestane and its active metabolite 17-hydroexemestane induce UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B17 expression in breast cancer cells." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **361**(3): 482-491.
- Chang, A., S. Singh, et al. (2011). "Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation." Current opinion in biotechnology **22**(6): 800-808.
- Chang, C. C., C. C. Chow, et al. (2015). "Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets." Gigascience **4**(1): s13742-13015-10047-13748.
- Chelvanayagam, G., M. W. Parker, et al. (2001). "Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases."
- Chen, L., P. R. Hall, et al. (2003). "Structure of an insect δ -class glutathione S-transferase from a DDT-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **59**(12): 2211-2217.
- Claudianos, C., H. Ranson, et al. (2006). "A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee." Insect molecular biology **15**(5): 615-636.
- Coeur d'Acier, A., E. Jouselin, et al. (2007). "Phylogeny of the genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences." Molecular phylogenetics and evolution **42**(3): 598-611.
- Cohen-Shacham, E., G. Walters, et al. (2016). "Nature-based solutions to address global societal challenges." IUCN: Gland, Switzerland **97**.
- Corbel, V., M. Stankiewicz, et al. (2006). "Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system." NeuroToxicology **27**(4): 508-519.
- Corl, A., K. Bi, et al. (2018). "The Genetic Basis of Adaptation following Plastic Changes in Coloration in a

- Novel Environment." Current Biology **28**(18): 2970-2977.e2977.
- Corley, S. W., N. N. Jonsson, et al. (2013). "Mutation in the Rm β AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(42): 16772-16777.
- Coustau, C. and C. Chevillon (2000). "Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost?" Trends in Ecology & Evolution **15**(9): 378-383.
- Crews, S. T. and J. C. Pearson (2009). "Transcriptional autoregulation in development." Current biology : CB **19**(6): R241-R246.
- Crow, J. F. (1957). "Genetic of insect resistance to chemicals." Annual Review of Entomology **2**: 227-246.
- Curtis, C. (1985). "Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance." Bulletin of Entomological Research **75**(2): 259-266.
- Cutler, C., K. Ramanaidu, et al. (2009). "Green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), reproduction during exposure to sublethal concentrations of imidacloprid and azadirachtin." Pest Management Science: formerly Pesticide Science **65**(2): 205-209.
- Cutler, G. C. (2013). "Insects, Insecticides and Hormesis: Evidence and Considerations for Study." Dose-Response **11**(2): 154-177.
- Daborn, P. J. and G. Le Goff (2004). "The genetics and genomics of insecticide resistance." Trends in Genetics **20**(3): 163-170.
- Daborn, P. J., C. Lumb, et al. (2007). "Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression." Insect Biochemistry and Molecular Biology **37**(5): 512-519.
- Daborn, P. J., J. L. Yen, et al. (2002). "A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*." Science **297**(5590): 2253-2256.
- Damalas, C. A. and I. G. Eleftherohorinos (2011). "Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators." International Journal of Environmental Research and Public Health **8**(5): 1402-1419.
- Danecek, P. and S. A. McCarthy (2017). "BCFtools/csq: haplotype-aware variant consequences." Bioinformatics **33**(13): 2037-2039.
- Davenport, A. P. and P. D. Evans (1984). "Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph." Insect Biochemistry **14**(2): 135-143.
- David, J.-P., F. Faucon, et al. (2014). "Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing." BMC Genomics **15**(1): 1-15.
- David, J. P., H. M. Ismail, et al. (2013). "Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **368**(1612).
- David, P. and S. Samadi, Eds. (2011). La théorie de l'évolution : une logique pour la biologie. Paris, France, Flammarion.
- Davies, E. T., A. O. O'Reilly, et al. (2008). "Perspective Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling." Pest Management Science **64**: 1126-1130.
- De Coen, W., C. Janssen, et al. (2000). Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring, Springer: 13-25.
- Deising, H. B., S. Reimann, et al. (2008). "Mechanisms and significance of fungicide resistance." Brazilian Journal of Microbiology **39**(2): 286-295.
- Delage, B. and R. H. Dashwood (2008). "Dietary Manipulation of Histone Structure and Function." Annual Review of Nutrition **28**(1): 347-366.
- Delorme, R., D. Auge, et al. (1997). Résistance de *Dysaphys plantaginea* à divers produits insecticides en France. Conférence internationale sur les ravageurs en agriculture. Montpellier.
- Dent, D. (1991). Insect pest management. Ascot, UK, CABI Bioscience.
- Dermauw, W., A. Pym, et al. (2018). "Does host plant adaptation lead to pesticide resistance in generalist herbivores?" Current opinion in insect science **26**: 25-33.

- Deutsch, C. A., J. J. Tewksbury, et al. (2018). "Increase in crop losses to insect pests in a warming climate." Science **361**(6405): 916-919.
- Devonshire, A. L. (1989). "Resistance of aphids to insecticides." Aphids their Biology, Natural Enymies and Control.
- Devonshire, A. L. and L. M. Field (1991). "Gene amplification and insecticide resistance." Annual Review of Entomology **36**(1): 1-21.
- Ding, Y., F. Ortelli, et al. (2003). "The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles." BMC Genomics **4**(1): 35.
- Djogbenou, L., F. Chandre, et al. (2008). "Evidence of introgression of the ace-1 R mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s." Plos One **3**(5): e2172.
- do Nascimento, A. R. B., P. Fresia, et al. (2015). "Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)." BMC Genomics **16**(1): 1-12.
- Douris, V., S. Denecke, et al. (2020). "Using CRISPR/Cas9 genome modification to understand the genetic basis of insecticide resistance: *Drosophila* and beyond." Pesticide Biochemistry and Physiology **167**: 104595.
- Dubovskiy, I., V. Martemyanov, et al. (2008). "Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **148**(1): 1-5.
- Dunkov, B., V. Guzov, et al. (1997). "The *Drosophila* cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital." DNA and cell biology **16**(11): 1345-1356.
- Dworkin, I. and C. D. Jones (2009). "Genetic Changes Accompanying the Evolution of Host Specialization in *Drosophila sechellia*." Genetics **181**(2): 721-736.
- Dykes, C. L., R. B. S. Kushwah, et al. (2015). "Knockdown resistance (kdr) mutations in Indian *Anopheles culicifacies* populations." Parasites & Vectors **8**.
- Earl, D. J. and M. W. Deem (2004). "Evolvability is a selectable trait." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(32): 11531-11536.
- EFSA, E. F. S. A. (2013). "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance maltodextrin." EFSA Journal **11**(1): 3007.
- Egaas, E., N. Svendsen, et al. (1991). "Activities and properties of xenobiotic metabolizing enzymes in the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) feeding on paprika (*Capsicum annuum* L.) or swedes (*Brassica napus rapifera* Metzger)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology **99**(1-2): 105-110.
- El Iraqui el Houssaini, S., M. Hmimina, et al. (2012). Comportement de la population de carpocapse sur pommier d'Azrou vis-à-vis de la deltaméthrine et chlorpyrifos-ethyl. journées doctoriales, Rabat, Maroc.
- Eldefrawi, M. E., R. Miskus, et al. (1960). "Methylenedioxyphenyl Derivatives as Synergists for Carbamate Insecticides on Susceptible, DDT-, and Parathion-resistant House Flies1." Journal of Economic Entomology **53**(2): 231-234.
- Estabrook, R. W. (2003). "A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450)." Drug metabolism and disposition **31**(12): 1461-1473.
- Evans, P. D. and B. Maqueira (2005). "Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors." Invert Neurosci **5**(3-4): 111-118.
- Farnsworth, C. A., M. G. Teese, et al. (2010). "Esterase-based metabolic resistance to insecticides in heliothine and spodopteran pests." Journal of pesticide science **35**(3): 275-289.
- Faucon, F., I. Dusfour, et al. (2015). "Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing." Genome Research **25**(9): 1347-1359.
- Fauvergue, X., A. Rusch, et al. (2020). BIOCONTRÔLE - Éléments pour une protection agroécologique des cultures. Paris, Quae.
- Febvay, G., B. Delobel, et al. (1988). "Influence of the amino acid balance on the improvement of an

- artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae)." Canadian Journal of Zoology **66**.
- Fenton, B., J. T. Margaritopoulos, et al. (2010). "Micro-evolutionary change in relation to insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*." Ecological Entomology **35**: 131-146.
- Field, L., N. Javed, et al. (1994). "The peach-potato aphid *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* have the same esterase-based mechanisms of insecticide resistance." Insect molecular biology **3**(3): 143-148.
- Field, L. M. and A. L. Devonshire (1997). "Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer)." Biochemical Journal **322**(3): 867-871.
- Firko, M. J. and J. Leslie Hayes (1990). "Quantitative genetic tools for insecticide resistance risk assessment: estimating the heritability of resistance." Journal of Economic Entomology **83**(3): 647-654.
- Foray, V., P.-f. Pelisson, et al. (2012). "A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited." Physiological Entomology **37**(3): 295-302.
- Foster, S. P., C. M. Woodcock, et al. (1999). "Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (kdr) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies." Bulletin of Entomological Research **89**(2): 133-138.
- Fouad, E. A., H. M. Abou-Yousef, et al. (2016). "Resistance monitoring and enzyme activity in three field populations of cowpea aphid (*Aphis craccivora*) from Egypt." Crop protection **81**.
- Fournier, D., J.-M. Bride, et al. (1987). "Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex." Pesticide Biochemistry and Physiology **27**(2): 211-217.
- Fournier, D., J. M. Bride, et al. (1992). "Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides." Journal of Biological Chemistry **267**(3): 1840-1845.
- Fox, J. and S. Weisberg (2018). An R companion to applied regression, Sage publications.
- Franciosa, H. and J. Berge (1995). "Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and GST-2 families." Insect Biochemistry and Molecular Biology **25**(3): 311-317.
- Francis, F., N. Vanhaelen, et al. (2005). "Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid." Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America **58**(3): 166-174.
- Franck, P., M. Reyes, et al. (2007). "Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers." Mol Ecol **16**(17): 3554-3564.
- Franck, P., M. Siegwart, et al. (2012). "Multiple Origins of the Sodium Channel kdr Mutations in Codling Moth Populations." Plos One **7**(8).
- Fritsch, E., K. Undorf-Spahn, et al. (2005). "Apfelwickler-Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler populationen." Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes **57**: 29-34.
- Fronza, G., G. Roca-Acevedo, et al. (2020). "Insecticide resistance mechanisms in *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae): the putative role of enhanced detoxification and knockdown resistance (kdr) allele in a resistant hotspot from the Argentine Chaco." Journal of medical entomology **57**(3): 837-844.
- Frova, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives." Biomolecular engineering **23**(4): 149-169.
- Futuyma, D. J. (1998). "Evolutionary biology. Sunderland." Mass.: Sinauer Associates.
- Fuxa, J. R. and A. R. Richter (1989). "Reversion of resistance by *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis virus." Journal of Invertebrate Pathology **53**(1): 52-56.
- Fuxa, J. R. and A. R. Richter (1998). "Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatalis*." Journal of Invertebrate Pathology **71**(2): 159-164.
- Ganendran, A. (1974). "Organophosphate insecticide poisoning and its management." Anaesthesia and

- intensive care **2**(4): 361-368.
- Gao, N. and J. Hardie (1996). "Pre- and post-natal effects of precocenes on aphid morphogenesis and differential rescue." Archives of Insect Biochemistry and Physiology **32**(3-4): 503-510.
- Gao, Q., M. Li, et al. (2012). "Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (*Musca domestica*)." Pesticide Biochemistry and Physiology **104**(3): 252-260.
- Georghiou, G. P. (1983). Management of resistance in arthropods. Pest resistance to pesticides. Plenum. New York, USA, Georghiou, G. P. Saito, T.: 769-792.
- Georghiou, G. P. (1986). Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management.
- Georghiou, G. P. (1994). "Principles of insecticide resistance management." Phytoprotection **75**(4): 51-59.
- Georghiou, G. P. and C. E. Taylor (1977). "Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance." Journal of Economic Entomology **70**(5): 653-658.
- Gerhart, J. and M. Kirschner (2007). "The theory of facilitated variation." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(suppl 1): 8582-8589.
- Gibert, J.-M. (2020). "Phenotypic plasticity in insects, La plasticité phénotypique chez les insectes." Biologie Aujourd'hui **214**(1-2): 33-44.
- Gibney, E. and C. Nolan (2010). "Epigenetics and gene expression." Heredity **105**(1): 4-13.
- Gilbert, C., J. Peccoud, et al. (2021). "Transposable Elements and the Evolution of Insects." Annual Review of Entomology **66**(1): 355-372.
- Gimenez, S., H. Abdelgaffar, et al. (2020). "Adaptation by copy number variation increases insecticide resistance in the fall armyworm." Communications Biology **3**(1): 664.
- Giraud, M., G. C. Unnithan, et al. (2010). "Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights." Pesticide Biochemistry and Physiology **97**(2): 115-122.
- Gore, J., D. Cook, et al. (2013). "Cotton aphid (Heteroptera: Aphididae) susceptibility to commercial and experimental insecticides in the southern United States." Journal of Economic Entomology **106**(3): 1430-1439.
- Gott, R. C., G. R. Kunkel, et al. (2017). "Implicating ABC transporters in insecticide resistance: research strategies and a decision framework." Journal of Economic Entomology **110**(2): 667-677.
- Graillot, B., C. Blachere-López, et al. (2019). "Importance of the Host Phenotype on the Preservation of the Genetic Diversity in Codling Moth Granulovirus." Viruses **11**(7): 621.
- Grantham, M. E., A. W. Shingleton, et al. (2020). "Expression profiling of winged-and wingless-destined pea aphid embryos implicates insulin/insulin growth factor signaling in morph differences." Evolution & development **22**(3): 257-268.
- Greiner, V. (2012). Epigénétique et méthylation de l'ADN: étude des mécanismes d'interaction du domaine SRA de UHRF1 avec l'ADN hémi-méthylé, Université de Strasbourg.
- Grishkevich, V. and I. Yanai (2013). "The genomic determinants of genotype × environment interactions in gene expression." Trends in Genetics **29**(8): 479-487.
- Griswold, C. K. (2006). "Pleiotropic mutation, modularity and evolvability." Evolution & development **8**(1): 81-93.
- Groeters, F. R. and B. E. Tabashnik (2000). "Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance." Journal of Economic Entomology **93**(6): 1580-1587.
- Gryspeirt, A. and J.-C. Grégoire (2012). "Effectiveness of the high dose/refuge strategy for managing pest resistance to *Bacillus thuringiensis* (Bt) plants expressing one or two toxins." Toxins **4**(10): 810-835.
- Guan, R.-B., H.-C. Li, et al. (2018). "A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi." Journal of Biological Chemistry **293**(16): 6011-6021.
- Guennelon, G., H. Audemard, et al. (1981). "Permanent rearing of codling moth on an artificial medium." Agronomie **1**(1): 59-64.
- Guillemaud, T., E. Lombaert, et al. (2016). "Conflicts of interest in GM Bt crop efficacy and durability studies." Plos One **11**(12): e0167777.
- Guillemaud, T., L. Mieuxet, et al. (2003). "Spatial and temporal genetic variability in French populations of the peach–potato aphid, *Myzus persicae*." Heredity **91**(2): 143-152.

- Guillemette, B. and L. Gaudreau (2006). "H2A. Z: un variant d'histone qui orne les promoteurs des gènes." médecine/sciences **22**(11): 941-946.
- Hall, T., I. Biosciences, et al. (2011). "BioEdit: an important software for molecular biology." GERF Bull Biosci **2**(1): 60-61.
- Hallgrímsson, B. and B. K. Hall (2005). Variation and variability: central concepts in biology. Variation, Elsevier: 1-7.
- Handschin, C. and U. A. Meyer (2003). "Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors." Pharmacological reviews **55**(4): 649-673.
- Hanson, A. A., J. Menger-Anderson, et al. (2017). "Evidence for soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) resistance to pyrethroid insecticides in the upper midwestern United States." Journal of Economic Entomology **110**(5): 2235-2246.
- Hardie, J. (1986). "Morphogenetic effects of precocenes on three aphid species." Journal of insect physiology **32**(9): 813-818.
- Hardstone, M. C. and J. G. Scott (2010). "A review of the interactions between multiple insecticide resistance loci." Pesticide Biochemistry and Physiology **97**(2): 123-128.
- Harrison, H. F., T. R. Mitchell, et al. (2008). "Contents of caffeoylquinic acid compounds in the storage roots of sixteen sweetpotato genotypes and their potential biological activity." Journal of the American Society for Horticultural Science **133**(4): 492-500.
- Hartig, F. (2019). "DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models." R package version 0.2 4.
- Hartley, C., R. Newcomb, et al. (2006). "Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(23): 8757-8762.
- Hashimoto, H., J. R. Horton, et al. (2009). "UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications." Epigenetics **4**(1): 8-14.
- Hashimoto, H., P. M. Vertino, et al. (2010). "Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation." Epigenomics **2**(5): 657-669.
- Hawkins, N. J., C. Bass, et al. (2019). "The evolutionary origins of pesticide resistance." Biological Reviews **94**(1): 135-155.
- Hayes, J. D. and C. Wolf (1988). Role of glutathione transferase in drug resistance, Academic Press: London, UK.
- Hears, t., H. Philippe, et al. (2011). Les mondes darwiniens, L'évolution de l'évolution. Paris, Materiologique.
- Heard, E. (2013). Épigénétique et mémoire cellulaire: Leçon inaugurale prononcée le jeudi 13 décembre 2012, Collège de France.
- Heidel-Fischer, H. M. and H. Vogel (2015). "Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds." Current opinion in insect science **8**: 8-14.
- Hemingway, J. and H. Ranson (2000). "Insecticide resistance in insect vectors of human disease." Annual Review of Entomology **45**(1): 371-391.
- Hendrikse, J. L., T. E. Parsons, et al. (2007). "Evolvability as the proper focus of evolutionary developmental biology." Evolution & development **9**(4): 393-401.
- Herron, G. A. and L. J. Wilson (2017). "Can resistance management strategies recover insecticide susceptibility in pests?: a case study with cotton aphid *Aphis gossypii* (Aphididae: Hemiptera) in Australian cotton." Austral Entomology **56**(1): 1-13.
- Hodgson, B. E. (1928). The host plants of the European corn borer in New England, US Department of Agriculture.
- Hoff, K., A. Lomsadze, et al. (2019). "Whole-genome annotation with BRAKER." Methods in molecular biology (Clifton, NJ) **1962**: 65.
- Hojland, D. H., K. M. V. Jensen, et al. (2014). "Expression of Xenobiotic Metabolizing Cytochrome P450 Genes in a Spinosad-Resistant *Musca domestica* L. Strain." Plos One **9**(8).
- Holloway, G. J. (1986). "A theoretical-examination of the classical-theory of inheritance of insecticide

- resistance and the genetics of time to knockdown and dry body-weight in *Sitophilus-oryzae* (L) (coleoptera, curculionidae)." Bulletin of Entomological Research **76**(4): 661-670.
- Holloway, G. J., S. R. Povey, et al. (1990). "The effect of new environment on adapted genetic architecture." Heredity **64**(3): 323-330.
- Homem, R. A. and T. G. E. Davies (2018). "An overview of functional genomic tools in deciphering insecticide resistance." Current opinion in insect science **27**: 103-110.
- Hopper, K. R. (1999). "Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology." Annual Review of Entomology **44**(1): 535-560.
- Hosseini, A. and S. Minucci (2018). Alterations of histone modifications in cancer. Epigenetics in human disease, Elsevier: 141-217.
- Hotelier, T., V. Nègre, et al. (2010). "Insecticide resistance through mutations in cholinesterases or carboxylesterases: data mining in the ESTHER database." Journal of pesticide science: **35**(3): 315-320.
- Huang, Andow, et al. (2011). "Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America." Entomologia Experimentalis et Applicata **140**(1): 1-16.
- Huang, V., R. F. Place, et al. (2012). "Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer." Nucleic acids research **40**(4): 1695-1707.
- Hubbard, C. B. and A. C. Gerry (2021). "Genetic evaluation and characterization of behavioral resistance to imidacloprid in the house fly." Pesticide Biochemistry and Physiology **171**: 104741.
- Hufbauer, R. A. and G. K. Roderick (2005). "Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and processes." Biological control **35**(3): 227-239.
- Humann, J. L., T. Lee, et al. (2019). Structural and functional annotation of eukaryotic genomes with GenSAS. Gene prediction, Springer: 29-51.
- Hung, C. F., M. R. Berenbaum, et al. (1997). "Isolation and characterization of CYP6B4, a furanocoumarin-inducible cytochrome P450 from a polyphagous caterpillar (Lepidoptera:papilionidae)." Insect Biochemistry and Molecular Biology **27**(5): 377-385.
- Hunt, B. G., K. M. Glastad, et al. (2013). "Patterning and Regulatory Associations of DNA Methylation Are Mirrored by Histone Modifications in Insects." Genome Biology and Evolution **5**(3): 591-598.
- Ingham, V. A., S. Elg, et al. (2020). "Capturing the transcription factor interactome in response to sub-lethal insecticide exposure." bioRxiv.
- Ingles, P. J., P. M. Adams, et al. (1996). "Characterization of Voltage-sensitive Sodium Channel Gene Coding Sequences from Insecticide-Susceptible and Knockdown-resistant House Fly Strains." Insect Biochemistry and Molecular Biology **26**: 319-326.
- Isaacs, A. K., S. Qi, et al. (2012). "Insect ryanodine receptor: distinct but coupled insecticide binding sites for [N-C3H3] chlorantraniliprole, flubendiamide, and [3H] ryanodine." Chemical research in toxicology **25**(8): 1571-1573.
- Itokawa, K., O. Komagata, et al. (2010). "Genomic structures of Cyp9m10 in pyrethroid resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **40**(9): 631-640.
- James, C. (2004). "Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004." ISAAA briefs **32**: 1-12.
- Javed, H., J. Iqbal, et al. (2014). "Response of different cultivars of groundnut, *Arachis hypogaea* L.(Fabaceae: Fabales) to aphids, *Aphis craccivora* K.(Aphididae: Homoptera) in interaction with local weather factors." Pakistan Journal of Zoology **46**(1).
- Jayachandran, B., M. Hussain, et al. (2012). "RNA Interference as a Cellular Defense Mechanism against the DNA Virus Baculovirus." Journal of Virology **86**(24): 13729-13734.
- Jensen, S., M.-P. Gassama, et al. (1999). "Cosuppression of I transposon activity in *Drosophila* by I-containing sense and antisense transgenes." Genetics **153**(4): 1767-1774.
- Jessup, C. M. and B. J. Bohannan (2008). "The shape of an ecological trade-off varies with environment." Ecology Letters **11**(9): 947-959.
- Johnson, S. (1987). "Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere." International Journal of Tropical Insect Science **8**(4): 543-549.

- Jones, K. W. and J. Whitlock (1990). "Functional analysis of the transcriptional promoter for the CYP1A1 gene." Molecular and cellular biology **10**(10): 5098-5105.
- Jongejan, F. and J. Lourens (1980). "Cross-resistance pattern to pyrethrum and synthetic pyrethroids in organochlorine-resistant strains of *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901." Zeitschrift für Angewandte Entomologie **89**(1-5): 321-323.
- Joussen, N., S. Agnolet, et al. (2012). "Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(38): 15206-15211.
- Kambhampati, S., M. Mackauer, et al. (1983). "Precocious metamorphosis and wing formation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, induced by precocene analogue 7-ethoxy-6-methoxy-2,2-dimethylchromene." Archives of Insect Biochemistry and Physiology **1**(2): 147-154.
- Kandasamy, R., D. London, et al. (2017). "Afidopyropen: New and potent modulator of insect transient receptor potential channels." Insect Biochemistry and Molecular Biology **84**: 32-39.
- Kandil, M. A., I. S. Abdallah, et al. (2017). "Mechanism of resistance to pirimicarb in the cowpea aphid *Aphis craccivora*." Crop protection **94**.
- Kanga, L. H. B., D. J. Pree, et al. (1997). "Mechanisms of resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta* Busck)." Pesticide biochemistry and physiology **59**(1): 11-23.
- Karagounis, C., A. Kourdoubalos, et al. (2006). "Organic farming-compatible insecticides against the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) in peach orchards." Journal of Applied Entomology **130**(3): 150-154.
- Karasov, T., P. W. Messer, et al. (2010). "Evidence that adaptation in *Drosophila* is not limited by mutation at single sites." PLoS Genet **6**(6): e1000924.
- Karr, T. (2008). "Application of proteomics to ecology and population biology." Heredity **100**(2): 200-206.
- Kawajiri, K. and Y. Fujii-Kuriyama (2007). "Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor." Archives of biochemistry and biophysics **464**(2): 207-212.
- Keightley, P. D., R. W. Ness, et al. (2014). "Estimation of the spontaneous mutation rate per nucleotide site in a *Drosophila melanogaster* full-sib family." Genetics **196**(1): 313-320.
- Keightley, P. D., A. Pinharanda, et al. (2015). "Estimation of the spontaneous mutation rate in *Heliconius melpomene*." Molecular Biology and Evolution **32**(1): 239-243.
- Kerkut, G. A. and L. I. Gilbert (1985). Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, Pergamon Oxford.
- Kietrys, A. M. and E. T. Kool (2016). "A new methyl mark on messengers." Nature **530**(7591): 423-424.
- Kikuchi, Y., M. Hayatsu, et al. (2012). "Symbiont-mediated insecticide resistance." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(22): 8618-8622.
- Kliot, A. and M. Ghanim (2012). "Fitness costs associated with insecticide resistance." Pest Management Science **68**(11): 1431-1437.
- Knight, A. L., J. F. Brunner, et al. (1994). "Survey of Azinphosmethyl Resistance in Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Washington and Utah." Journal of Economic Entomology **87**(2): 285-292.
- Knipple, D. C., J. R. Bloomquist, et al. (1988). "Molecular genetic approach to the study of target-site resistance to pyrethroids and DDT in insects."
- Konno, Y. and T. Shishido (1992). "Distribution of glutathione S-transferase activity in insect tissues." Applied Entomology and Zoology **27**(3): 391-397.
- Kostaropoulos, I., A. I. Papadopoulos, et al. (2001). "Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects." Insect Biochemistry and Molecular Biology **31**(4-5): 313-319.
- Kothera, L., J. Phan, et al. (2019). "Using targeted next-generation sequencing to characterize genetic differences associated with insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* populations from the southern US." Plos One **14**(7): e0218397.
- Kotze, A. C., A. P. Ruffell, et al. (2014). "Phenobarbital induction and chemical synergism demonstrate

- the role of UDP-glucuronosyltransferases in detoxification of naphthalophos by *Haemonchus contortus* larvae." Antimicrobial agents and chemotherapy **58**(12): 7475-7483.
- Koul, O., G. Singh, et al. (2004). "Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae." Journal of Biosciences **29**(4): 409-416.
- Kucharski, R., J. Maleszka, et al. (2008). "Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation." Science **319**(5871): 1827-1830.
- Kumar, V. (2015). "A review on efficacy of biopesticides to control the agricultural insect's pest." International Journal of Agricultural Science Research **4**(9): 168-179.
- Labbé, P., A. Berthomieu, et al. (2007b). "Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*." Molecular Biology and Evolution **24**(4): 1056-1067.
- Labbé, P., C. Berticat, et al. (2007a). "Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*." PLoS Genet **3**(11): e205.
- Lallement, P.-A., B. Brouwer, et al. (2014). "The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants." Frontiers in Pharmacology **5**(192).
- Lam, F., J. N. McNeil, et al. (2013). "Octopamine receptor gene expression in three lepidopteran species of insect." Peptides **41**(Supplement C): 66-73.
- Lamoureux, G. L., R. Shimabukuro, et al. (1970). "Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections." Journal of agricultural and food chemistry **18**(1): 81-86.
- Lasota, J. and R. Dybas (1990). "Abamectin as a pesticide for agricultural use." Acta Leidensia **59**(1-2): 217-225.
- Le_Goff, G. (2014). *Rôles des cytochromes P450 dans l'adaptation des insectes : de la résistance aux insecticides à l'adaptation à l'environnement*. Nice, France: 137.
- Leather, S., K. Walters, et al. (1993). "The stimuli controlling diapause and overwintering." The ecology of insect overwintering. Cambridge University Press, Cambridge **240**.
- Lee, J.-S., E. Smith, et al. (2010). "The language of histone crosstalk." Cell **142**(5): 682-685.
- Lee, S. H. and D. H. Kwon (2011). "Gene duplication in insecticide resistance." Gene duplication: 141-150.
- Lefevre, T., M. Raymond, et al. (2016). *Biologie évolutive*. Paris, France, De Boeck Supérieur.
- Leng, P., Z. Zhang, et al. (2011). "Applications and development trends in biopesticides." African Journal of Biotechnology **10**(86).
- Lenormand, T., N. Harmand, et al. (2018). "Cost of resistance: an unreasonably expensive concept." bioRxiv: 276675.
- Lenski, R. E. (1998). "Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance." Int Microbiol **1**(4): 265-270.
- Leroux, P. and A.-S. Walker (2013). "Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance." European Journal of Plant Pathology **135**(4): 683-693.
- Lévesque, É., D. Turgeon, et al. (2001). "Isolation and characterization of the UGT2B28 cDNA encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase." Biochemistry **40**(13): 3869-3881.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform." Bioinformatics **25**(14): 1754-1760.
- Li, H., B. Handsaker, et al. (2009). "The sequence alignment/map format and SAMtools." Bioinformatics **25**(16): 2078-2079.
- Li, W. M., M. A. Schuler, et al. (2003). "Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 14593-14598.
- Li, X., M. A. Schuler, et al. (2007). "Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics." Annual Review of Entomology **52**(1): 231-253.

- Li, X. C., S. F. Bai, et al. (2012). "Accord insertion in the 5' flanking region of CYP6G1 confers nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*." *Gene* **502**(1): 1-8.
- Liebers, R., M. Rassoulzadegan, et al. (2014). "Epigenetic Regulation by Heritable RNA." *PLOS Genetics* **10**(4): e1004296.
- Liu, K. J., E. Steinberg, et al. (2015). "Interspecific introgressive origin of genomic diversity in the house mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(1): 196-201.
- Lombaert, E., J. Carletto, et al. (2009). "Response of the melon aphid, *Aphis gossypii*, to host-plant resistance: evidence for high adaptive potential despite low genetic variability." *Entomologia Experimentalis et Applicata* **133**(1): 46-56.
- Loughney, K., R. Kreber, et al. (1989). "Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*." *Cell* **58**(6): 1143-1154.
- Lucas, E., A. Miles, et al. (2019). "Whole-genome sequencing reveals high complexity of copy number variation at insecticide resistance loci in malaria mosquitoes." *Genome research* **29**(8).
- Lynd, A., D. Weetman, et al. (2010). "Field, genetic, and modeling approaches show strong positive selection acting upon an insecticide resistance mutation in *Anopheles gambiae* ss." *Molecular Biology and Evolution* **27**(5): 1117-1125.
- Ma, C.-M., T. Abe, et al. (2010). "Synthesis, anti-fungal and 1, 3- β -d-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives." *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**(19): 7009-7014.
- Malinsky, S., A. Bucheton, et al. (2000). "New insights on homology-dependent silencing of I factor activity by transgenes containing ORF1 in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **156**(3): 1147-1155.
- Malumbres, M. (2013). "miRNAs and cancer: an epigenetics view." *Molecular aspects of medicine* **34**(4): 863-874.
- Manalil, S., R. Busi, et al. (2011). "Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages." *Weed Science* **59**(2): 210-217.
- Mani, G. (1985). "Evolution of resistance in the presence of two insecticides." *Genetics* **109**(4): 761-783.
- Mannervik, B., P. G. Board, et al. (2005). "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases." *Methods in enzymology* **401**: 1-8.
- Mannervik, B., U. Helena Danielson, et al. (1988). "Glutathione transferases—structure and catalytic activity." *Critical Reviews in Biochemistry* **23**(3): 283-337.
- Margaritopoulos, J. T., G. Malarky, et al. (2007). "Microsatellite DNA and behavioural studies provide evidence of host-mediated speciation in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)." *Biological Journal of the Linnean Society* **91**(4): 687-702.
- Markussen, M. D. K. and M. Kristensen (2012). "Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population." *Pest Management Science* **68**(1): 75-82.
- Martincorena, I., A. S. N. Seshasayee, et al. (2012). "Evidence of non-random mutation rates suggests an evolutionary risk management strategy." *Nature* **485**(7396): 95-98.
- Matsuo, T. (2008). "Genes for Host-Plant Selection in *Drosophila*." *Journal of Neurogenetics* **22**(3): 195-210.
- Maund, S., P. Campbell, et al. (2011). "Ecotoxicology of synthetic pyrethroids." *Pyrethroids*: 137-165.
- McCandlish, D. M. (2011). "Visualizing fitness landscapes." *Evolution: International Journal of Organic Evolution* **65**(6): 1544-1558.
- McCart, C. and A. Buckling (2005). "DDT resistance in flies carries no cost." *Current Biology* **15**(15): R587-R589.
- McKenzie, J. and M. Whitten (1982). "Selection for insecticide resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*." *Experientia* **38**(1): 84-85.
- McKenzie, J. A. and P. Batterham (1994). "The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance." *Trends in Ecology & Evolution* **9**(5): 166-169.
- Meisel, R. P. and J. G. Scott (2018). "Using genomic data to study insecticide resistance in the house fly, *Musca domestica*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **151**: 76-81.
- Melander, A. (1914). "Can insects become resistant to sprays?" *Journal of Economic Entomology* **7**: 167-173.

- Milks, M. L., J. H. Myers, et al. (2002). "Costs and stability of cabbage looper resistance to a nucleopolyhedrovirus." Evolutionary Ecology **16**(4): 369-385.
- Miller, N. J. and T. W. Sappington (2017). "Role of dispersal in resistance evolution and spread." Current opinion in insect science **21**: 68-74.
- Misra, J. R., M. A. Horner, et al. (2011). "Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*." Genes & Development **25**(17): 1796-1806.
- Misra, J. R., G. Lam, et al. (2013). "Constitutive activation of the Nrf2/Keap1 pathway in insecticide-resistant strains of *Drosophila*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **43**(12): 1116-1124.
- Mittapalli, O., J. J. Neal, et al. (2007). "Tissue and life stage specificity of glutathione S-transferase expression in the Hessian fly, *Mayetiola destructor*: Implications for resistance to host allelochemicals." Journal of Insect Science **7**(20).
- Mittler, T. and R. Dadd (1964). "An improved method for feeding aphids on artificial diets." Annals of the Entomological Society of America **57**(1): 139-140.
- Moller, H., R. Smith, et al. (1989). "Evolutionary demography of a bruchid beetle. I. Quantitative genetical analysis of the female life history." Functional Ecology: 673-681.
- Montella, I. R., R. Schama, et al. (2012). "The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance-A review." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **107**: 437-449.
- Morel, M., E. Meux, et al. (2013). "Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi." Microbial biotechnology **6**(3): 248-263.
- Morton, R. (1993). "Evolution of *Drosophila* insecticide resistance." Genome **36**(1): 1-7.
- Mottet, C., S. Fontaine, 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**(5): 2182-2189.
- Nakai, M., K. Takahashi, et al. (2017). "Acquired resistance to a nucleopolyhedrovirus in the smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae) after selection by serial viral administration." Journal of Invertebrate Pathology **145**: 23-30.
- Nardini, L., R. N. Christian, et al. (2012). "Detoxification enzymes associated with insecticide resistance in laboratory strains of *Anopheles arabiensis* of different geographic origin." Parasites & Vectors **5**(1): 113.
- Nardini, M. and B. W. Dijkstra (1999). " α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing." Current opinion in structural biology **9**(6): 732-737.
- Natale, D., L. Mattiacci, et al. (2003). "Response of female *Cydia molesta* (Lepidoptera : Tortricidae) to plant derived volatiles." Bulletin of Entomological Research **93**(4): 335-342.
- Nauen, R. (2007). "Insecticide resistance in disease vectors of public health importance." Pest Management Science: formerly Pesticide Science **63**(7): 628-633.
- NCBI-Conserved_domains. (2021). "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>." NCBI. (2021). "https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome."
- Nebert, D. W., M. Adesnik, et al. (1987). "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." Dna **6**(1): 1-11.
- NEBERT, D. W., D. R. NELSON, et al. (1991). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature." DNA and cell biology **10**(1): 1-14.
- Nedelkov, D. and R. W. Nelson (2006). New and emerging proteomic techniques, Springer Science & Business Media.
- Nelson, D. R., T. Kamataki, et al. (1993). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." DNA and cell biology **12**(1): 1-51.
- Nelson, D. R., L. Koymans, et al. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.
- Nguyen, T.-A. (2007). Relations structure-Fonction dans la superfamille des Cytochromes P450, Université Paris-Diderot-Paris VII.

- Nicoglou, A. (2011). La plasticité phénotypique : de la microévolution à la macroévolution. Les Mondes darwiniens : l'évolution de l'évolution. H. Thomas, H. Philippe and S. Guillaume Lecointre et Marc, Éditions Matériologiques: 489-536.
- Ninomiya, Y. and Y. Kayama (1998). "Inhibition of choline acetyltransferase activity by serum albumin modified with octanoic acid and other fatty acids." Neurochemical Research **23**(10): 1303-1311.
- Niu, Y., T. L. DesMarais, et al. (2015). "Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation." Free Radical Biology and Medicine **82**: 22-28.
- Norris, L. C., B. J. Main, et al. (2015). "Adaptive introgression in an African malaria mosquito coincident with the increased usage of insecticide-treated bed nets." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(3): 815-820.
- O'Brien, R. D. (2014). "Insecticides: action and metabolism."
- Oakeshott, J., C. Claudianos, et al. (2010). "Biochemical genetics and genomics of insect esterases." Comprehensive molecular insect science. Volume **5**.
- Oakeshott, J. G., A. L. Devonshire, et al. (2005). "Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases." Chemico-Biological Interactions **157**: 269-275.
- Oakeshott, J. G., I. Home, et al. (2003). "The genomics of insecticide resistance." Genome Biology **4**(1): 202.
- Ødegaard, F., O. H. Diserud, et al. (2000). "The magnitude of local host specificity for phytophagous insects and its implications for estimates of global species richness." Conservation Biology **14**(4): 1182-1186.
- Okonechnikov, K., O. Golosova, et al. (2012). "Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit." Bioinformatics **28**(8): 1166-1167.
- Olivares, J. and M. Siegwart (2021). "PCR allèle spécifique : mise au point et application au génotypage SNP chez le thrips californien." Cahier des techniques de l'Inra **103**.
- Onstad, D. W., A. L. Crespo, et al. (2018). "Blended refuge and insect resistance management for insecticidal corn." Environmental Entomology **47**(1): 210-219.
- Oppenoorth, F., L. Van der Pas, et al. (1979). "Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance." Pesticide Biochemistry and Physiology **11**(1-3): 176-188.
- Oppenoorth, F. J. (1984). "BIOCHEMISTRY OF INSECTICIDE RESISTANCE." Pesticide Biochemistry and Physiology **22**(2): 187-193.
- Oppold, A., A. Kreß, et al. (2015). "Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*." Ecotoxicology and Environmental Safety **122**: 45-53.
- Orchard, I. (1982). "Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator." Canadian Journal of Zoology **60**(4): 659-669.
- Pertea, M., G. M. Pertea, et al. (2015). "StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads." Nature Biotechnology **33**(3): 290-295.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic acids research **29**(9): e45-e45.
- Phillips, J., J. Graves, et al. (1989). "Insecticide resistance management: relationship to integrated pest management." Pesticide Science **27**(4): 459-464.
- Pickett, C. B. and A. Y. Lu (1989). "Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function." Annual review of biochemistry **58**(1): 743-764.
- Pigliucci, M. (2008). "Is evolvability evolvable?" Nature Reviews Genetics **9**(1): 75-82.
- Piromjitpong, J., J. Wongsantichon, et al. (2007). "Differences in the subunit interface residues of alternatively spliced glutathione transferases affects catalytic and structural functions." Biochemical Journal **401**(3): 635-644.
- Piskorski, R. and S. Dorn (2011). "How the oligophage codling moth *Cydia pomonella* survives on walnut despite its secondary metabolite juglone." Journal of insect physiology **57**(6): 744-750.
- Place, R. F., L.-C. Li, et al. (2008). "MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(5): 1608-1613.

- Plutynski, A. (2010). "Review of Godfrey-Smith's Darwinian populations and natural selection."
- Poessel, J.-L., M.-H. Collet, et al. (2014). Method for preparing dicaffeoylquinic acids and use thereof in combating aphids, Google Patents.
- Poessel, J.-L., M.-H. Sauge, et al. (2011). Metabolite profiling and feeding bioassays suggest a major role for a dicaffeoylquinic acid in induced resistance of peach to *Myzus persicae* aphid. PRIR 2011 Joint meeting of the " PR-proteins Workshop" and the " Working Group Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases".
- Poupardin, R., M. A. Riaz, et al. (2012). "Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics." Aquatic Toxicology **114**: 49-57.
- Prapanthadara, L., S. Koottathep, et al. (2000). "Correlation of glutathione S-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitos from northern Thailand." The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health **31**: 111-118.
- Prasittisuk, C. and J. R. Busvine (1977). "DDT-resistant mosquito strains with cross-resistance to pyrethroids." Pesticide Science **8**(5): 527-533.
- Puinean, A. M., S. P. Foster, et al. (2010). "Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*." PLoS Genet **6**(6): e1000999.
- Puinean, A. M., S. J. Lansdell, et al. (2013). "A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*." Journal of Neurochemistry **124**(5): 590-601.
- Qiu, Y., C. Tittiger, et al. (2012). "An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(37): 14858-14863.
- R4P (2021a). "Monitoring systems for resistance to plant protection products across the world: Between redundancy and complementarity." Pest Management Science **77**(6): 2697-2709.
- R4P. (2021b). "<https://www.r4p-inra.fr/fr/home/>."
- R₄P, N., B. Barrès, et al. (2016). "Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection." Trends in Plant Science.
- R Core, T. (2013). "R: A language and environment for statistical computing."
- Radman, M., I. Matic, et al. (1999). "Evolution of Evolvability." Annals of the New York Academy of Sciences **870**(1): 146-155.
- Rane, R. V., A. B. Ghodke, et al. (2019). "Detoxifying enzyme complements and host use phenotypes in 160 insect species." Current opinion in insect science **31**: 131-138.
- Ranson, H., C. Claudianos, et al. (2002). "Evolution of supergene families associated with insecticide resistance." Science **298**(5591): 179-181.
- Ranson, H., F. Collins, et al. (1998). "The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(24): 14284-14289.
- Raymond, M., D. Fournier, et al. (1986). "Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases." Journal of Economic Entomology **79**(6): 1452-1458.
- Reams, A. B. and E. L. Neidle (2004). "Selection for gene clustering by tandem duplication." Annu. Rev. Microbiol. **58**: 119-142.
- Regnault-Roger, C., B. Philogène, et al. (2002). "Biopesticides d'origines végétales." Paris **337**.
- Reiner, E. (1971). "Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases." Bulletin of the World Health Organization **44**(1-2-3): 109.
- Reis Fo, W., I. Nora, et al. (1987). Population dynamics of *Grapholita molesta*, Busk, 1916, and its adaptation on apple in south Brazil. International Workshop on Apple Culture in the Tropics and Subtropics 232.
- Renault, D., M. Laparie, et al. (2018). "Environmental adaptations, ecological filtering, and dispersal central to insect invasions." Annual Review of Entomology **63**: 345-368.

- REX, c. (2010). "The skill and style to model the evolution of resistance to pesticides and drugs." Evolutionary Applications **3**(4): 375-390.
- Reyes, M., W. Barros-Parada, et al. (2015). "Organophosphate Resistance and its Main Mechanism in Populations of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Central Chile." Journal of Economic Entomology **108**(1): 277-285.
- Reyes, M., P. Franck, et al. (2007). "Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*." Pest Management Science: formerly Pesticide Science **63**(9): 890-902.
- Reyes, M., P. Franck, et al. (2009). "Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae)." Bulletin of Entomological Research **99**(4): 359-369.
- Reyes, M. and B. Sauphanor (2008). "Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization." Pest Management Science **64**(9): 945-953.
- Riaz, M. A., R. Poupardin, et al. (2009). "Impact of glyphosate and benzo [a] pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics." Aquatic Toxicology **93**(1): 61-69.
- Rinkevich, F. D., Y. Du, et al. (2013). "Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids." Pesticide Biochemistry and Physiology **106**(3): 93-100.
- Rinkevich, F. D., S. M. Hedtke, et al. (2012a). "Multiple Origins of kdr-type Resistance in the House Fly, *Musca domestica*." Plos One **7**(12).
- Rinkevich, F. D., C. Su, et al. (2012b). "Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (kdr) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*." Pesticide Biochemistry and Physiology **104**(3): 192-200.
- Ritz, C., F. Baty, et al. (2015). "Dose-response analysis using R." Plos One **10**(12): e0146021.
- Robert, C., L. Ruck, et al. (2020). Suivi des résistances aux pyréthrinoïdes des populations de coléoptères ravageurs du colza en France. Végéphyt – 12e conférence internationale. Montpellier.
- Robertson, J. L., K. F. Armstrong, et al. (1990). "Effects of host plants on the toxicity of azinphosmethyl to susceptible and resistant light brown apple moth (Lepidoptera: Tortricidae)." Journal of Economic Entomology **83**(6): 2124-2129.
- Robertson, J. L., N. Savin, et al. (2007). Bioassays with arthropods, CRC press.
- Roff, D. (1980). "Optimizing development time in a seasonal environment: the 'ups and downs' of clinal variation." Oecologia **45**(2): 202-208.
- Rohrmann, G. F. (2019). "Baculovirus molecular biology."
- Rose, C. J., J. R. Chapman, et al. (2011). "Selective sweeps at the organophosphorus insecticide resistance locus, Rop-1, have affected variation across and beyond the α -esterase gene cluster in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*." Mol Biol Evol **28**(6): 1835-1846.
- Rose, M. R. (1982). "Antagonistic pleiotropy, dominance, and genetic variation." Heredity **48**(1): 63-78.
- Rosenheim, J. A., M. W. Johnson, et al. (1996). "Biochemical Peradaptations, Founder Events, and the Evolution of Resistance in Arthropods." Journal of Economic Entomology **89**(2): 263-273.
- Rosenheim, J. A., M. W. Johnson, et al. (1996). "Biochemical Peradaptations, Founder Events, and the Evolution of Resistance in Arthropods." Journal of Economic Entomology **89**(2): 263-273.
- Roush, R. T. (1993). "Occurrence, genetics and management of insecticide resistance." Parasitology Today **9**(5): 174-179.
- Roush, R. T. and J. A. McKenzie (1987). "Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance." Annual Review of Entomology **32**: 361-380.
- Roush, R. T. and B. E. Tabashnik (1990). Pesticide resistance in arthropods. London UK, Chapman and Hall Ltd.
- RStudio, T. (2021). "RStudio: Integrated Development Environment for R <http://www.rstudio.com/>." PBC, from <http://www.rstudio.com/>.
- Rufingier, C., N. Pasteur, et al. (1999). "Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley)(Homoptera: Aphididae) from France." Insect Biochemistry and Molecular Biology **29**(4): 385-391.

- Russell, J., A. Latorre, et al. (2003). "Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea." Molecular ecology **12**(4): 1061-1075.
- Sakyi, K. Y., B. Sarfo, et al. (2005). "Investigation into the fitness cost of KDR insecticide resistance in *Anopheles gambiae* malaria vectors." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **73**(6): 155-155.
- Salvado, J. C., N. Bensaadi-Merchermek, et al. (1994). "Transposable elements in mosquitoes and other insect species." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **109**(4): 531-544.
- Samara, R., T. D. Lowery, et al. (2021). "Assessment of the effects of novel insecticides on green peach aphid (*Myzus persicae*) feeding and transmission of Turnip mosaic virus (TuMV)." Pest Management Science **77**(3): 1482-1491.
- Sang, H., J. P. Hulvey, et al. (2018). "A xenobiotic detoxification pathway through transcriptional regulation in filamentous fungi." MBio **9**(4).
- Sarfraz, R. M., V. Cervantes, et al. (2010). "Resistance to *Bacillus thuringiensis* in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) increases susceptibility to a nucleopolyhedrovirus." Journal of Invertebrate Pathology **105**(2): 204-206.
- Satyavathi, V., R. Ghosh, et al. (2017). "Long Non-Coding RNAs Regulating Immunity in Insects." Non-Coding RNA **3**(1): 14.
- Sauge, M.-H., J.-L. Poëssel, et al. (2011). "Resistance induction and herbivore virulence in the interaction between *Myzus persicae* (Sulzer) and a major aphid resistance gene (Rm2) from peach." Arthropod-Plant Interactions **5**(4): 369-377.
- Sauphanor, B., M. Berling, et al. (2006). "Cases of resistance to granulosis virus in the codling moth." Phytoma **590**: 24-27.
- Sauphanor, B. and J. C. Bouvier (1995). "Cross resistance between benzoyl-phenylureas and tebufenozide in the codling moth, *Cydia pomonella* L." Pesticide Science **45**.
- Sauphanor, B., J. C. Bouvier, et al. (1998). "Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in southeastern France." Journal of Economic Entomology **91**.
- Sauphanor, B., J. C. Bouvier, et al. (1999). "Effect of an ecdysteroid agonist, tebufenozide, on the completion of diapause in susceptible and resistant strains of the codling moth, *Cydia pomonella*." Entomol. Exp. Appl. **90**.
- Sauphanor, B., V. Brosse, et al. (2000). "Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*)." Pest Management Science **56**(1): 74-82.
- Sauphanor, B., A. Cuany, et al. (1997). "Mechanism of Resistance to Deltamethrin in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)." Pesticide biochemistry and physiology **58**: 109-117.
- Scarpati, M. and G. Oriente (1958). "Chicoric acid (dicaffeyltartaric acid): its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis." Tetrahedron **4**(1-2): 43-48.
- Schlichting, C. (2004). The role of phenotypic plasticity in diversification. Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches. T. DeWitt and S. Scheiner. Oxford, Oxford University Press: 191-200.
- Schlichting, C. D. (1986). "The evolution of phenotypic plasticity in plants." Annual review of ecology and systematics **17**(1): 667-693.
- Schmidt-Nielsen, K. and S.-N. Knut (1984). Scaling: why is animal size so important?, Cambridge university press.
- Schmitt, A., I. L. Bisutti, et al. (2013). "The occurrence and distribution of resistance of codling moth to *Cydia pomonella granulovirus* in Europe." Journal of Applied Entomology **137**(9): 641-649.
- Scholz, H., M. Franz, et al. (2005). "The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development." Nature **436**(7052): 845-847.
- Scott, J., N. Liu, et al. (1998). "Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins." Comparative Biochemistry and Physiology **121**(1-3).
- Scott, J. G. (1999). "Cytochromes P450 and insecticide resistance." Insect Biochemistry and Molecular Biology **29**(9): 757-777.
- Scott, J. G. and S. Kasai (2004). "Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance."

- Pesticide Biochemistry and Physiology **78**(3): 171-178.
- Seong, K.-H., T. Matsuo, et al. (2001). "Neural-specific overexpression of Drosophila Plenty of SH3s (DPOSH) extends the longevity of adult flies." BioGerontology **2**(4): 271-281.
- Sheehan, D., G. Meade, et al. (2001). "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily." Biochemical Journal **360**(1): 1-16.
- Showers, W. B., R. L. Hellmich, et al. (2001). "Aggregation and dispersal behavior of marked and released European corn borer (Lepidoptera : Crambidae) adults." Environmental Entomology **30**(4): 700-710.
- Sieglwart, M., B. Graillot, et al. (2015). "Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review." Frontiers in Plant Science **6**.
- Sieglwart, M., B. Graillot, et al. (2017). "Résistance du carpocapse au virus de la granulose." Phytoma **708**: 4.
- Sieglwart, M., B. Graillot, et al. (2013). Low fitness cost of codling moth resistance to *Cydia pomonella* GranuloVirus (CpGV). PURE Conference, Bolzano.
- Sieglwart, M., E. Lecerf, et al. (2019). Risks of aphid adaptation to caffeic acid derivatives used as bioinsecticides. Resistance'19, Rothamsted.
- Sieglwart, M., S. Maugin, et al. (2020). "Le carpocapse des pommes résiste au virus de la granulose." Phytoma **738**: 5.
- Sieglwart, M., L. B. Monteiro, et al. (2011). "Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations." Journal of Economic Entomology **104**(2): 636-645.
- Sieglwart, M., M.-H. Sauge, et al. (In prep). "Mode of action and sustainability of the use of caffeoyl acid derivatives in the control of aphids in agriculture."
- Sieglwart, M., J.-B. Thibord, et al. (2017). "Biochemical and molecular mechanisms associated with the resistance of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) to lambda-cyhalothrin and first monitoring tool." Journal of economic entomology **110**(2).
- Sieglwart, M., J. B. Thibord, et al. (2012). "Premier cas de résistance de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) à la lambda cyhalothrine (pyréthrinoïde)." Phytoma **658**: 3.
- Silva, A. P. B., J. M. M. Santos, et al. (2014). "Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review." Parasites & Vectors **7**(1): 450.
- Silva, A. X., G. Jander, et al. (2012). "Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: a transcriptomic survey." Plos One **7**(6): e36366.
- Simpson, S. J., E. Despland, et al. (2001). "Gregarious behavior in desert locusts is evoked by touching their back legs." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(7): 3895-3897.
- Simpson, S. J., G. A. Sword, et al. (2011). "Polyphenism in insects." Curr Biol **21**(18): R738-749.
- Singh, D. (2014). Advances in plant biopesticides.
- Singh, K. S., B. J. Troczka, et al. (2020). "The genetic architecture of a host shift: An adaptive walk protected an aphid and its endosymbiont from plant chemical defenses." Science Advances **6**(19): eaba1070.
- Skinner, M. K., M. B. Maamar, et al. (2018). "Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA and histone retention associate with DDT-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease." Epigenetics & chromatin **11**(1): 1-24.
- Smith, J. L., Y. Farhan, et al. (2019). "practical Resistance of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: crambidae) to Cry1F *Bacillus thuringiensis* maize discovered in nova Scotia, canada." Scientific Reports **9**(1): 1-10.
- Smith, L. B., C. Sears, et al. (2019). "CYP-mediated resistance and cross-resistance to pyrethroids and organophosphates in *Aedes aegypti* in the presence and absence of kdr." Pesticide Biochemistry and Physiology **160**: 119-126.
- Soderlund, D. M. and D. C. Knipple (2003). "The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides." Insect Biochemistry and Molecular Biology **33**: 563-577.

- Sogorb, M. A. and E. Vilanova (2002). "Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis." Toxicology letters **128**(1-3): 215-228.
- Song, Y., S. Endepols, et al. (2011). "Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice." Current Biology **21**(15): 1296-1301.
- Sparks, T. C. (2013). "Insecticide discovery: an evaluation and analysis." Pesticide Biochemistry and Physiology **107**(1): 8-17.
- Sparks, T. C., J. E. Dripps, et al. (2012). "Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis." Pesticide Biochemistry and Physiology **102**(1): 1-10.
- Sparks, T. C., G. D. Thompson, et al. (1998). "Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on *tobacco budworm* (Lepidoptera : Noctuidae) larvae." Journal of Economic Entomology **91**(6): 1277-1283.
- Srithiphaphirom, P., S. Lavalley, et al. (2019). "Rapid cold hardening and octopamine modulate chill tolerance in *Locusta migratoria*." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **234**: 28-35.
- Stapley, J., J. Reger, et al. (2010). "Adaptation genomics: the next generation." Trends in Ecology & Evolution **25**(12): 705-712.
- Stearns, S. C. (1989). "Trade-offs in life-history evolution." Functional Ecology **3**(3): 259-268.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.
- Strode, C., C. S. Wondji, et al. (2008). "Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **38**(1): 113-123.
- Sugii, S. and R. M. Evans (2011). "Epigenetic codes of PPAR γ in metabolic disease." FEBS Letters **585**(13): 2121-2128.
- Sun, Y. (2013). "Bioassay insects." Analytical methods for pesticides, plant growth regulators, and food additives **1**: 399.
- Suty, L. (2010). La lutte biologique. Dijon, France, Sick, I.
- Tabashnik, B. E. (1992). "Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins." Applied and Environmental Microbiology **58**(10): 3343-3346.
- Tabashnik, B. E. (1994). "Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*." Annual Review of Entomology **39**: 47-79.
- Tabata, J., H. Noguchi, et al. (2007). "Sex pheromone production and perception in the mating disruption-resistant strain of the smaller tea leafroller moth, *Adoxophyes honmai*." Entomologia Experimentalis et Applicata **122**(2): 145-153.
- Takahashi, R. (1966). "Descriptions of some new and little known species of Aphis of Japan, with key to species." Transactions of the American Entomological Society (1890-) **92**(3): 519-556.
- Tang, A. H. and C. Tu (1994). "Biochemical characterization of Drosophila glutathione S-transferases D1 and D21." Journal of Biological Chemistry **269**(45): 27876-27884.
- Tangtrakulwanich, K. and G. V. P. Reddy (2014). Development of Insect Resistance to Plant Biopesticides: An Overview. In: Singh D. (eds) Advances in Plant Biopesticides. New Delhi.
- Tauber, M. J., C. A. Tauber, et al. (1986). Seasonal adaptations of insects, Oxford University Press on Demand.
- Thapa, S., M. Lv, et al. (2017). "Acetylcholinesterase: a primary target for drugs and insecticides." Mini reviews in medicinal chemistry **17**(17): 1665-1676.
- Thomas, Y., M. T. Bethenod, et al. (2003). "Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner. I. sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism." Evolution **57**(2): 261-273.
- Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad—a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science: formerly Pesticide Science **56**(8): 696-702.
- Thorvaldsdóttir, H., J. T. Robinson, et al. (2013). "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." Briefings in bioinformatics **14**(2): 178-192.
- Trapnell, C., L. Pachter, et al. (2009). "TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq."

- Bioinformatics **25**(9): 1105-1111.
- Traut, W., K. Sahara, et al. (2007). "Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera." Sexual Development **1**(6): 332-346.
- Trocza, B., C. T. Zimmer, et al. (2012). "Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor." Insect Biochemistry and Molecular Biology **42**(11): 873-880.
- Ujváry, I. (2010). Pest control agents from natural products. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Elsevier: 119-229.
- Undorf-Spahn, K., E. Fritsch, et al. (2012). "High stability and no fitness costs of the resistance of codling moth to *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV-M)." Journal of Invertebrate Pathology **111**(2): 136-142.
- Usmani, K. A. and P. W. Shearer (2001). "Susceptibility of male Oriental fruit moth (Lepidoptera : Tortricidae) populations from New Jersey apple orchards to azinphosmethyl." Journal of Economic Entomology **94**(1): 233-239.
- Uyenoyama, M. K. (1986). "Pleiotropy and the evolution of genetic systems conferring resistance to pesticides." Pesticide resistance: strategies and tactics for management: 207-221.
- van Emden, H. F., S. P. Foster, et al. (2014). "Poor survival on an artificial diet of two genotypes of the aphid *Myzus persicae*: a fitness cost of insecticide resistance?" Agricultural and Forest Entomology **16**(4): 335-340.
- van Petegem, K. H. P., J. Pétilion, et al. (2015). "Empirically simulated spatial sorting points at fast epigenetic changes in dispersal behaviour." Evolutionary Ecology **29**(2): 299-310.
- van Valen, L. (1977). "The red queen." The American Naturalist **111**(980): 809-810.
- Vandeghechuchte, M. B. and C. R. Janssen (2014). "Epigenetics in an ecotoxicological context." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **764**: 36-45.
- Vandeghechuchte, M. B., F. Lemièrre, et al. (2010). "Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **151**(3): 278-285.
- Villaverde, J. J., P. Sandín-España, et al. (2016). "Biopesticides from natural products: Current development, legislative framework, and future trends." Bioresources **11**(2).
- Virto, C., C. A. Zarate, et al. (2013). "Gender-Mediated Differences in Vertical Transmission of a Nucleopolyhedrovirus." Plos One **8**(8).
- Vontas, J. G., G. J. Small, et al. (2002). "Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*." Biochemical Journal **362**(2): 329-337.
- Waddington, C. H. (1942). "Canalization of development and the inheritance of acquired characters." Nature **150**(3811): 563-565.
- Waddington, C. H. (1957). The Strategy of the Genes.
- Wagner, A. (2013). Robustness and evolvability in living systems, Princeton university press.
- Waldvogel, A.-M., A. Kreß, et al. (2015). "Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*." Ecotoxicology and Environmental Safety **122**: 45-53.
- Wan, F., C. Yin, et al. (2019). "A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance." Nature Communications **10**(1): 4237.
- Wan, H., Y. Liu, et al. (2014). "Nrf2/Maf-binding-site-containing functional Cyp6a2 allele is associated with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*." Pest Management Science **70**(7): 1048-1058.
- Wang, B., M. F. Shahzad, et al. (2014). "Genome-wide analysis reveals the expansion of Cytochrome P450 genes associated with xenobiotic metabolism in rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*." Biochemical and biophysical research communications **443**(2): 756-760.
- Wang, H., Y. Shi, et al. (2018). "CYP6AE gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides." Nature Communications **9**(1): 1-8.
- War, A. R., S. P. Sharma, et al. (2016). "Differential induction of flavonoids in groundnut in response to *Helicoverpa armigera* and *Aphis craccivora* infestation." International journal of insect science

8.

- Watson, J. D. and F. Crick (1953). "A structure for deoxyribose nucleic acid."
- Weetman, D., S. N. Mitchell, et al. (2015). "Contemporary evolution of resistance at the major insecticide target site gene *Ace-1* by mutation and copy number variation in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." Molecular ecology **24**(11): 2656-2672.
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: the science of change, National Institute of Environmental Health Sciences.
- Wen, Z., L. Pan, et al. (2003). "Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase." Insect Biochemistry and Molecular Biology **33**(9): 937-947.
- Wennmann, J. T., D. Pietruska, et al. (2021). "Transcriptome of *Cydia pomonella granulovirus* in susceptible and type I resistant codling moth larvae." Journal of General Virology **102**(3).
- West-Eberhard, M. J. (1989). "Phenotypic plasticity and the origins of diversity." Annual review of ecology and systematics **20**(1): 249-278.
- West-Eberhard, M. J. (2005). "Developmental plasticity and the origin of species differences." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(suppl 1): 6543-6549.
- Wheeler, Q. D. (2000). "The phylogenetic species concept (sensu Wheeler and Platnick)." Species concepts and phylogenetic theory: a debate. Columbia University Press, New York: 55-69.
- Williamson, M., D. Martinez-Torres, et al. (1996). "Identification of the mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid resistance." Molecular Genetics and Genomics **252**: 51-60.
- Winayanuwattikun, P. and A. J. Ketterman (2004). "Catalytic and structural contributions for glutathione-binding residues in a Delta class glutathione S-transferase." Biochemical Journal **382**(2): 751-757.
- Wongsa, K., O. Duangphakdee, et al. (2017). "Genetic structure of the *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) from Thailand inferred from mitochondrial COI gene sequence." Journal of Insect Science **17**(4).
- Xia, X., D. Zheng, et al. (2013). "DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance." Plos One **8**(7): e68852.
- Xiao, L.-F., W. Zhang, et al. (2018). "Genome-wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiles of ATP-binding cassette transporter genes in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel)(Diptera: Tephritidae)." Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics **25**: 1-8.
- Yamamoto, K., P. Zhang, et al. (2005). "Cloning, expression and characterization of theta-class glutathione S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **141**(3): 340-346.
- Yan, G., D. D. Chadee, et al. (1998). "Evidence for Genetic Hitchhiking Effect Associated With Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*." Genetics **148**(2): 793-800.
- Yang, X., X. Li, et al. (2013). "Molecular Cloning and Expression of CYP9A61: A Chlorpyrifos-Ethyl and Lambda-Cyhalothrin-Inducible Cytochrome P450 cDNA from *Cydia pomonella*." International Journal of Molecular Sciences **14**(12): 24211-24229.
- Yang, X., X. Wei, et al. (2021). "Epitranscriptomic regulation of insecticide resistance." Science Advances **7**(19): eabe5903.
- Yang, Y., J.-Z. Cheng, et al. (2001). "Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation: overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation." Journal of Biological Chemistry **276**(22): 19220-19230.
- Ye, G.-Y., Q. Xiao, et al. (2014). "Tea: Biological control of insect and mite pests in China." Biological control **68**(0): 73-91.
- Yu, S. J. (1989). "Purification and characterization of glutathione transferases from five phytophagous lepidoptera." Pesticide Biochemistry and Physiology **35**(1): 97-105.

- Zardo, G., A. Ciolfi, et al. (2012). "Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **119**(17): 4034-4046.
- Zhang, R., L. Zhang, et al. (2012). "Genome-wide expression of non-coding RNA and global chromatin modification." Acta Biochim Biophys Sin **44**(1): 40-47.
- Zhang, Y., C. Park, et al. (2021). "Rapid and accurate alignment of nucleotide conversion sequencing reads with HISAT-3N." Genome Research: gr. 275193.275120.
- Zhou, Y., F. He, et al. (2020). "The Impact of DNA Methylation Dynamics on the Mutation Rate During Human Germline Development." G3: Genes, Genomes, Genetics **10**(9): 3337-3346.
- Zhou, Y., F. He, et al. (2020). "The Impact of DNA Methylation Dynamics on the Mutation Rate During Human Germline Development." G3 (Bethesda, Md.) **10**(9): 3337-3346.
- Zhu, F., T. W. Moural, et al. (2016). "A specialist herbivore pest adaptation to xenobiotics through up-regulation of multiple Cytochrome P450s." Scientific Reports **6**: 20421.
- Zhu, F., T. W. Moural, et al. (2013). "Integrated analysis of cytochrome P450 gene superfamily in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*." BMC Genomics **14**(1): 174.
- Zichová, T., J. Stará, et al. (2013). "Resistance to *Cydia pomonella* granulovirus follows a geographically widely distributed inheritance type within Europe." Biocontrol **58**(4): 525-534.
- Zimmer, C. T. and R. Nauen (2011). "Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae)." Pesticide biochemistry and physiology **100**(3): 264-272.

ANNEXES

Annexe 1

Comparaison deux à deux (fonction EDcomp du package drc) des indicateurs de sensibilité (CL50) de différentes populations de *M. persicae* issues de pêcheurs. Les valeurs de ce tableau correspondent à la probabilité p de se tromper si on rejette l'hypothèse d'égalité des deux CL50. Les p-values inférieures à 0,001 sont en rose.

	11.037.001	12.068.006	13.001.045	Barbentane	Chanas	Gotheron	Jonquiere	MP06	resistant	St_Paul_rose	St_Paul_vert	sylvana
11.037.001		2,28E-01	2,82E-01	1,34E-13	7,12E-02	2,07E-01	1,82E-92	1,57E-10	3,65E-134	1,55E-08	5,47E-03	5,11E-01
12.068.006	2,28E-01		2,25E-01	2,17E-05	6,58E-01	4,52E-02	4,83E-40	7,65E-05	5,19E-61	9,65E-03	3,95E-03	5,75E-01
13.001.045	2,82E-01	2,25E-01		6,76E-07	4,14E-03	1,23E-01	2,64E-22	3,46E-07	3,28E-31	8,86E-05	6,24E-01	2,21E-02
Barbentane	1,34E-13	2,17E-05	6,76E-07		1,03E-02	3,68E-08	2,37E-14	8,17E-01	1,40E-25	4,50E-02	1,01E-04	1,01E-04
Chanas	7,12E-02	6,58E-01	4,14E-03	1,03E-02		1,51E-02	2,52E-34	7,85E-04	5,37E-53	5,25E-02	2,87E-03	3,11E-01
Gotheron	2,07E-01	4,52E-02	1,23E-01	3,68E-08	1,51E-02		1,02E-154	4,48E-04	4,54E-217	2,57E-19	1,02E-02	3,02E-02
Jonquiere	1,82E-92	4,83E-40	2,64E-22	2,37E-14	2,52E-34	1,02E-154		4,48E-04	4,45E-15	4,39E-13	4,59E-05	4,64E-12
MP06	1,57E-10	7,65E-05	3,46E-07	8,17E-01	7,85E-04	4,48E-04	4,48E-04		4,45E-15	4,51E-02	5,75E-04	8,78E-04
resistant	3,65E-134	5,19E-61	3,28E-31	1,40E-25	5,37E-53	4,51E-02	4,45E-15	4,45E-15		4,39E-13	3,35E-05	3,64E-13
St_Paul_rose	1,55E-08	9,65E-03	8,86E-05	4,50E-02	5,25E-02	2,57E-19	4,39E-13	4,45E-15	4,18E-15		5,00E-04	1,18E-03
St_Paul_vert	5,47E-03	3,95E-03	6,24E-01	3,47E-04	2,87E-03	1,02E-02	4,59E-05	5,75E-04	3,35E-05	5,00E-04		8,41E-14
sylvana	5,11E-01	5,75E-01	2,21E-02	1,01E-04	3,11E-01	3,02E-02	4,64E-12	8,78E-04	3,64E-13	1,18E-03	8,41E-14	

Annexe 2

Analyse statistique enzymatique pour les populations de *M persicae* issues du pêcher chapitre 2.1

Response: **log Dos_prot**

```
model<-lm(IDos_prot~Pop, data=data.enzymo)
```

Anova

```
Sum Sq Df F value Pr(>F)
Pop    36.215 11 5.3297 1.205e-06 ***
Residuals 64.243 104
```

Anova Table (Type II tests)

Response: **GST**

```
model<-lm(GST~Pop+Dos_prot, data=data.enzymo)
```

Anova

```
Sum Sq Df F value Pr(>F)
GST_Pop 313954 11 4.9739 3.634e-06 ***
Dos_prot 367269 1 64.0036 1.937e-12 ***
Residuals 591040 103
```

```
cld(glht(model,linfct=mcp(Pop="Tukey")))
```

```
11-037-001 12-068-006 13-001-045 Barbentane Chanas Gotheron jonquiere
  "a" "ab" "ac" "b" "bc" "ab" "bc"
MP06 resistant St_Paul_R St_Paul_V Sylvana
  "ab" "ab" "ab" "b" "bc"
```

Response: **log EST**

```
model<- lm(formula = IEST ~ EST_Pop + Dos_prot, data = data.enzymo)
```

Anova

```
Sum Sq Df F value Pr(>F)
EST_Pop 10.2421 11 8.7482 1.098e-10 ***
Dos_prot 5.5449 1 52.0978 1.046e-10 ***
Residuals 10.6433 100
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
cld(glht(model,linfct=mcp(EST_Pop="Tukey")))
```

```
01jonquiere 02Chanas 03Barbentane 04St_Paul_R 05MP06 06St_Paul_V
  "a" "ac" "ac" "cd" "bc" "cd"
0712-068-006 08resistant 0911-037-001 10Gotheron 11Sylvana 1213-001-045
  "cd" "bc" "bc" "bd" "bd" "b"
```


Annexe 3

Liste des populations de *C. pomonella* échantillonnées en 2005, 2007, 2008 et 2012 pour les recherches sur les résistances à CpGV-M

nom population	pratiques	Année de prelevement	Commune d'origine
Cavaillon ch	Bio	2005	Cavaillon (84)
Cavaillon GV	Bio	2005	Cavaillon (84)
Cheval Blanc	Bio	2005	Cheval blanc (84)
Genolier	non-bio	2005	Génolier (Suisse)
Gotheron Eco	non-bio	2005	Gotheron (26)
Loriol	Bio	2005	Loriol sur drome (26)
Molleges	Bio	2005	Mollégès (13)
Portes les Valence	Bio	2005	Portes les valences (26)
Saint Aubin	Bio	2005	Saint Aubin (37)
Senura	non-bio	2005	Chattes (38)
18	non-bio	2007	Saint Remy (13)
51	Bio	2007, 2008 et 2012	Mollégès (13)
55	non-bio	2007	Eyragues (13)
102	Bio	2007	Mollégès (13)
104	non-bio	2007 et 2008	Eyragues (13)
115	Bio	2007	Eyragues (13)
118	Bio	2007	Eyragues (13)
119	Bio	2007 et 2008	Eyragues (13)
121	non-bio	2007	Noves (13)
124	Bio	2007 et 2008	Mollégès (13)
140	non-bio	2007	Eygalières (13)
145	Bio	2007, 2008 et 2012	Mollégès (13)
154	non-bio	2007 et 2008	Saint Rémy (13)
17	non-bio	2008	Mollégès (13)
26	non-bio	2008	Saint andiol (13)
114	non-bio	2008	Eyragues (13)
132	non-bio	2008	Saint Rémy (13)
10	Bio	2012	Noves (13)
162	Bio	2012	Mollégès (13)
168	Bio	2012	Mollégès (13)
185	Bio	2012	Saint andiol (13)
ALBON	Bio	2012	Beausemlant (26)
BIOCA47	Bio	2012	Montauban (82)
cavaillon b.	non-bio	2012	Cavaillon (84)
Ceta Cavaillon	Bio	2012	St andiol (13)
LORIOLO	Bio	2012	Loriol sur drôme (26)
MAZETTE	Bio	2012	le cheylas (38)
PUGERE	non-bio	2012	Malemort (13)
ROUXELLE	Bio	2012	Carleval (13)


```

410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
ABC_transporteur_PLN03130      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC_transporteur_TIGR00957      kitNlmttDaealqqicqqlh+lWsaPfriiamvLyqqLgVAsllGslmlvlfPiQtftiiskmqkltkeglqrTDkRigLmnEilaamdvtvKcYAWB
AChE      inmiWsaPlqvIlaly+LWlnlGpsvlaGvavmVlmvPlnavmanktktyqvahmksDnRtKlMnEIlmGtKlVLYAWBElaf+kvaiRqeElkvlkks
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154      g+eavlfhTdw+deqpenyR+alddvvcDydfiCP+lefkfsewgnnafyyfehRsklpWPeWmGVMHGYEIEfvFGLPerrrvnyTkaeeils
aldehyde_oxydase_smart01008      l+peeillsieipysk++effsafkqa+rreddiaiv+gmrVlf+pgs+qveela++yggma++tsalktkqkllg++wneklleaca+laeelsls
amino-oxidase_pfam01593      sggfgpvf+sgfieilrlvinyed+qrlipdGiselprrla+qvv+gksireri++gvr+is+e+gki+++tkdg+++DdrviVtsg++niqmrhll
CbE      +eFYtkn+++dke+lng+vdryellsds+fnvp+l+tdads+ve+gtpvylsfd++nptdm+kylp+tagashsselpylfg+pvma++df+kepds
Chitinase_COG3325      +ltiAapas+kleg+++++a++vdyiniMtYdFGawnet+gh+aalqyt+kdaelawvnynt++yngig+vv+++vdhlll+g+pp+kvlVgmpfYgR
Cuticule_prot_pfam00379      +plpqp+l+s+lpa+lkk+y+l+kpva+sav+rhgsralldeer+s++v+c+++tagei+yai+qldvnmvldlilrrrrr+gmgpqgelec+yr+as
FAD-oxidoreductase_pfam01266      +llyeawkvwgivtsteeyphlrparryrrgfih+dimvlpqrqtloglfthtifyn+yppgseldsiggefvltnlpisifmthlsnyngndrlgltyt+e
fucosyltransferase_pfam10250      NAgDVailPflVraKafxPEfsgGyDLfAhfplLngLAEGxatpeaKsVFrTLeEYkehIrKqrRaqSg
UGT_pfam00201      GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098      +s+isslaagltgipGrke++pldlegvp+slteeFvavymgh+l1pd+i+irdih+dpvt+e+lt+sldl+g+ka+++lee+g+a+l+yslgvqnp
hemoctyanin_pfam00372__phenolox      qlyg+lhmgh+++yahdpdhr+ley+gvmgd+taTamRDpVfyrwhkyidd+fg+kr+y1kpYtk+eLtfpgv+vrsv+vdlnagg+pnkl+Tfwq+s
P450      Rlyp+vpRleR+l++dvvfpggk+sipkqtlviipiyalhrdp+ywgnPeeFdpferfapenvknrh++aylpGgaGpRnGiGmfameemkvalavl1r
short-chain-dehydrogenase_PRKO      lPgdQmdNiahmeakGAavtlnlvtmsedllnAlk+vindpsykenimr1ssihhdqvpkpldravfwiEfvMhkhgakh1RpaahdLtwyqyhsLdvi
UGT_pfam00201

510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
ABC_transporteur_PLN03130      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC_transporteur_TIGR00957      nsFqskvqn+RndElswrkaqllsafnsFlInsipvvtv+sfG+ftllggdlTpA+afTslSifavlrFp1fMipnlitqavnvanVskRLeelllae
AChE      aylavgtftwvctplvalTfavvytdennildAkafVsl+lfnlirfpIn+lpmvissivqasVslKRl+iFlshheElePdsieRrikqegnsitvna
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154      rsimkywanfaktgnPNgtRqnnstrWpVftsTeQKyltlnTes+tir+k1raqqCrFWnr+PkvLemtgnIdeaeEwKaeFhR++yMmdWknqFnd
aldehyde_oxydase_smart01008      +dapgmieryrrtltslffkfytlvllkkgkdk+kcv++ldp+y+sat+lfq+dpp+++ql+gevp+gqskedpvgpr+phl+alkqa+GeavyodDi
amino-oxidase_pfam01593      t+detflsadvnravnshmtgssklflltr+kfWlk+k1pccildg1+r+vyoldyepd+psgkglvllsytweddshkllavpdkkeroqvlv+dla
CbE      k+td+++tmanFak+gnPt+g+i+dvew+pysp+np++y1l+++iypp+gm+d+fff+r1+fwdelrkssndtslveg++lq+d+vyss++sveeike
Chitinase_COG3325      gw+gvt+g+nglwg+ravlpng+foa+ggdptg++dga+gegwhdvd+gdeeaqvf+ywdnlankg+g+ngagyeryddvkap+l+n++kgvfy+syd
Cuticule_prot_pfam00379      l+seygwdg+qsahl1+flelerw+g+kpifwgdalreaefsywyi+gl+gasdlpp++qsf
FAD-oxidoreductase_pfam01266      sf+rflqwtlnrlqt+ppvqla+kyf+feedplwqmpoddkrhkdwiwkek++dhlp+fliig++kqgtralleflslhpdvr+nypspe+fee+hff
fucosyltransferase_pfam10250      galtlhn+peflrnlkrlp++qemd+aaldilRdRergvPrynefRrqlgkpsatfed+tsssd+eva++lr+vYggdvkvdllvG+laE+prp+Gfa
UGT_pfam00201      dvd1srqldfspegnvdvfarfthl+hkpfisy+ievnmnd+a+rrg+vriFlaPkyDergtrp++++dqrnmfvelDKf+vtilkpGsniti+R+Stessvtip
short-chain-dehydrogenase_PRKO      fr++pcdpt+iplklpp+r1vl+pkngiy1+++pp+iitgs
UGT_pfam00201      gFl1lacvatvafitfkcclfgyrkolgkkgk+k+hkskt

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
ABC_transporteur_PLN03130      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC_transporteur_TIGR00957      ervl1pnp1epglpaiSikngyfsWdkaerptLsNiNlndipyGslVaiVGstGekKtSlisAmlGElpprsdgs+virgtvaYvpQvswiPnatvRDN
AChE      tftWaryepPtlng+tfSiPeGalVavVgqvcGKSSl1sAll+EmdkveGhvkgsvaYVpQqaWiqnds1reNiLFGalek+YkviaeCALI+DLB1P
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154      Y+skqesC+gl
aldehyde_oxydase_smart01008      pryp+elflalvtstraHakiksID+seAlklpgvvaf++addipg+n++gpvv+detv+akdkV+cvghiiavvAdtpeiA+rAaklvkvtyed1Pvi
amino-oxidase_pfam01593      a++Pdafdh1vpadgdy+rnlvqhdw1tdphaggaFklnr+gedvys+r1ffqplansplkdtGr+y1agcsesftggwvegaiqtacnaaca+irstg
CbE      llglliapyllipnas
Chitinase_COG3325      dprsvkaKa+yv+dn+lgGmmfWe+sgdyngtll+avr+gl+gk+y+ig+ptagefevakpsdt+pdsi+vtqd++pin+kgftnaipggstf+flp+sa
Cuticule_prot_pfam00379      +ornyhkgldwymdf+p+slnntt+gg+tfek+++yfds+vvpr+r+lal1pplvedr1++kii+lvrdrPravla+ra+afs+y+hqr+h1+k+ad++sf+
FAD-oxidoreductase_pfam01266      f+etafrifilma+r1r1+DRFlyengfssdiqkttdiirntptsdfp++yt+egmgsangyvs1sdymqwkifitrsinwflgnpnmgmdtmmie
fucosyltransferase_pfam10250      +ertfrnly+mcp+dpgs+e+aqf+fcgggwpqhm1ipkGt+eGmpfqlfvmvysn+dddrv+qdlvgscondaa+og1rdrlrlyPreramGfPDrpvs+
UGT_pfam00201      P450
short-chain-dehydrogenase_PRKO
UGT_pfam00201

```

```

710       720       730       740       750       760       770       780       790       800
...
ABC_transporteur_PLN03130      iLFGspfdp+rYekaIdVtalQhDLdlppggDlTeiGERGvniSGGQKqRvsmARAVYsnsdvyifDDPLSAIDAHV+rqvPdkCikdelrgkTRvLVtn
ABC_transporteur_TIGR00957    sGDrTeiGEG+nLGGQkqRvsLARAVYsn+diYlFDDPLSAVDAHV+KHIFeViGpkGLk+kTRiLVTBgis+LpqvDviIVms+GkiesemGsyqeLl
Ache
alcohol_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxidase_smart01008      +tiedaikn+sfylhpgnigperkiekGdvkegf+ead+vvv+ge+yiggqehfy leth+++aip+gedgelel+vtstQvp++tqrfvaktLgip+nrv
amino-oxidase_pfam01593         qqlsegmpldh+wkry+ya
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379          pdgakdsgggllkvisghtan+igs+vt+n+vs+saptsipagatyavdmvyytptflvss++tft+g+et+ty+ftvae++agnag+g+v+tt+ag+g
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685      evi+a+gsa+sal+dlnqgclqpglyathlerwlyrflpgqllivdgedlrlpaei++vqdFlg+++t+ny+khlyfn+tkgf+cq+seasg+++clg
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098       W+e+tsvgnkgkpyqlpd+tm++vlsvgtvevrpnknrkslrhypeleawnsllyhggngrti++l+gvenafdlmhgimfiwgvlfpspW++rylrhi
hemocyanin_pfam00372_phenolox   +vt+lqdfLtpNm++kdvti+hdttrter+rykpytqesn+ayprsy
P450
short-chain-dehydrogenase_PFK0
UGT_pfam00201

810       820       830       840       850       860       870       880       890       900
...
ABC_transporteur_PLN03130      QlHFLsqvD+iilyh+GmikeeGtfeelsnngplfqlklmEnaGkmeeyveenesge+e+nk++skp++ngpalkrrnel+k+vk+++kqkegksvlikqE
ABC_transporteur_TIGR00957    rdgafaeflrtyaeqedvsqsgkkaemeng+lvtdvgkqlqRlSsSssgdsrhst+elqkaeaKee+wkmea+KqgtgqvLVsv+wdYmKaiGLfitf
Ache
alcohol_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxidase_smart01008      rvkrmgGGFGGKe+rs+llsvi+alaayktg+pvrclvRededmlitggrhpfllg+ykvgfmkdGtilaldvehysnaGa+ldlshs+meralfh+dnay
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379          gd+++t++qwdas+qytgqdv+++gktyeakwvtg++p+aggwgvwk++ga
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685      kskgrq+ekwrpfkiavvqvgpamd++yklld+fr+hnr+fskligr+fppawl++dlqt1
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098       dy+y+qhrnlnggvaifgavaaqshagiqvllrkrfhyglgmdqkkgwlftrqyyklvdelpipelepiefngldgidhgggtdtgvghfpvnsetKgi
hemocyanin_pfam00372_phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PFK0
UGT_pfam00201

910       920       930       940       950       960       970       980       990       1000
...
ABC_transporteur_PLN03130      eretgvsvkwlmrYknaIGawvmlif+cyilTevlrvssstWLS+Wtdqgt+kthgpgyynl+yallsfgqvltlgnsywli+SalyAakrIHdam
ABC_transporteur_TIGR00957    lsifLfvnhsvalasnyWLSlWt+Dpvnvg+qntnrLsVygAlgilgga+fgyasmAvsiggiAsrIHdlh+n+rspmsFF+rtP5G+++NrPSK+ldt
Ache
alcohol_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxidase_smart01008      kipn+rg+grloktnlpsntafRGfGppqalfi+EswmdevAvkqglppeevr+kNmykegd1thfnq++esf+lkrownel++sny+arksevekfn+
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379          gllderdrdgkpsaytagqdftristvKaklatrsseplfrl+srplvvvnlpmgdgadgaavatpgpptoicydgmknvvpfilppnvmtgipmqiqy
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098
hemocyanin_pfam00372_phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PFK0
UGT_pfam00201

1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
...
ABC_transporteur_PLN03130      lgsilrApmvFFhtNP+GRiiNRFaKDlGdiDrnvavf+nmlflg++fqlstfvlIgiVstisLwaimpLLVlfy+aylyyqst+revkRldsitRSPvy
ABC_transporteur_TIGR00957    vD+m+pvIkmgSLfnvIgaiVillatPi+a+iI+PlgliyffvgRFYva+SrqLkRLEsvsRSP+ySHfneTllGvsvIRafeeq+rflhqsDlkvde
Ache
alcohol_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxidase_smart01008      qn+wkkrg+giiptkfvgisft+yflnqagalvnyvtdgsvlv+hggtemGqG+hTKm+q+aseaLkipmskihsetsTdtvnp+spTaaSrstdinGn
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379          lpssslalfsdeiglevhrparagliswiLgtctktirsarrrsvglgsvdsfpngddspnsgerydlaldtrvgflgpl
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098
hemocyanin_pfam00372_phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PFK0
UGT_pfam00201

```

```

1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
ABC transporteur_PLN03130      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC transporteur_TIGR00957      aqfgeaLNglstIRaykaydrma+ingqsmdnNirftlvmsnswl+irLetlqglmiwltatfavmqn+raenqaafastmGLllyalnit+lltav
AchE      Nqkayypsivanrwlavrleovgncivifaalfavistr+SlsaglvGLsVsylqvtynlwl+RmssemetnivAVERlkEYsete+Eapwqi+et+pPs
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxydase_smart01008      avynac+kilkrlepfkknpdg+a+kdgvykwedwv+aay+drvslsatgfyrtkplgydfet+sgnaf+yftyg+acseVEiDcITGdhknrlrtdivm
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098
hemocyanin_pfam00372__phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PRKO
UGT_pfam00201

1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
ABC transporteur_PLN03130      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC transporteur_TIGR00957      lRlaslaeNs+naVERvgtYidlpsEaplvIE+nrRpPpgWpssGsi+fedVvlyrYrpeLpPVLhg1SfeispseKVgivGRTGAGKSSmnlalFRiveIE
AchE      WPCrVEFrnyclrYredld+VLR+++vtiggEKVGIVGRTGAGKSSltlgLFRinesaeGeiIDG1NiakigLhdLR+kitIIPQDPvLPSG+LRmNLD
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxydase_smart01008      DvgsslNpaidiGQveGgfvqg+GlftlEel+yspegslltrbpsdYkipafgdiPtefnvslrld+pmpkaiy+sKgvGEpplfl+pasvffAikdAia
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098
hemocyanin_pfam00372__phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PRKO
UGT_pfam00201

1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
ABC transporteur_PLN03130      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC transporteur_TIGR00957      rGrilIDgodiskfgl+dLRkvlgIIPQaPVLFSgtvRfNLDPFnehndadlWealErahLKdvirrn+lgLdaevse+GeNFSVGGQRQLLSLARALLRr
AchE      PFSqrYde+vWalELahLkdfVsaiPd+LdhecaeGGeN1SVGQRQlvCLARALLRktkILVLDEATAavD1ETDnLIQsTIRtqFedCtVLTIAHRLNT
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxydase_smart01008      aarehtn+n1ke+frldsPatpekir+acedkftkloptg+pg+fkpwsrvv
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098
hemocyanin_pfam00372__phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PRKO
UGT_pfam00201

1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
ABC transporteur_PLN03130      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC transporteur_TIGR00957      sKILVLDEATAaVDvrTDalIQkTIReeFksCTmLiIAHRLNTiiDcdriLvldaGrvvE+dtPeeLlnnegsaFskmvqstGaanA+yLrslv+ggdge
AchE      IMDYtRv+VldkGevEfgaPseLlqqrGiFysmakdaGlv
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxydase_smart01008
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325
Cuticule_prot_pfam00379
FAD-oxidoreductase_pfam01266
fucosyltransferase_pfam10250
fulfotransferase_pfam00685
GST-Cter
GST-Nter
heme_peroxidase_pfam03098
hemocyanin_pfam00372__phenolox
P450
short-chain-dehydrogenase_PRKO
UGT_pfam00201

1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
ABC transporteur_PLN03130      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ABC transporteur_TIGR00957      rk++reenkrldgqrkw+assrwaaaqfalavsltssqndlqgle++den+ilektkdavitl+gvlegkhd+vlee+lnqyqvrpdgwwsslyr+veg
AchE
alcoo1_dehydrogenase_PLN03154
aldehyde_oxydase_smart01008
amino-oxidase_pfam01593
CbE
Chitinase_COG3325

```

Annexe 5

Liste des gènes candidats potentiellement impliqués dans les résistances aux insecticides de synthèse chez *C. pomonella* après recherche par mots clefs et validation manuelle (Wan et al. 2019)

Gene group	Gene ID	Chromosome	Position	Position
	CPOM00365.t1	chr2	16 731 564	16 735 072
	CPOM01251.t1	chr7	12 383 279	12 397 612
	CPOM01252.t1	chr7	12 397 619	12 406 930
	CPOM01668.t1	chr7	28 403 172	28 408 970
	CPOM01858.t1	chr1	12 864 021	12 872 733
	CPOM02442.t1	chr5	2 958 940	2 966 249
	CPOM02498.t1	chr5	5 248 987	5 262 897
	CPOM02800.t1	chr5	19 294 415	19 312 654
	CPOM02804.t1	chr5	19 527 890	19 530 891
	CPOM02806.t1	chr5	19 549 200	19 551 521
	CPOM02847.t1	chr5	21 917 346	21 919 950
	CPOM02850.t1	chr5	22 078 620	22 098 819
	CPOM02851.t1	chr5	22 170 686	22 175 211
	CPOM02891.t1	chr5	23 915 388	23 919 973
	CPOM02893.t1	chr5	23 926 973	23 929 062
	CPOM02971.t1	chr8	2 860 022	2 876 859
	CPOM03534.t1	chr17	8 983 889	8 989 392
	CPOM03544.t1	chr17	9 500 264	9 502 224
	CPOM03545.t1	chr17	9 559 554	9 560 177
	CPOM03546.t1	chr17	9 560 194	9 561 360
	CPOM03555.t1	chr17	10 033 684	10 037 456
	CPOM03616.t1	chr17	12 600 412	12 612 201
	CPOM03846.t1	chr17	20 457 549	20 484 763
	CPOM03892.t1	chr17	22 148 625	22 157 612
	CPOM04308.t1	chr19	12 088 246	12 088 845
	CPOM04310.t1	chr19	12 111 511	12 111 771
	CPOM04912.t1	chr13	14 612 751	14 624 661
	CPOM04994.t1	chr13	17 385 515	17 390 540
	CPOM04995.t1	chr13	17 390 566	17 393 352
	CPOM05139.t1	chr20	2 029 085	2 039 158
	CPOM05153.t1	chr20	2 725 924	2 735 918
	CPOM05154.t1	chr20	2 735 959	2 747 239
	CPOM05211.t1	chr20	5 249 733	5 252 226
	CPOM05212.t1	chr20	5 256 763	5 259 015
	CPOM05240.t1	chr20	6 096 597	6 097 049
	CPOM05241.t1	chr20	6 097 063	6 101 126
	CPOM05282.t1	chr20	7 469 173	7 470 941
	CPOM05283.t1	chr20	7 474 793	7 475 152
	CPOM05284.t1	chr20	7 475 744	7 476 055
	CPOM05454.t1	chr20	12 134 674	12 141 716
	CPOM05456.t1	chr20	12 184 110	12 190 076
	CPOM05457.t1	chr20	12 212 399	12 229 949
	CPOM05459.t1	chr20	12 257 611	12 266 819
	CPOM05780.t1	chr3	1 885 450	1 889 593
	CPOM05895.t1	chr3	4 726 235	4 729 727
	CPOM06080.t1	chr3	11 360 146	11 363 523
	CPOM06401.t1	chr10	13 179 945	13 194 546
	CPOM06412.t1	chr10	14 056 060	14 064 626
	CPOM06587.t1	chr10	19 848 777	19 856 835
	CPOM06992.t1	chr3	33 264 458	33 268 693
	CPOM06993.t1	chr3	33 269 064	33 273 674
	CPOM07593.t1	chr11	5 377 309	5 388 647
	CPOM07596.t1	chr11	5 444 480	5 447 153
	CPOM07597.t1	chr11	5 448 206	5 451 045
	CPOM07791.t1	chr11	10 373 289	10 386 841
	CPOM08115.t1	chr21	5 937 197	5 939 009
	CPOM08164.t1	chr21	7 204 673	7 220 141
	CPOM08165.t1	chr21	7 226 725	7 232 412
	CPOM08185.t1	chr21	7 742 989	7 746 594
	CPOM08186.t1	chr21	7 747 876	7 749 729
	CPOM08431.t1	chr21	16 458 944	16 459 654
	CPOM08432.t1	chr21	16 460 666	16 462 024
	CPOM08435.t1	chr21	16 555 413	16 560 491
	CPOM09011.t1	chr23	5 357 944	5 359 661

cytochrome P450

CPOM09449.t1	chr26	7 022 214	7 024 430
CPOM09450.t1	chr26	7 037 753	7 038 139
CPOM09975.t1	chr22	12 241 963	12 243 065
CPOM09976.t1	chr22	12 244 642	12 248 748
CPOM10119.t1	chr9	20 788 429	20 800 554
CPOM10121.t1	chr9	20 820 410	20 835 272
CPOM11142.t1	chr12	9 364 324	9 389 197
CPOM11143.t1	chr12	9 391 857	9 416 360
CPOM11144.t1	chr12	9 429 205	9 454 836
CPOM11145.t1	chr12	9 466 361	9 469 761
CPOM11824.t1	chr18	6 076 266	6 094 243
CPOM11990.t1	chr4	33 240 414	33 247 816
CPOM12020.t1	chr4	34 554 309	34 558 835
CPOM12210.t1	chr2	43 218 169	43 218 920
CPOM12211.t1	chr2	43 222 152	43 222 469
CPOM12691.t1	chr27	8 285 910	8 295 552
CPOM13426.t1	chr4	5 156 027	5 171 414
CPOM13480.t1	chr4	8 053 547	8 054 194
CPOM13481.t1	chr4	8 054 197	8 054 457
CPOM13482.t1	chr4	8 054 555	8 054 884
CPOM13641.t1	chr15	22 766 424	22 772 885
CPOM14496.t1	chr14	13 397 656	13 415 563
CPOM14638.t1	chr28	4 217 281	4 218 566
CPOM14639.t1	chr28	4 218 581	4 221 477
CPOM14640.t1	chr28	4 223 147	4 227 346
CPOM15000.t1	chr1	46 579 480	46 593 181
CPOM15081.t1	chr13	25 266 887	25 276 159
CPOM15082.t1	chr13	25 338 903	25 348 068
CPOM15879.t1	chr1	56 511 636	56 516 201
CPOM16229.t1	chr8	23 345 864	23 355 693
CPOM17033.t1	chr12	1 145 988	1 155 354
CPOM17169.t1	chr4	2 579 162	2 587 831
CPOM17207.t1	chr15	9 894 838	9 915 051
CPOM17467.t1	chr5	28 960 633	28 963 676
CPOM17483.t1	chr18	2 339 839	2 340 543
CPOM17484.t1	chr18	2 340 737	2 345 373
CPOM17536.t1	chr4	3 134 290	3 142 943
CPOM17548.t1	chr4	3 748 561	3 759 644
CPOM17551.t1	chr4	3 788 699	3 798 539
CPOM17911.t1	chr26	13 498 394	13 509 621
CPOM18307.t1	chr7	29 820 247	29 825 998
CPOM18309.t1	chr7	29 857 438	29 858 321
CPOM18310.t1	chr7	29 868 215	29 873 318
CPOM18319.t1	chr5	394 910	404 997
CPOM18543.t1	chr26	12 090 912	12 095 289
CPOM18544.t1	chr26	12 095 317	12 099 726
CPOM18673.t1	chr8	28 061 327	28 081 117
CPOM19000.t1	chr27	12 386 443	12 388 619
CPOM19001.t1	chr27	12 395 513	12 399 422
CPOM19002.t1	chr27	12 414 452	12 420 887
CPOM19003.t1	chr27	12 428 323	12 435 397
CPOM19073.t1	chr15	10 597 477	10 614 893
CPOM19074.t1	chr15	10 626 441	10 644 634
CPOM19075.t1	chr15	10 644 643	10 647 566
CPOM19256.t1	chr1	1 957 520	1 967 443
CPOM19377.t1	chr24	14 733 018	14 734 505
CPOM19544.t1	chr29	2 762 985	2 765 062
CPOM20064.t1	chr21	3 069 133	3 090 619
CPOM20065.t1	chr21	3 098 416	3 099 124
CPOM20066.t1	chr21	3 103 095	3 106 018
CPOM20077.t1	chr19	502 625	512 649
CPOM20195.t1	chr10	26 520 134	26 526 944
CPOM20561.t1	chr9	25 952 515	25 953 072
CPOM20562.t1	chr9	25 953 135	25 954 219
CPOM20563.t1	chr9	25 959 809	25 966 029
CPOM20819.t1	chr5	28 977 685	28 981 271
CPOM20820.t1	chr5	28 989 491	28 996 364
CPOM20898.t1	chr4	29 288 807	29 303 128
CPOM21403.t1	chr27	12 499 529	12 499 876
CPOM21404.t1	chr27	12 499 909	12 503 389

	CPOM21405.t1	chr27	12 505 692	12 510 975
	CPOM21986.t1	scaffold1449	6 079	16 251
	CPOM21987.t1	scaffold1449	18 763	27 134
	CPOM00415.t1	chr2	17 659 379	17 666 663
	CPOM00416.t1	chr2	17 682 113	17 686 341
	CPOM00731.t1	chr2	32 659 334	32 678 685
	CPOM01060.t1	chr7	5 959 709	5 977 785
	CPOM01340.t1	chr7	15 459 675	15 461 820
	CPOM01538.t1	chr7	22 128 673	22 131 288
	CPOM01539.t1	chr7	22 131 345	22 132 827
	CPOM02309.t1	chr1	26 988 559	27 015 214
	CPOM02340.t1	chr1	27 492 422	27 501 760
	CPOM02365.t1	chr1	27 847 299	27 853 158
	CPOM02368.t1	chr1	27 858 647	27 861 053
	CPOM02369.t1	chr1	27 863 421	27 866 715
	CPOM02398.t1	chr5	2 054 452	2 059 268
	CPOM03103.t1	chr8	7 501 304	7 511 270
	CPOM03388.t1	chr8	20 655 999	20 668 187
	CPOM03389.t1	chr8	20 669 414	20 675 840
	CPOM03390.t1	chr8	20 683 233	20 688 890
	CPOM03392.t1	chr8	20 707 198	20 708 916
	CPOM03394.t1	chr8	20 728 837	20 735 897
	CPOM03933.t1	chr19	2 409 074	2 413 699
	CPOM03934.t1	chr19	2 420 381	2 422 055
	CPOM03935.t1	chr19	2 422 075	2 423 659
	CPOM03936.t1	chr19	2 432 570	2 434 604
	CPOM04014.t1	chr19	4 412 927	4 425 055
	CPOM04201.t1	chr19	10 001 486	10 006 437
	CPOM04355.t1	chr19	13 658 254	13 661 781
	CPOM04851.t1	chr13	12 270 771	12 274 702
	CPOM06040.t1	chr3	10 226 534	10 230 476
	CPOM10143.t1	chr9	21 608 903	21 612 711
	CPOM10378.t1	chr16	22 554 288	22 557 524
	CPOM10379.t1	chr16	22 602 695	22 606 760
	CPOM10381.t1	chr16	22 617 894	22 621 280
	CPOM10382.t1	chr16	22 626 645	22 630 239
carboxyesterase	CPOM10784.t1	chr14	19 852 298	19 855 209
	CPOM11183.t1	chr6	22 164 649	22 176 759
	CPOM11424.t1	chr15	11 544 288	11 549 223
	CPOM11578.t1	chr16	7 925 185	7 927 284
	CPOM11726.t1	chr16	13 281 873	13 284 692
	CPOM12273.t1	chr4	18 350 236	18 353 019
	CPOM12805.t1	chr1	29 910 841	29 949 087
	CPOM13378.t1	chr9	10 231 147	10 231 512
	CPOM13390.t1	chr4	4 038 150	4 040 553
	CPOM13392.t1	chr4	4 056 052	4 059 267
	CPOM13393.t1	chr4	4 061 596	4 085 767
	CPOM13401.t1	chr4	4 309 714	4 345 514
	CPOM13402.t1	chr4	4 335 429	4 337 838
	CPOM13403.t1	chr4	4 345 543	4 347 950
	CPOM13449.t1	chr4	5 877 965	5 882 831
	CPOM14343.t1	chr6	18 979 042	18 997 857
	CPOM14598.t1	chr28	2 716 264	2 730 721
	CPOM14809.t1	chr3	21 153 764	21 157 623
	CPOM15818.t1	chr4	14 299 619	14 306 748
	CPOM16201.t1	chr1	40 239 674	40 241 344
	CPOM16248.t1	chr12	24 534 490	24 537 502
	CPOM17152.t1	chr4	1 565 106	1 570 692
	CPOM17983.t1	chr8	21 847 303	21 857 643
	CPOM18105.t1	chr1	37 212 907	37 217 031
	CPOM18131.t1	chr5	26 738 847	26 742 880
	CPOM18132.t1	chr5	26 769 100	26 770 097
	CPOM18133.t1	chr5	26 770 108	26 785 669
	CPOM18175.t1	chr4	11 760 788	11 767 966
	CPOM18347.t1	chr14	26 758 514	26 760 273
	CPOM18348.t1	chr14	26 760 298	26 770 075
	CPOM18541.t1	chr26	12 037 568	12 040 935
	CPOM18860.t1	chr10	1 864 993	1 882 342
	CPOM18861.t1	chr10	1 887 234	1 898 988
	CPOM19160.t1	chr10	2 107 505	2 125 556

	CPOM19161.t1	chr10	2 132 067	2 135 254	
	CPOM20832.t1	chr28	11 614 710	11 619 442	
	CPOM21666.t1	chr9	168 436	172 121	
	CPOM21907.t1	scaffold1365	18 741	20 730	
	CPOM21908.t1	scaffold1365	20 772	28 427	
	CPOM22058.t1	scaffold1543	3 650	13 079	
	CPOM00278.t1	chr2	13 600 068	13 608 211	
	CPOM00366.t1	chr2	16 756 068	16 760 390	
	CPOM00367.t1	chr2	16 769 614	16 771 374	
	CPOM00368.t1	chr2	16 789 982	16 795 834	
	CPOM00730.t1	chr2	32 646 392	32 656 087	
	CPOM02468.t1	chr5	4 557 976	4 565 073	
	CPOM02470.t1	chr5	4 574 154	4 575 372	
	CPOM02471.t1	chr5	4 578 397	4 584 501	
	CPOM02908.t1	chr8	1 145 228	1 147 980	
	CPOM02910.t1	chr8	1 154 658	1 156 735	
	CPOM03072.t1	chr8	7 003 418	7 004 336	
	CPOM03704.t1	chr17	15 311 622	15 317 192	
	CPOM04395.t1	chr19	14 644 172	14 646 539	
	CPOM04462.t1	chr19	17 001 159	17 011 623	
glutathione S- transferase	CPOM06919.t1	chr3	31 257 653	31 259 622	
	CPOM07984.t1	chr11	15 901 042	15 923 358	
	CPOM10609.t1	chr18	19 738 153	19 758 830	
	CPOM12197.t1	chr2	42 986 591	42 992 366	
	CPOM14212.t1	chr15	7 268 544	7 275 814	
	CPOM14449.t1	chr14	12 611 445	12 615 999	
	CPOM15596.t1	chr1	41 433 827	41 439 099	
	CPOM17932.t1	chr14	16 664 481	16 674 643	
	CPOM17960.t1	chr10	1 735 217	1 742 169	
	CPOM18700.t1	chr8	22 724 696	22 726 311	
	CPOM19014.t1	chr15	2 519 142	2 527 559	
	CPOM19062.t1	chr15	19 237 086	19 238 420	
	CPOM19531.t1	chr11	3 413 598	3 429 334	
	CPOM20551.t1	chr27	12 256 518	12 290 030	
	CPOM20631.t1	chr20	131 926	133 579	
	CPOM21168.t1	chr29	3 513 287	3 520 654	
		CPOM01590.t1	chr7	24 478 870	24 489 182
		CPOM01927.t1	chr1	16 711 354	16 758 728
		CPOM01928.t1	chr1	16 774 371	16 789 014
		CPOM01930.t1	chr1	16 921 527	16 951 066
	CPOM01945.t1	chr1	17 162 423	17 179 549	
	CPOM01974.t1	chr1	18 080 818	18 102 414	
	CPOM02406.t1	chr5	2 184 943	2 211 150	
	CPOM02765.t1	chr5	13 791 266	13 796 844	
	CPOM02776.t1	chr5	14 142 289	14 171 908	
	CPOM03335.t1	chr8	18 291 193	18 292 720	
	CPOM03338.t1	chr8	18 319 398	18 324 338	
	CPOM04777.t1	chr13	10 007 611	10 030 243	
	CPOM05652.t1	chr20	17 510 655	17 547 880	
	CPOM06064.t1	chr3	11 052 420	11 065 801	
	CPOM06067.t1	chr3	11 129 192	11 141 501	
	CPOM06188.t1	chr3	14 553 569	14 564 289	
ATP-binding cassette transporters	CPOM06266.t1	chr3	17 138 666	17 160 304	
	CPOM06312.t1	chr10	10 607 431	10 614 237	
	CPOM06313.t1	chr10	10 614 239	10 621 959	
	CPOM06315.t1	chr10	10 663 796	10 680 619	
	CPOM06386.t1	chr10	12 307 919	12 320 452	
	CPOM07641.t1	chr11	6 845 036	6 850 505	
	CPOM07642.t1	chr11	6 858 505	6 881 960	
	CPOM13090.t1	chr12	15 647 471	15 677 113	
	CPOM14555.t1	chr28	781 012	799 445	
	CPOM14556.t1	chr28	799 990	808 536	
	CPOM14588.t1	chr28	2 529 449	2 579 380	
	CPOM14591.t1	chr28	2 581 126	2 598 705	
	CPOM14679.t1	chr11	20 077 200	20 089 270	
	CPOM14727.t1	chr11	21 963 210	21 972 079	
	CPOM14728.t1	chr11	21 983 682	21 999 573	
	CPOM14811.t1	chr3	21 195 611	21 230 064	
	CPOM14812.t1	chr3	21 230 085	21 239 066	
	CPOM14813.t1	chr3	21 239 092	21 249 336	

	CPOM15011.t1	chr1	49 927 911	49 944 952
	CPOM15068.t1	chr13	24 789 112	24 810 345
	CPOM15997.t1	chr18	11 003 506	11 014 507
	CPOM16209.t1	chr1	40 363 884	40 378 061
	CPOM16214.t1	chr1	40 403 062	40 438 306
	CPOM17719.t1	chr3	269 217	289 129
	CPOM18020.t1	chr3	23 581 856	23 597 053
	CPOM18021.t1	chr3	23 609 450	23 626 165
	CPOM18547.t1	chr5	35 729 390	35 759 721
	CPOM18887.t1	chr24	14 485 386	14 506 185
	CPOM19349.t1	chr1	28 194 468	28 224 793
	CPOM19350.t1	chr1	28 230 742	28 252 802
	CPOM21175.t1	chr8	657 374	668 130
	CPOM20343.t1	chr9	683 250	700 874
	CPOM01314.t1	chr7	14 792 311	14 802 733
nicotinic acetylcholine receptor	CPOM03439.t1	chr17	3 601 910	3 620 812
	CPOM19993.t1	chr17	176 548	182 545
	CPOM18757.t1	chr9	24 855 827	24 864 577
	CPOM19029.t1	chr1	3 122 877	3 124 226
	CPOM06200.t1	chr3	14 840 102	14 846 500
	CPOM01313.t1	chr7	14 772 380	14 787 326
	CPOM01068.t1	chr7	6 402 227	6 423 598
muscarinic acetylcholine receptor	CPOM21680.t1	scaffold1163	2 868	9 729
	CPOM11725.t1	chr16	13 220 555	13 232 732
	CPOM11724.t1	chr16	13 183 924	13 184 696
acetylcholinesterase	CPOM02212.t1	chr1	24 957 133	24 961 724
	CPOM13353.t1	chr9	9 245 242	9 269 275
	CPOM13366.t1	chr9	9 909 822	9 911 689
	CPOM01784.t1	chr1	9 077 704	9 087 630
	CPOM01785.t1	chr1	9 139 253	9 144 492
	CPOM21863.t1	scaffold1322	23 094	25 891
aquaporin	CPOM13613.t1	chr15	21 771 685	21 786 907
	CPOM20975.t1	chr11	3 322 092	3 324 564
	CPOM08048.t1	chr11	17 957 711	17 962 992
	CPOM01971.t1	chr1	17 688 724	17 703 833
	CPOM18803.t1	chr1	2 364 845	2 365 763
	CPOM01036.t1	chr7	5 122 218	5 130 003
	CPOM20227.t1	chr18	23 619 262	23 621 208
	CPOM01032.t1	chr7	4 965 691	4 967 693
glutamate-gated chloride channel	CPOM13384.t1	chr9	10 334 495	10 346 076
	CPOM06781.t1	chr3	26 576 609	26 594 379
	CPOM06782.t1	chr3	26 594 419	26 598 097
γ-Aminobutyrate gated chloride channel	CPOM16857.t1	chr4	24 695 218	24 706 686
	CPOM16859.t1	chr4	24 791 578	24 824 352
	CPOM14994.t1	chr1	46 428 104	46 436 935
	CPOM07860.t1	chr11	12 503 622	12 507 733
voltage gated sodium channel	CPOM03720.t1	chr17	15 584 078	15 627 270
	CPOM07240.t1	chr24	1 156 396	1 206 343
	CPOM13919.t1	chr25	12 472 455	12 518 050
	CPOM00254.t1	chr2	12 456 143	12 458 375
	CPOM00266.t1	chr2	13 052 583	13 059 504
	CPOM00270.t1	chr2	13 271 140	13 279 506
	CPOM04163.t1	chr19	9 129 649	9 135 694
	CPOM05872.t1	chr3	4 034 694	4 048 042
	CPOM06457.t1	chr10	15 190 118	15 198 119
	CPOM06460.t1	chr10	15 308 575	15 310 380
	CPOM06599.t1	chr10	20 642 763	20 648 168
	CPOM06856.t1	chr3	28 584 099	28 593 017
	CPOM06857.t1	chr3	28 605 113	28 611 062
UDP-glucuronosyltransferase	CPOM06923.t1	chr3	31 371 528	31 377 908
	CPOM06932.t1	chr3	31 630 635	31 638 714
	CPOM06935.t1	chr3	31 741 599	31 753 367
	CPOM06936.t1	chr3	31 761 467	31 791 370
	CPOM06937.t1	chr3	31 822 722	31 861 674
	CPOM08067.t1	chr21	3 959 999	3 964 743
	CPOM10637.t1	chr18	20 483 915	20 532 518
	CPOM10859.t1	chr14	22 792 023	22 799 737
	CPOM11913.t1	chr18	9 816 000	9 832 053
	CPOM13215.t1	chr12	19 709 496	19 713 461
	CPOM14730.t1	chr11	22 028 778	22 032 808

CPOM16981.t1	chr22	754 712	761 772
CPOM16982.t1	chr22	782 307	789 484
CPOM19699.t1	chr12	12 546 835	12 552 825
CPOM20598.t1	chr2	45 897 710	45 898 292
CPOM20752.t1	chr12	28 065 740	28 070 553
CPOM21024.t1	chr2	1 466 585	1 469 706
CPOM21545.t1	scaffold1076	26 684	30 258
CPOM21547.t1	scaffold1076	40 706	42 530
CPOM22157.t1	scaffold1674	10 224	12 963
CPOM03025.t1	chr8	5 125 360	5 132 733
CPOM03027.t1	chr8	5 181 187	5 186 988
CPOM03020.t1	chr8	4 995 573	4 997 067
CPOM03023.t1	chr8	5 067 157	5 078 342
CPOM03019.t1	chr8	4 974 181	4 981 819
CPOM03017.t1	chr8	4 938 544	4 947 300
CPOM03022.t1	chr8	5 013 138	5 019 010
CPOM03026.t1	chr8	5 168 170	5 171 558
CPOM05956.t1	chr3	6 597 604	6 600 258
CPOM02969.t1	chr8	2 845 058	2 849 178
CPOM18262.t1	chr10	27 079 252	27 081 598
CPOM09337.t1	chr26	2 262 356	2 264 506
CPOM02535.t1	chr5	6 637 152	6 665 365
CPOM11005.t1	chr12	3 963 247	3 973 636
CPOM02527.t1	chr5	6 460 533	6 465 177
CPOM11004.t1	chr12	3 954 130	3 955 802
CPOM16546.t1	chr9	1 875 333	1 879 418
CPOM02533.t1	chr5	6 572 838	6 575 519
CPOM16545.t1	chr9	1 840 904	1 860 384
CPOM16544.t1	chr9	1 838 619	1 841 628
CPOM02529.t1	chr5	6 516 449	6 520 054
CPOM16543.t1	chr9	1 829 620	1 830 773
CPOM18260.t1	chr10	27 061 896	27 064 158
CPOM18263.t1	chr10	27 091 320	27 095 360
CPOM02532.t1	chr5	6 543 998	6 547 843
CPOM17072.t1	chr17	2 430 820	2 436 426
CPOM17073.t1	chr17	2 439 987	2 443 682
CPOM02519.t1	chr5	6 337 002	6 337 935
CPOM05955.t1	chr3	6 579 097	6 579 330
CPOM02537.t1	chr5	6 702 127	6 703 341
CPOM02534.t1	chr5	6 590 529	6 594 033
CPOM02521.t1	chr5	6 386 703	6 388 196
CPOM02531.t1	chr5	6 536 419	6 538 506
CPOM02518.t1	chr5	6 309 269	6 313 623
CPOM01476.t1	chr7	19 523 570	19 526 534
CPOM02528.t1	chr5	6 497 388	6 498 615
CPOM18261.t1	chr10	27 068 824	27 075 052
CPOM02530.t1	chr5	6 531 981	6 534 217
CPOM02536.t1	chr5	6 665 473	6 702 117
CPOM09664.t1	chr22	3 937 724	3 944 824
CPOM02526.t1	chr5	6 447 284	6 453 363
CPOM02523.t1	chr5	6 422 858	6 432 261
CPOM02520.t1	chr5	6 341 575	6 346 845
CPOM02525.t1	chr5	6 440 702	6 441 214
CPOM02524.t1	chr5	6 435 295	6 435 886
CPOM02522.t1	chr5	6 398 717	6 403 060
CPOM05783.t1	chr3	1 931 064	1 934 094
CPOM05782.t1	chr3	1 906 574	1 911 982
CPOM07014.t1	chr3	33 640 616	33 641 211
CPOM07011.t1	chr3	33 594 891	33 601 643
CPOM07010.t1	chr3	33 546 999	33 574 502
CPOM21349.t1	chr5	24 861 631	24 866 795
CPOM21348.t1	chr5	24 844 043	24 853 108
CPOM21346.t1	chr5	24 835 890	24 844 016
CPOM21347.t1	chr5	24 840 858	24 866 789
CPOM02682.t1	chr5	10 561 812	10 564 884
CPOM02699.t1	chr5	11 089 873	11 100 372
CPOM21246.t1	chr5	24 816 702	24 831 569
CPOM21244.t1	chr5	24 786 223	24 792 026
CPOM02693.t1	chr5	10 885 319	10 896 443
CPOM03587.t1	chr17	11 467 336	11 467 962

insect cuticle proteins

	CPOM02694.t1	chr5	10 912 791	10 924 392
	CPOM08584.t1	chr6	6 692 199	6 692 817
	CPOM11376.t1	chr6	29 771 965	29 773 711
	CPOM08583.t1	chr6	6 677 136	6 692 149
	CPOM08582.t1	chr6	6 664 851	6 675 522
	CPOM02684.t1	chr5	10 805 738	10 814 790
	CPOM03092.t1	chr8	7 328 293	7 343 925
	CPOM02690.t1	chr5	10 862 468	10 863 106
	CPOM03588.t1	chr17	11 477 108	11 478 404
	CPOM02704.t1	chr5	11 185 863	11 188 658
	CPOM02691.t1	chr5	10 863 154	10 873 435
	CPOM08586.t1	chr6	6 699 940	6 705 395
	CPOM21245.t1	chr5	24 804 589	24 806 079
	CPOM02692.t1	chr5	10 871 795	10 873 306
	CPOM02680.t1	chr5	10 534 947	10 545 528
	CPOM02873.t1	chr5	23 010 696	23 010 914
	CPOM02687.t1	chr5	10 825 318	10 847 100
	CPOM02677.t1	chr5	10 460 669	10 463 357
	CPOM02679.t1	chr5	10 508 295	10 509 889
	CPOM02685.t1	chr5	10 814 815	10 843 586
	CPOM02689.t1	chr5	10 850 987	10 870 175
	CPOM02681.t1	chr5	10 551 661	10 553 201
	CPOM02688.t1	chr5	10 847 158	10 862 450
	CPOM16313.t1	chr12	26 076 169	26 082 648
	CPOM02678.t1	chr5	10 499 202	10 503 671
	CPOM12207.t1	chr2	43 180 877	43 183 334
	CPOM13866.t1	chr25	9 553 026	9 554 869
	CPOM02701.t1	chr5	11 133 716	11 136 108
	CPOM02683.t1	chr5	10 576 103	10 803 483
	CPOM08585.t1	chr6	6 695 512	6 696 324
	CPOM02698.t1	chr5	11 081 666	11 082 275
	CPOM13930.t1	chr25	13 034 339	13 039 425
	CPOM02697.t1	chr5	11 078 199	11 079 896
	CPOM16109.t1	chr25	7 018 880	7 022 128
	CPOM06162.t1	chr3	13 547 788	13 550 218
	CPOM14066.t1	chr25	3 918 458	3 931 583
	CPOM13923.t1	chr25	12 629 744	12 635 710
	CPOM07012.t1	chr3	33 613 046	33 613 972
	CPOM16108.t1	chr25	6 992 277	6 993 109
	CPOM12215.t1	chr2	43 439 960	43 440 620
	CPOM10641.t1	chr18	20 620 446	20 621 273
	CPOM17790.t1	chr25	8 695 828	8 699 732
	CPOM02700.t1	chr5	11 115 953	11 116 714
	CPOM02579.t1	chr5	7 915 508	7 915 967
	CPOM17450.t1	chr5	28 397 688	28 401 642
	CPOM12773.t1	chr27	11 250 723	11 255 363
	CPOM21260.t1	chr27	51 783	54 521
	CPOM12767.t1	chr27	11 096 580	11 099 904
	CPOM12766.t1	chr27	11 090 568	11 091 509
	CPOM12771.t1	chr27	11 187 978	11 209 371
	CPOM21259.t1	chr27	10 104	34 536
	CPOM12772.t1	chr27	11 223 459	11 229 249
	CPOM14849.t1	chr3	22 503 979	22 505 759
	CPOM11580.t1	chr16	8 051 278	8 056 868
	CPOM14508.t1	chr14	13 841 099	13 848 173
	CPOM14506.t1	chr14	13 794 718	13 795 146
	CPOM05158.t1	chr20	2 894 004	2 896 771
	CPOM05332.t1	chr20	8 553 215	8 553 967
	CPOM05367.t1	chr20	9 086 154	9 087 556
	CPOM18119.t1	chr10	28 036 077	28 042 093
	CPOM06638.t1	chr10	23 890 127	23 891 340
	CPOM09662.t1	chr22	3 904 269	3 907 454
	CPOM05779.t1	chr3	1 872 067	1 877 261
	CPOM02182.t1	chr1	24 337 603	24 372 626
	CPOM22121.t1	scaffold1611	9 966	12 398
tryptamine receptor	CPOM07619.t1	chr11	6 191 376	6 196 417
	CPOM06686.t1	chr10	25 570 712	25 584 122
	CPOM08223.t1	chr21	9 085 647	9 088 493
	CPOM02207.t1	chr1	24 837 312	24 846 399
orctonamine recenotor	CPOM16754.t1	chr21	320 278	322 721

	CPOM08327.t1	chr21	12 280 733	12 291 170
	CPOM08177.t1	chr21	7 548 098	7 548 889
	CPOM08174.t1	chr21	7 507 830	7 521 281
	CPOM08064.t1	chr21	3 826 177	3 828 527
	CPOM08065.t1	chr21	3 854 989	3 860 218
	CPOM18505.t1	chr16	14 977 313	14 978 716
	CPOM10324.t1	chr16	18 604 529	18 605 958
	CPOM11866.t1	chr18	7 715 981	7 745 490
	CPOM11864.t1	chr18	7 688 702	7 689 001
	CPOM17475.t1	chr18	2 062 019	2 075 175
	CPOM06985.t1	chr3	32 954 396	32 955 646
	CPOM10836.t1	chr14	21 619 448	21 624 552
tyramine receptor	CPOM18724.t1	chr7	795 664	807 742
	CPOM17599.t1	chr10	442 449	461 184
phosphatase	CPOM01616.t1	chr7	26 664 875	26 689 041
	CPOM00676.t1	chr2	30 991 129	31 008 233
	CPOM00571.t1	chr2	26 996 984	27 016 184
	CPOM00575.t1	chr2	27 156 540	27 164 969
	CPOM09336.t1	chr26	2 233 764	2 245 550
alcohol dehydrogenase	CPOM13561.t1	chr15	20 314 140	20 318 849
	CPOM10829.t1	chr14	21 536 682	21 537 812
	CPOM11160.t1	chr12	10 105 022	10 105 885
	CPOM00683.t1	chr2	31 199 861	31 200 610
	CPOM20611.t1	chr29	5 425 171	5 431 507
	CPOM15834.t1	chr1	53 522 403	53 528 767
	CPOM14701.t1	chr11	21 035 735	21 038 213
	CPOM14702.t1	chr11	21 046 345	21 049 625
sulfotransferase	CPOM03214.t1	chr8	14 242 108	14 248 690
	CPOM20756.t1	chr8	27 788 049	27 794 593
	CPOM02480.t1	chr5	4 749 232	4 757 792
	CPOM02708.t1	chr5	11 369 865	11 418 043
	CPOM20990.t1	chr5	24 741 150	24 773 421
	CPOM15588.t1	chr11	27 277 837	27 278 394
	CPOM15587.t1	chr11	27 263 068	27 273 272
	CPOM07930.t1	chr11	14 132 690	14 137 292
	CPOM09979.t1	chr22	12 275 393	12 285 692
	CPOM17277.t1	chr12	19 912 121	19 935 313
	CPOM15895.t1	chr12	21 237 031	21 260 843
	CPOM11114.t1	chr12	8 308 226	8 317 836
	CPOM16049.t1	chr18	13 389 014	13 392 215
	CPOM16357.t1	chr12	27 141 710	27 144 465
	CPOM05162.t1	chr20	2 978 386	2 980 210
	CPOM18363.t1	chr11	3 623 577	3 631 637
	CPOM20478.t1	chr22	278 031	285 291
	CPOM05142.t1	chr20	2 085 562	2 090 928
	CPOM15195.t1	chr14	2 820 100	2 836 443
	CPOM18365.t1	chr11	3 632 410	3 634 695
	CPOM07822.t1	chr11	11 142 310	11 145 428
	CPOM19799.t1	chr12	11 649 277	11 652 842
	CPOM18203.t1	chr6	1 320 557	1 351 413
	CPOM08605.t1	chr6	7 481 352	7 482 416
	CPOM11278.t1	chr6	25 029 214	25 033 340
	CPOM13492.t1	chr4	8 446 983	8 460 465
	CPOM01874.t1	chr1	13 365 394	13 365 933
	CPOM01873.t1	chr1	13 356 003	13 365 386
	CPOM08277.t1	chr21	10 721 252	10 732 700
	CPOM02089.t1	chr1	21 297 321	21 316 326
	CPOM17925.t1	chr14	16 545 638	16 557 962
	CPOM17923.t1	chr14	16 536 608	16 538 000
aldehyde oxidase	CPOM09748.t1	chr22	5 911 461	5 926 576
	CPOM18975.t1	chr18	3 052 478	3 066 706
	CPOM18976.t1	chr18	3 092 710	3 111 620
	CPOM16023.t1	chr18	11 738 914	11 753 319
	CPOM16019.t1	chr18	11 651 691	11 669 904
	CPOM17479.t1	chr18	2 163 940	2 174 626
	CPOM17329.t1	chr18	697 810	715 689
	CPOM11320.t1	chr6	27 296 609	27 330 040
	CPOM11920.t1	chr18	9 929 840	9 951 475
	CPOM07292.t1	chr24	2 540 428	2 559 256
	CPOM17331.t1	chr18	727 567	739 359

	CPOM07291.t1	chr24	2 528 213	2 540 396
	CPOM18978.t1	chr18	3 134 070	3 151 195
	CPOM18977.t1	chr18	3 130 668	3 133 882
	CPOM11921.t1	chr18	9 963 280	9 982 485
	CPOM17482.t1	chr18	2 195 879	2 302 792
	CPOM05998.t1	chr3	8 615 286	8 642 034
	CPOM05937.t1	chr3	5 918 826	5 926 959
	CPOM18276.t1	chr6	14 638 550	14 644 082
	CPOM20527.t1	chr6	15 563 455	15 565 702
	CPOM18277.t1	chr6	14 644 107	14 646 977
	CPOM20728.t1	chr6	757 058	758 428
	CPOM16615.t1	chr28	9 145 167	9 154 323
	CPOM16614.t1	chr28	9 143 673	9 145 132
	CPOM16279.t1	chr12	25 260 205	25 265 443
	CPOM04913.t1	chr13	14 645 684	14 660 889
	CPOM04575.t1	chr13	5 635 814	5 643 560
	CPOM04572.t1	chr13	5 549 637	5 556 139
oxidoreductase	CPOM12202.t1	chr2	43 068 298	43 083 710
	CPOM12200.t1	chr2	43 044 681	43 045 777
	CPOM08372.t1	chr21	13 869 185	13 883 769
	CPOM21461.t1	chr15	18 962 202	18 963 610
	CPOM13606.t1	chr15	21 428 651	21 429 786
	CPOM16850.t1	chr4	24 575 548	24 576 984
	CPOM19178.t1	chr14	9 912 974	9 914 176
	CPOM11098.t1	chr12	7 511 136	7 526 221
	CPOM17031.t1	chr12	1 122 888	1 125 951
	CPOM18602.t1	chr1	45 434 994	45 443 620
	CPOM16879.t1	chr4	25 311 545	25 324 949
	CPOM07026.t1	chr3	33 801 159	33 818 604
	CPOM21937.t1	scaffold1396	31 420	31 719
	CPOM09641.t1	chr22	3 264 697	3 265 897
	CPOM14306.t1	chr6	18 020 251	18 021 785
	CPOM05078.t1	chr13	19 413 189	19 424 701
	CPOM18025.t1	chr12	376 567	386 159
	CPOM18023.t1	chr12	342 610	357 742
	CPOM18026.t1	chr12	395 934	400 419
	CPOM03841.t1	chr17	20 245 517	20 247 816
CPOM05079.t1	chr13	19 424 714	19 425 565	
CPOM15248.t1	chr10	3 312 991	3 315 768	
CPOM03840.t1	chr17	20 239 121	20 240 598	
CPOM05090.t1	chr13	19 805 779	19 808 806	
CPOM03710.t1	chr17	15 405 710	15 406 228	
CPOM03712.t1	chr17	15 419 884	15 424 981	
CPOM11032.t1	chr12	4 977 185	4 981 811	
CPOM20079.t1	chr19	543 959	548 020	
CPOM03589.t1	chr17	11 493 499	11 500 779	
CPOM05092.t1	chr13	19 926 023	19 929 771	
CPOM03711.t1	chr17	15 409 470	15 412 888	
fucosyltransferase	CPOM17312.t1	chr18	276 178	291 206
	CPOM11044.t1	chr12	6 037 814	6 039 722
	CPOM09447.t1	chr26	6 976 845	6 987 777
	CPOM17250.t1	chr5	26 088 374	26 091 463
	CPOM02363.t1	chr1	27 832 256	27 841 449
	CPOM17888.t1	chr9	1 131 500	1 138 897
	CPOM07758.t1	chr11	9 319 143	9 320 976
	CPOM20272.t1	chr8	399 730	402 274
	CPOM15778.t1	chr4	12 528 844	12 530 788
	CPOM21697.t1	chr13	712 033	713 737
	CPOM15589.t1	chr11	27 279 528	27 283 040
	CPOM10139.t1	chr9	21 514 726	21 520 219
	CPOM20480.t1	chr22	315 723	331 426
	CPOM16749.t1	chr29	2 697 183	2 698 602
	CPOM16745.t1	chr29	2 650 013	2 651 918
	CPOM14657.t1	chr28	4 959 126	4 964 671
	CPOM22142.t1	scaffold1637	6 882	18 593
	CPOM19479.t1	chr1	52 392 402	52 397 921
	CPOM04502.t1	chr19	20 531 859	20 536 090
	CPOM02647.t1	chr5	9 901 529	9 902 089
CPOM10542.t1	chr18	16 590 758	16 596 507	
CPOM07627.t1	chr11	6 411 316	6 411 828	

CPOM20481.t1	chr22	331 473	338 441
CPOM21698.t1	chr13	716 798	724 136
CPOM12143.t1	chr4	37 582 458	37 591 993
CPOM20330.t1	chr29	2 961 033	2 969 993
CPOM17383.t1	chr22	15 216 759	15 220 264
CPOM17384.t1	chr22	15 240 734	15 247 012
CPOM16344.t1	chr12	26 916 168	26 921 872
CPOM19663.t1	chr29	4 407 428	4 413 739
CPOM14027.t1	chr25	2 418 864	2 419 640
CPOM00846.t1	chr2	36 538 382	36 540 485
CPOM05046.t1	chr13	18 292 728	18 294 298
CPOM18970.t1	chr26	12 205 970	12 209 062
CPOM12353.t1	chr4	21 628 687	21 631 221
CPOM16368.t1	chr12	27 380 018	27 392 135
CPOM12144.t1	chr4	37 594 164	37 597 325
CPOM19481.t1	chr1	52 406 077	52 411 503
CPOM21699.t1	chr13	724 195	736 440
CPOM19175.t1	chr14	9 867 576	9 870 425
CPOM21446.t1	chr14	4 649 826	4 656 039
CPOM18904.t1	chr22	13 828 201	13 834 735
CPOM21653.t1	scaffold1148	33 282	38 949
CPOM03572.t1	chr17	10 759 257	10 760 201
CPOM20787.t1	chr3	41 284 519	41 298 388
CPOM05146.t1	chr20	2 244 524	2 247 053
CPOM11978.t1	chr4	32 702 857	32 709 817
CPOM14749.t1	chr11	22 427 419	22 428 468
CPOM06086.t1	chr3	11 482 153	11 483 674
CPOM03917.t1	chr19	1 907 950	1 912 511
CPOM20788.t1	chr13	3 491 926	3 494 681
CPOM13794.t1	chr5	33 032 024	33 033 534
CPOM06847.t1	chr3	28 518 756	28 530 565
CPOM02323.t1	chr1	27 229 486	27 232 413
CPOM03911.t1	chr17	23 220 756	23 223 860
CPOM08606.t1	chr6	7 488 122	7 490 902
CPOM07410.t1	chr24	7 354 660	7 357 763
CPOM03919.t1	chr19	1 913 959	1 922 187
CPOM03912.t1	chr17	23 229 439	23 234 137
CPOM00088.t1	chr2	6 707 481	6 714 039
CPOM17473.t1	chr18	1 996 189	1 998 636
CPOM12356.t1	chr4	21 749 361	21 750 417
CPOM06617.t1	chr10	22 339 170	22 340 349
CPOM13331.t1	chr9	8 352 759	8 354 042
CPOM20965.t1	chr29	5 209 843	5 213 743

Équipe d'encadrement

Claire Lavigne, Directrice de recherches, UR PSH

Bertrand Gauffre, Chargé de recherches, UR PSH

