

Résistance du puceron vert de pêcher (*Myzus persicae*) vis-à-vis des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes

PLAN DE SURVEILLANCE 2012

Mise en ligne : Août 2013

Introduction et mise en garde de la DGAL :

Ce bilan a été réalisé par l'Anses suite à l'analyse des échantillons prélevés dans le cadre du réseau national de surveillance biologique du territoire auquel participent les partenaires engagés dans l'axe 5 du plan Ecophyto. Ce bilan contribue au rapport national sur la surveillance biologique du territoire remis au Parlement conformément aux dispositions du Code Rural. Ce bilan a vocation à être diffusé largement au sein du réseau de partenaires de la surveillance biologique du territoire.

Les plans de surveillance « résistance » sont intégrés dans le volet « suivi des Effets Non Intentionnels » du dispositif national de surveillance biologique du territoire (axe 5 du plan Ecophyto). Ils concourent à l'analyse de risque phytosanitaire et au suivi des mécanismes de résistance, contribuant ainsi à l'objectif de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.

Ces plans de surveillance constituent un outil d'alerte pour la DGAL. C'est dans cet objectif que sont définis le nombre d'échantillons et la nature des parcelles et/ou pratiques de traitements recherchées dans chaque région (Note de service DGAL/SDQP/N2012-8049 du 05 mars 2012). Ces programmes sont construits pour une lecture nationale principalement, et ils contribuent globalement à l'amélioration des suivis post-AMM.

Pour les professionnels, la valorisation de ces résultats s'effectue essentiellement au travers des notes communes nationales (ex: mildiou et oïdium de la vigne, tavelure du pommier, sclerotinia du colza...).

Cette source d'information doit être complétée par les résultats des essais « résistances » et des monitoring pilotés par d'autres opérateurs.

Résumé :

Cette étude vise à rechercher des allèles de résistance à deux familles d'insecticides, les néonicotinoïdes et les pyréthrinoïdes, utilisées pour lutter contre le puceron *Myzus persicae* et s'est concentrée sur des populations de pucerons venant de cultures de pêcher et de colza. Les mécanismes de résistance recherchés sont une mutation entraînant le changement du



codon 81 qui affecte le récepteur nicotinique (cible des néonicotinoïdes), et les mutations affectant le codon 918 du canal sodium (impliquées dans la résistance aux pyréthri-noïdes). L'objectif principal est de rechercher les deux mutations et ainsi d'avoir une esquisse de la fréquence des allèles de résistance aux deux familles chimiques ciblées dans les populations étudiées.

Les parcelles de colza ont été prélevées majoritairement au Nord de la France à l'exception de deux provenant de Midi-Pyrénées. Les parcelles de pêcher sont toutes issues du sud-est de la France.

Les résultats montrent une réelle disparité dans les allèles de résistance en fonction de la nature des plantes hôtes (pêcher ou colza) et, pour le pêcher dans une moindre mesure, en fonction de la localisation géographique des parcelles analysées. Ainsi, pour **les néonicotinoïdes**, dans les populations provenant de colza, ne sont observés que des pucerons sensibles alors que pour le pêcher, la fréquence allélique de la mutation R81T est de 50%. La majorité des individus des parcelles situées en Rhône Alpes sont hétérozygotes pour cet allèle tandis que l'une des deux parcelles du département des Pyrénées Orientales présente un très fort taux d'individus homozygotes résistants.

Pour **les pyréthri-noïdes**, les individus provenant de colza sont majoritairement d'un même génotype de résistance (93% d'individus Met/Leu, hétérozygotes résistants). Pour les individus venant de pêcher, aucun d'entre eux n'est de génotype sensible. Mais cinq génotypes, différents de celui observé en colza, ont été détectés.

I. Rappel du contexte

Le stage de 4 mois d'Axel GHALMI, étudiant en deuxième année de l'école Supérieure Biologie-Biochimie-Biotechnologie au sein du secteur biologie moléculaire de l'unité RPP avait pour thématique la recherche d'allèles de résistance aux néonicotinoïdes et aux pyréthri-noïdes au sein de populations de *M. persicae* en fonction de l'origine des prélèvements (pêcher ou colza).

Ce stage s'inscrit dans le cadre d'un thème d'étude suivi depuis trois ans par l'unité RPP. Ce travail s'est appuyé en partie sur les échantillons provenant des plans de surveillance 2011 et 2012 de la DGAI.

L'objectif principal était d'avoir une esquisse de la fréquence des allèles de résistance aux deux familles chimiques ciblées, dans des populations vivant sur deux types de culture : le pêcher et le colza.

II. Description brève de la méthode utilisée

Les pucerons analysés sont des individus prélevés en 2011 et 2012 sur colza ou pêcher.

Tous les individus ont été analysés pour rechercher une résistance de cible aux néonicotinoïdes liée à la mutation R81T (Bass *et al.*, 2011) sur la sous unité β du récepteur nicotinique, qui entraîne la substitution d'une arginine (Arg) par une thréonine (Thr). La méthode de PCR dCAPS utilisée pour cette étude a été mise au point par l'unité RPP en 2012.

Pour la résistance aux pyréthri-noïdes, plusieurs mutations de cible ont été découvertes, plus communément appelées Kdr et super-Kdr (s-kdr) ; ce sont des mutations dans le gène qui codent pour le canal sodium voltage dépendant. La mutation kdr affecte l'acide aminé 1014 et entraîne la substitution d'une leucine par une phénylalanine. Les mutations s-kdr

affectent l'acide aminé 918 et peuvent entraîner plusieurs substitutions décrites dans le tableau I.

Ainsi la méthionine peut être remplacée par une thréonine dans le cas de la mutation s-kdr classique (M918T) qui est toujours trouvée en association avec la mutation kdr. La méthionine peut être également substituée par une leucine (M918L), qui est trouvée en l'absence de la mutation kdr. Ces mutations sont responsables d'une forte résistance aux pyréthrinoïdes (Fontaine *et al.*, 2011) en empêchant les pyréthrinoïdes de s'apparier correctement aux canaux sodium.

Tableau I : mutation détectée sur le codon 918 du gène canal sodium voltage dépendant, correspondance de l'acide aminé substituant la méthionine et phénotype associé

Codon (sur le brin sens)	Codification du codon	Phénotype
ATG	M918	sensible
A CG	M918T	Résistant(s-kdr classique) en association avec la mutation kdr*
T TG	M918L**	Résistant(s-kdr atypique)
C TG	M918L ^{bis**}	Résistant(s-kdr atypique)

En rouge, la base mutée par rapport au codon sauvage

* : L'acide aminé thréonine en position 918 (mutation s-kdr classique) est toujours trouvé en association avec l'acide aminé phénylalanine en position 1014 (mutation kdr L1014F)

** : 2 codons 918 mutés ont été trouvés chez *M. persicae* comme codant pour une Leucine

Concernant les individus provenant de colza, ils ont été analysés par qPCR pour rechercher la mutation M918L du canal sodium, responsable d'une forte résistance aux pyréthrinoïdes.

Pour les pucerons provenant de pêcher, la qPCR utilisée habituellement sur *M. persicae* du colza s'est révélée ne pas être une méthode adaptée. En effet, chez les pucerons provenant du pêcher, les études réalisées précédemment au laboratoire, mais non publiées, ont montré qu'il existait un grand polymorphisme concernant le codon 918. Pour ces individus provenant du pêcher, un séquençage d'une portion du gène du canal sodium, codant pour les segments 4 à 5 du deuxième domaine intra-membranaire de la protéine, a été réalisé afin de déterminer quel était leur génotype. La portion de gène séquencé est le fragment connu pour contenir les principaux codons impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *M. persicae*.

III. Résultats

En principe, le nombre de pucerons analysés par parcelle a été de l'ordre de 20 à 30 en colza et de 15 à 20 en verger de pêcher ; mais les populations de certains échantillons ont parfois été moindres, si bien que le nombre d'individus testés peut être plus bas pour certaines parcelles.

Quelles que soient les mutations recherchées, les méthodes utilisées permettent de distinguer, pour chaque individu, son génotype (homozygote ou hétérozygote). Aussi pour chaque mutation, une codification particulière a été adoptée.

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

Tableau II : codification des génotypes trouvés pour le codon 81 du gène du récepteur nicotinique :

Génotype	Codification
Homozygote Arginine (sauvage)	Arg/Arg
Hétérozygote Arginine et Thréonine	Arg/Thr
Homozygote Thréonine	Thr/Thr

- Il en est de même pour la codification concernant les différents génotypes pour le codon 918. Le tableau III ci-dessous reprend la codification des différents génotypes rencontrés pour ce codon.

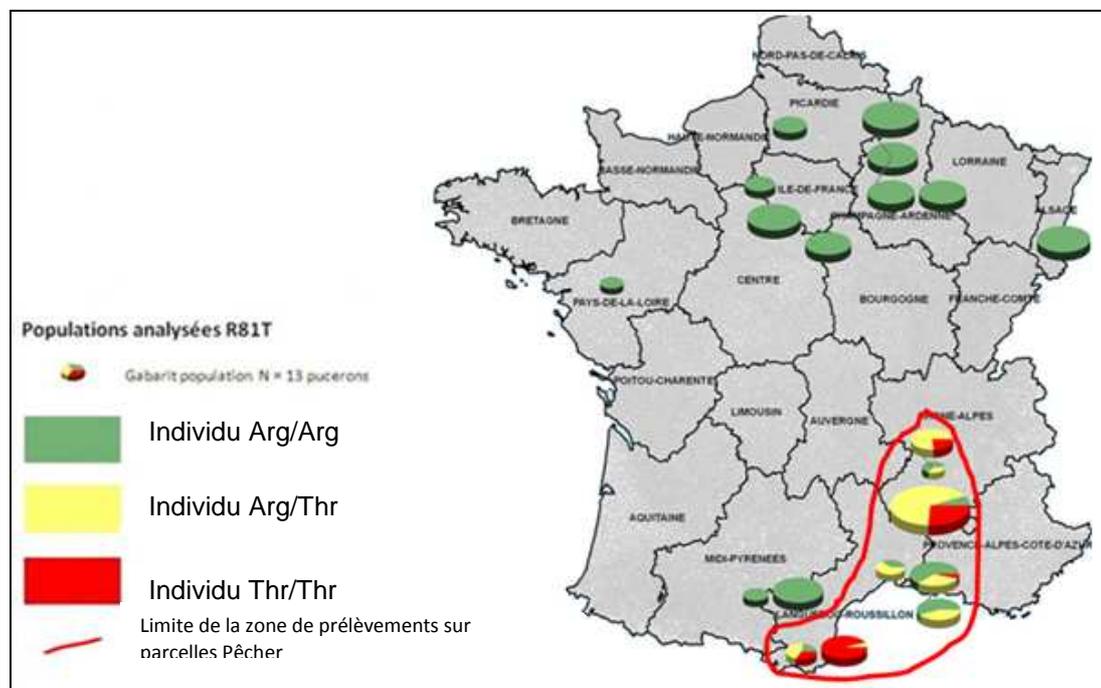
Tableau III - codification des génotypes trouvés pour le codon 918 du gène du canal sodium

Génotype	Codification
Homozygote Méthionine (sauvage)	Met/Met
Hétérozygote Méthionine et Thréonine	Met/Thr
Hétérozygote Méthionine et Leucine	Met/Leu
Hétérozygote Méthionine et Leucine ^{bis}	Met/Leu ^{bis}
Hétérozygote Leucine ^{bis*} et Thréonine	Leu ^{bis} /Thr
Homozygote Leucine ^{bis}	Leu ^{bis} /Leu ^{bis}
Homozygote Thréonine	Thr/Thr

a. Résistances aux néonicotinoïdes sur prélèvements 2011 et 2012

La figure 1 présente une cartographie des résultats obtenus dans la recherche de la mutation R81T (sous unité β du récepteur nicotinique), responsable d'une résistance aux néonicotinoïdes dans des échantillons de pucerons (n = 399) provenant de parcelles de colza et de pêcher (détail des résultats par parcelle en annexe 1)

Figure 1 – Répartition des génotypes pour la mutation R81T



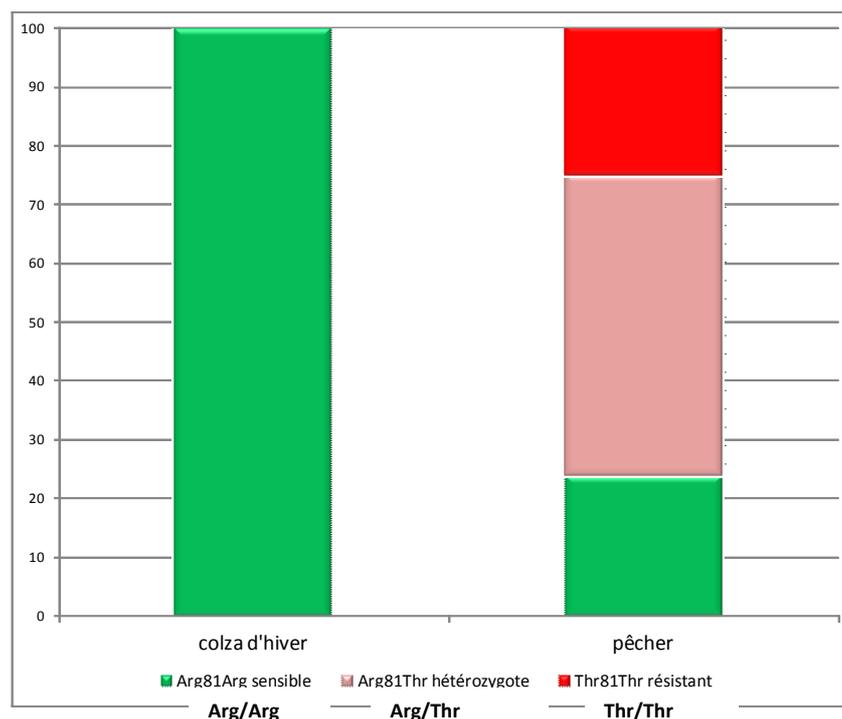
La première chose remarquable est le fait qu'aucune mutation R81T n'ait été détectée sur des échantillons provenant de parcelles de colza. Ainsi, les pucerons prélevés sur colza en Ile-de-France, Centre, Pays-de-la-Loire, Picardie, Champagne-Ardenne, Lorraine, Alsace et Midi Pyrénées ne présentent pas les génotypes Arg/Thr ou Thr/Thr liés à l'expression d'une résistance aux néonicotinoïdes.

En revanche, les échantillons provenant de parcelles de pêcher (cercle rouge figure 1) montrent des résultats très différents et beaucoup plus hétérogènes. Ainsi, à l'inverse des parcelles de colza, dans toutes les parcelles de pêcher analysées, l'allèle de résistance aux néonicotinoïdes est détecté. L'une de ces parcelles, située dans le sud du Languedoc-Roussillon (Pyrénées Orientales), montre une population presque entièrement composée (à 95%) d'individus homozygotes avec cette mutation (Thr/Thr). Dans l'ensemble des autres parcelles, la majorité des individus porteurs de l'allèle de résistance est hétérozygote (Arg/Thr). Pour les trois parcelles situées en Rhône Alpes, dans le département de la Drôme, la proportion d'individus sensibles est variable selon les parcelles (de 0 à 64% de génotype Arg/Arg). Globalement pour cette région, la grande majorité des pucerons est hétérozygote (65 % d'individus Arg/Thr), 22% des individus testés sont homozygotes résistants (Thr/Thr) et 13% sont homozygotes sensibles (Arg/Arg). Pour les trois parcelles situées à proximité du delta du Rhône (deux en Provence-Alpes-Côte d'Azur et une dans le Gard, en Languedoc-Roussillon), le nombre d'individus homozygotes sensibles représente entre 37% et 61% de l'échantillonnage, selon les parcelles.

La figure 2 présente la proportion des génotypes des pucerons analysés en fonction des plantes hôtes.

Figure 2 - Fréquences des différents génotypes pour le codon 81 en fonction des cultures

(échantillon global de pucerons analysés : en parcelles de colza n = 225, en verger de pêcher n = 174)



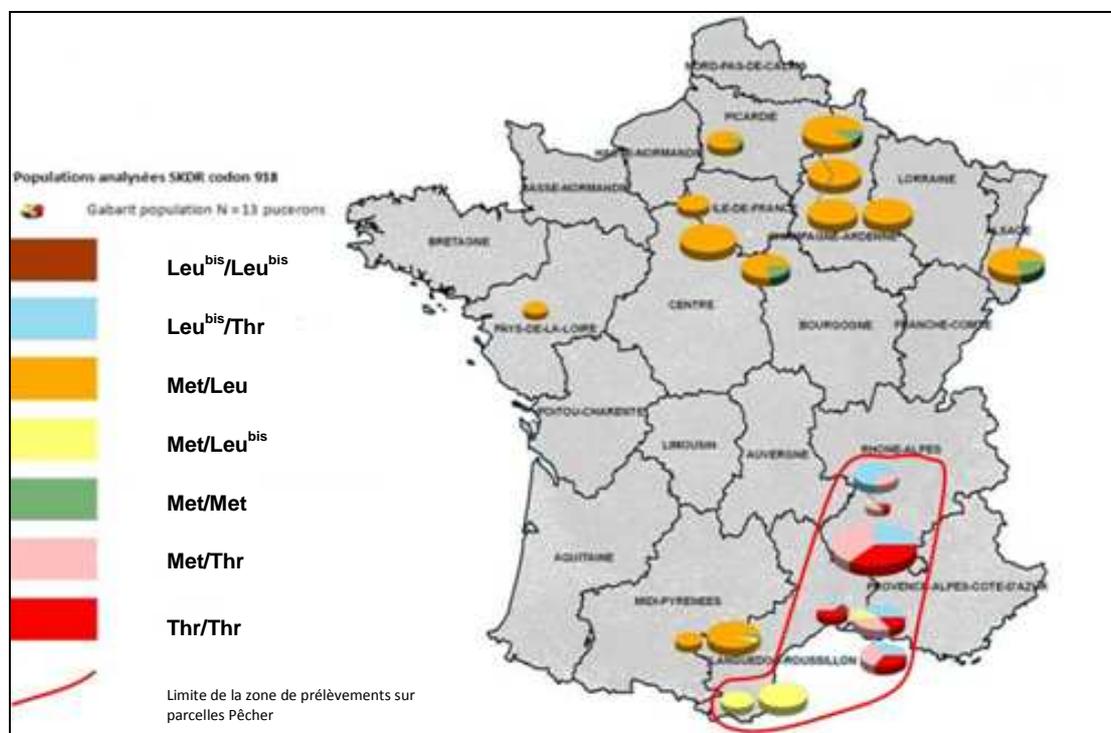
La résistance aux néonicotinoïdes, liée à la mutation de cible R81T, est uniquement présente dans les parcelles de pêcher. La figure 2 montre que, dans les populations prélevées sur cette culture dans le grand quart sud-est de la France, la fréquence moyenne des pucerons homozygotes résistants (Thr/Thr) est de 25,3 %, tandis que celle des hétérozygotes (Arg/Thr) avoisine les 50,6 % et celles des individus sensibles (Arg/Arg) 24,1 %.

Des tests biologiques ont été menés en parallèle à ce travail. La description succincte de la méthode utilisée et quelques résultats sont présentés en Annexe 2. Les données obtenues sur l'ensemble des tests montrent un lien entre le génotype et le phénotype : les clones Arg/Arg (génotype sauvage) présentent des facteurs de résistance (entre le clone étudié et la référence sensible de laboratoire 4106A) compris entre 1,6 et 4,9 selon les clones, les clones Arg/Thr (hétérozygotes pour la mutation R81T) présentent des facteurs de résistance compris entre 5,7 et 17,7, tandis que les clones Thr/Thr (homozygotes pour la mutation R81T) se révèlent franchement résistants (facteurs de résistance compris entre 210 et 249). Reste à savoir si, en sus de cette résistance de cible, certains clones ne présentent pas une résistance métabolique plus ou moins développée qui pourrait avoir une influence non négligeable sur les niveaux de résistance et expliquer la variabilité de réponse enregistrée, notamment pour les clones Arg/Thr.

b. Résistances aux pyréthrinoïdes sur prélèvements 2011 et 2012

La cartographie de la figure 3 montre un bilan géographique des analyses (n = 366) réalisées pour le codon 918 impliqué dans la résistance aux pyréthrinoïdes (détail des résultats par parcelle en annexe 1).

Figure 3 - Répartition des génotypes s-kdr

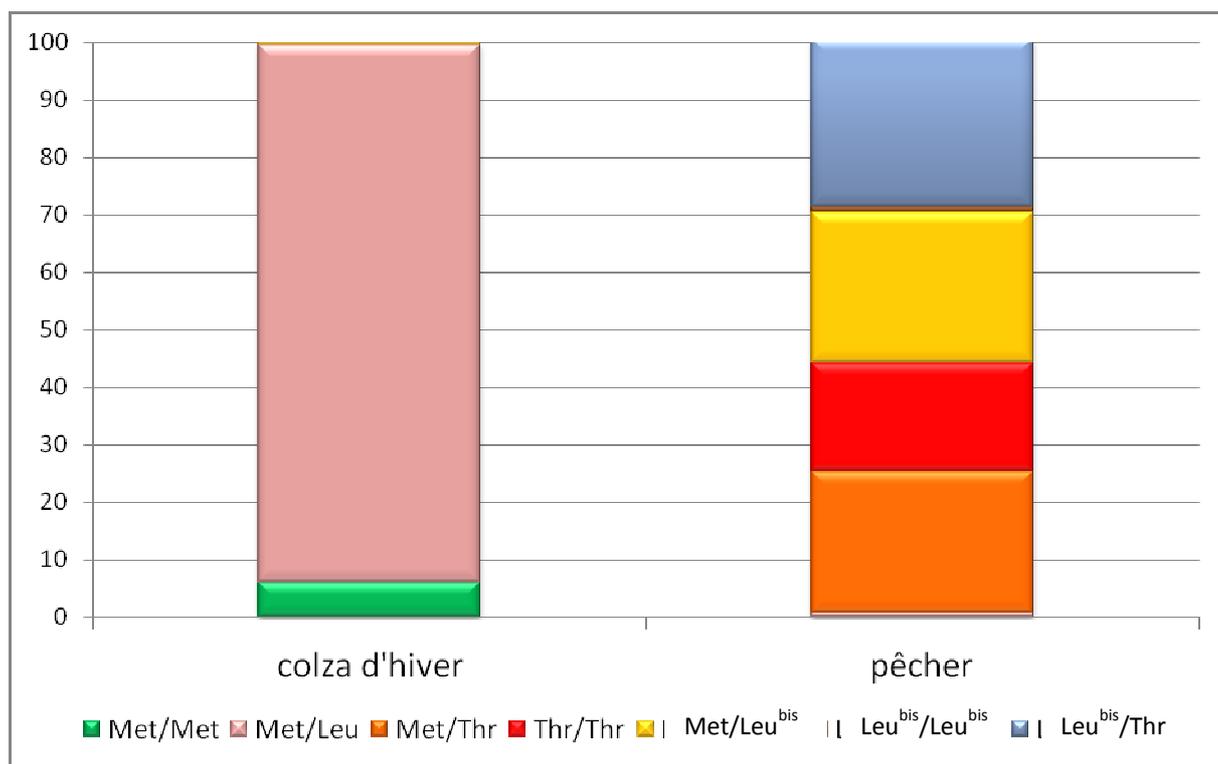


Pour les individus prélevés sur colza (parcelles de la moitié Nord et 2 parcelles en Midi-Pyrénées), trois génotypes sont détectés : le génotype sensible Met/Met, le génotype Met/Leu et le génotype Met/Leu^{bis}. Le génotype le plus fréquent est, sans conteste, Met/Leu présent en forte proportion dans toutes les parcelles analysées, quelle que soit la région. Une seule parcelle, située dans l'est de la région Midi-Pyrénées, présente un individu avec le génotype Met/Leu^{bis}. Quant aux individus sensibles Met/Met, ils ont été détectés dans seulement cinq parcelles de colza sur les 12 analysées et à des fréquences faibles voire très faibles (de 4 à 22 %).

Parmi les individus prélevés dans des parcelles de pêcher (cercle rouge carte), tous présentent au moins un allèle de résistance aux pyréthrinoïdes. Chez ces individus, trois allèles différents ont été détectés pouvant donc donner potentiellement neuf génotypes différents. Les analyses ont mis en évidence cinq génotypes (Met/Leu^{bis}; Leu^{bis}/Leu^{bis}; Leu^{bis}/Thr; Thr/Thr et Met/Thr). En Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte d'azur et dans le Gard, les individus présentent majoritairement les mutations Met/Thr, Thr/Thr, Leu^{bis}/Thr. Un seul individu du génotype Leu^{bis}/Leu^{bis} a été trouvé (dans une parcelle du Gard). Dans les deux parcelles des Pyrénées Orientales, tous les individus analysés sont Met/Leu^{bis}.

Figure 4 - Fréquences des différents génotypes pour le codon 918 en fonction des cultures

(Échantillon global de pucerons analysés : en parcelles de colza n = 244, en verger de pêcher n = 122)



La figure 4 met en évidence une plus grande diversité des génotypes (5) du codon 918 des pucerons sur hôte pêcher en comparaison avec celle observée sur les pucerons venant de l'hôte colza (3). De plus, les génotypes observés dans les populations provenant de ces deux hôtes sont totalement différents.

Ainsi pour les **pucerons provenant d'hôte colza**, le génotype Met/Leu (résistant) prédomine (près de 94 % des individus), seuls 6% des pucerons analysés sont Met/Met et donc sensibles aux pyréthriinoïdes. Le génotype Met/Leu^{bis}, non visible sur le graphique, représente 0,4% des génotypes trouvés sur colza.

Pour l'ensemble des parcelles de pêcher, les cinq génotypes rencontrés se répartissent comme suit : 0,8% sont Leu^{bis}/Leu^{bis}, 18,9% Thr/Thr, 24,6% Met/Thr, 26,2% sont Met/Leu^{bis}, et près de 29,5% sont Leu^{bis}/Thr.

IV. Conclusion

L'étude réalisée au cours de ces quatre mois avait pour but d'analyser la répartition des allèles de résistances aux pyréthriinoïdes et aux néonicotinoïdes dans des populations de pucerons *Myzus persicae* dans deux cultures hôtes : le colza et le pêcher. Ces analyses ont été réalisées *via* deux méthodes de détection de biologie moléculaire (dCAPS et qPCR).

Concernant les pyréthriinoïdes, la première chose à remarquer est l'ampleur qu'ont réussi à prendre les mutations sur le codon 918 sur tout le territoire français. En effet, la proportion de génotype sauvage sensible (Met/Met) au regard de tous les pucerons analysés, parcelles colza et pêcher confondues, est très faible (6% dans les populations issues de colza et 0% dans les populations de pêcher).

Pour les allèles de résistance aux pyréthriinoïdes trouvés dans les populations selon les cultures hôtes, les résultats montrent de grandes différences. En effet, sur colza, la résistance aux pyréthriinoïdes est très largement répandue dans les parcelles des différentes zones géographiques étudiées et cette résistance est due à un seul génotype hétérozygote (Met/Leu) à l'exception d'un seul puceron de Midi Pyrénées. Ce puceron a un génotype Met/Leu^{bis} qui, lui, est majoritaire sur les deux parcelles de pêcher analysées en Pyrénées Orientales (Languedoc Roussillon).

Sur pêcher, cinq autres génotypes sont présents. Un de ces génotypes est rare (Leu^{bis}/Leu^{bis}) car présent chez un seul individu. Les quatre autres génotypes sont répartis de façon diversifiée selon les régions étudiées (Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte-d'Azur et Languedoc-Roussillon).

Le fait qu'il existe une faible diversité des génotypes chez les pucerons issus du colza est très probablement en cohérence avec la reproduction majoritairement parthénogénétique observée sur colza et peut expliquer également le fort taux d'hétérozygotie. En effet, ce fort taux traduit la faible fréquence des événements de recombinaison (Delmotte *et al.*, 2002).

Inversement, la diversité des génotypes observés dans les populations issues du pêcher peut être reliée à la reproduction sexuée qui se déroule sur cet hôte.

Concernant les néonicotinoïdes, l'allèle de résistance recherché est présent dans toutes les populations de *M. persicae* prélevées sur pêcher. Très peu d'individus montrent un génotype sauvage (génotype Arg/Arg). La majorité des individus analysés s'avère être hétérozygote pour cet allèle. Le niveau de résistance chez ce type d'individu hétérozygote est moins élevé comparé au niveau de résistance des individus homozygotes (Cf résultats des tests biologiques – annexe 2) mais il pourrait être renforcé de façon plus ou moins importante par des mécanismes de résistance métabolique. De ce fait, l'efficacité réelle des traitements au terrain sur ces populations majoritairement hétérozygotes n'est pas clairement connue. Des tests biologiques réalisés en laboratoire par pulvérisation de thiamethoxam (Slater *et al.*, 2012), sur des populations provenant de parcelles de pêcher, ont montré que le niveau de résistance était associé à la fréquence des individus hétérozygotes et homozygotes pour la mutation R81T. Néanmoins, la fréquence allélique de la mutation R81T, voisine de 50% dans notre échantillonnage, indique qu'il existe une réserve importante de cet allèle de résistance dans les populations étudiées. Aussi, du fait de l'existence de recombinaisons génétiques avérées dans les populations vivant sur pêcher, il est évident que cette situation constitue un risque important et que ces réserves d'allèle muté peuvent conduire rapidement (notamment dans des conditions de pression de sélection) à l'augmentation du taux d'individus homozygotes dont la résistance élevée aux néonicotinoïdes est démontrée.

Pour les populations prélevées sur colza, le génotype sauvage (Arg/Arg) est dominant et il est même le seul génotype détecté. Ce constat est vrai dans les régions de grandes cultures du Nord et Nord Est de la France mais également sur deux parcelles situées en Midi Pyrénées,

dans le Lauragais, donc dans des situations moins éloignées des zones de production de pêcher que les parcelles du Nord de la France.

Bien que nos résultats se rapportent à un nombre limité de parcelles, les différences observées concernant les allèles de résistance (absence de mutation R81T chez les pucerons provenant du colza et grandes différences entre les mutations affectant le codon 918 selon la culture d'origine) peuvent paraître surprenantes pour des populations de ravageurs aussi polyphages. En effet, un brassage génétique assez important pourrait être observé, même entre les populations des différentes cultures hôtes. Or les populations analysées dans cette étude présentent de grandes différences dans leurs profils d'allèles de résistance aux néonicotinoïdes et aux pyréthrianoïdes, selon qu'elles sont issues de colza ou de pêcher et ce, même dans la zone du Sud de la France où les deux types de culture sont présentes. Cependant, la présence d'un puceron dans une parcelle de colza avec un génotype de résistance aux pyréthrianoïdes (Met/Leu^{bis}) trouvé normalement, dans notre étude, sur les pucerons venant du pêcher est un fait atypique qui pourrait soit être la résultante de migrations entre les cultures, soit constituer un événement indépendant. Il est important de noter que, pour cette parcelle, le génotype de deux individus n'a pas pu être clairement déterminé. Des analyses complémentaires vont être réalisées afin de déterminer ce génotype inédit. Ce « nouveau » génotype pourrait être dû, soit à une mutation en serine de la méthionine présente en position 918 (génotype Met/Ser), soit à une nouvelle association de deux allèles de résistance déjà bien identifiés. Ces deux allèles seraient d'une part l'allèle muté avec une thréonine en position 918, présent dans la population de *Myzus* vivant sur colza et, d'autre part, l'allèle muté avec une leucine^{bis} largement répandu dans nos échantillons provenant de pêcher.

La différence observée concernant la résistance aux néonicotinoïdes peut s'expliquer par le fait que la pression de sélection est très différente entre les deux cultures. En effet, les traitements avec des néonicotinoïdes n'ont pas été autorisés en même temps sur colza et pêcher. De plus, les néonicotinoïdes sont plus utilisés (2 à 3 applications par an) sur pêcher et depuis bien plus longtemps que sur colza (culture sur laquelle les néonicotinoïdes sont autorisés uniquement depuis 3 ans) (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>). Mais dans ce contexte de pression de sélection différente, les résultats obtenus semblent également suggérer que les migrations entre pêcher et colza pourraient être peu fréquentes dans le cycle biologique de *M. persicae*.

Aussi, pour une meilleure compréhension de l'ensemble des données observées dans ce travail et dans le but de mieux cerner les flux génétiques entre les populations, il serait particulièrement judicieux de réaliser des études sur des marqueurs génétiques neutres (microsatellites) et non sur des marqueurs sélectionnés comme le sont les allèles de résistance.

En conclusion, cette étude montre une situation inquiétante pour la lutte contre *Myzus persicae* en culture de pêcher compte tenu des fréquences alléliques élevées des allèles de résistance à ces deux familles majeures de la lutte chimique contre ce puceron : les pyréthrianoïdes et les néonicotinoïdes.

V. Bibliographie

- Bass C., Puinean AM., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul VL., Crossthaite AJ., Denholm I., Field LM., Foster SP., Lind R., Williamson MS., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*, BMC Neuroscience. 12:51
- Delmotte, F., N. Leterme, et al. (2002). Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. Molecular Ecology 11(4): 711-723.
- Fontaine S., Caddoux L., Brazier C., Bertho C., Bertolla P., Micoud A. and Roy L., 2011. Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. Pest Manag Sci. 67 (8) : 881-885.
- Slater R., Paul VL., Andrews M., Garbay M., Camblin P., 2012. Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain, Pest Management Science. 68 : 634-638



ANNEXE 1 : proportion de génotypes (en pourcentage) mis en évidence
pour le codon s-kdr du canal sodium
et pour le codon 81 de la sous unité β du récepteur nicotinique
dans chaque population analysée.

culture	référence Anses	Region	Département	génotypes pour le codon SKDR 918 du canal sodium							génotypes pour le codon 81				
				Leubis/Leubis	Leubis/Thr	Met/Leu	Met/Leubis	Met/Met	Met/Thr	Thr/Thr	N	Arg/Arg	Arg/Thr	Thr/Thr	N
colza	11-517	Alsace	68	0,0	0,0	78,6	0,0	21,4	0,0	0,0	28	100,0	0,0	0,0	27
colza	11-519	Centre	45	0,0	0,0	78,9	0,0	21,1	0,0	0,0	19	100,0	0,0	0,0	20
colza	11-483	Champagne-Ardenne	51	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25	100,0	0,0	0,0	21
colza	11-520	Champagne-Ardenne	51	0,0	0,0	89,7	0,0	10,3	0,0	0,0	29	100,0	0,0	0,0	30
colza	11-521	Champagne-Ardenne	51	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25	100,0	0,0	0,0	24
colza	11-522	Champagne-Ardenne	51	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26	100,0	0,0	0,0	21
colza	11-506	Ile-De-France	78	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13	100,0	0,0	0,0	9
colza	11-511	Ile-De-France	78	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27	100,0	0,0	0,0	27
colza	11-518	Midi-Pyrénées	31	0,0	0,0	92,6	3,7	3,7	0,0	0,0	27	100,0	0,0	0,0	24
colza	11-523	Midi-Pyrénées	31	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8	100,0	0,0	0,0	6
colza	11-513	Pays De La Loire	44	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5	100,0	0,0	0,0	5
colza	11-507	Picardie	60	0,0	0,0	91,7	0,0	8,3	0,0	0,0	12	100,0	0,0	0,0	11
pêcher	11-039	Languedoc-Roussillon	66	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	18	0,0	5,0	95,0	20
pêcher	11-060	Languedoc-Roussillon	66	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	9	22,2	44,4	33,3	9
pêcher	11-062	Languedoc-Roussillon	30	12,5	25,0	0,0	0,0	0,0	12,5	50,0	8	37,5	62,5	0,0	8
pêcher	11-036	Provence-Alpes-Côte d'Azur	13	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	33,3	33,3	21	55,6	44,4	0,0	18
pêcher	11-037	Provence-Alpes-Côte d'Azur	13	0,0	40,0	0,0	12,0	0,0	32,0	16,0	25	60,9	34,8	4,3	23
pêcher	12-067	Rhône-Alpes	26	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	37,5	37,5	16	6,2	67,7	26,2	65
pêcher	12-068	Rhône-Alpes	26	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	12	0,0	76,5	23,5	17
pêcher	12-069	Rhône-Alpes	26	0,0	30,8	0,0	15,4	0,0	38,5	15,4	13	64,3	35,7	0,0	14

ANNEXE 2 : Résultats des tests biologiques sur *Myzus persicae* par ingestion de milieu nutritif amendé en insecticide

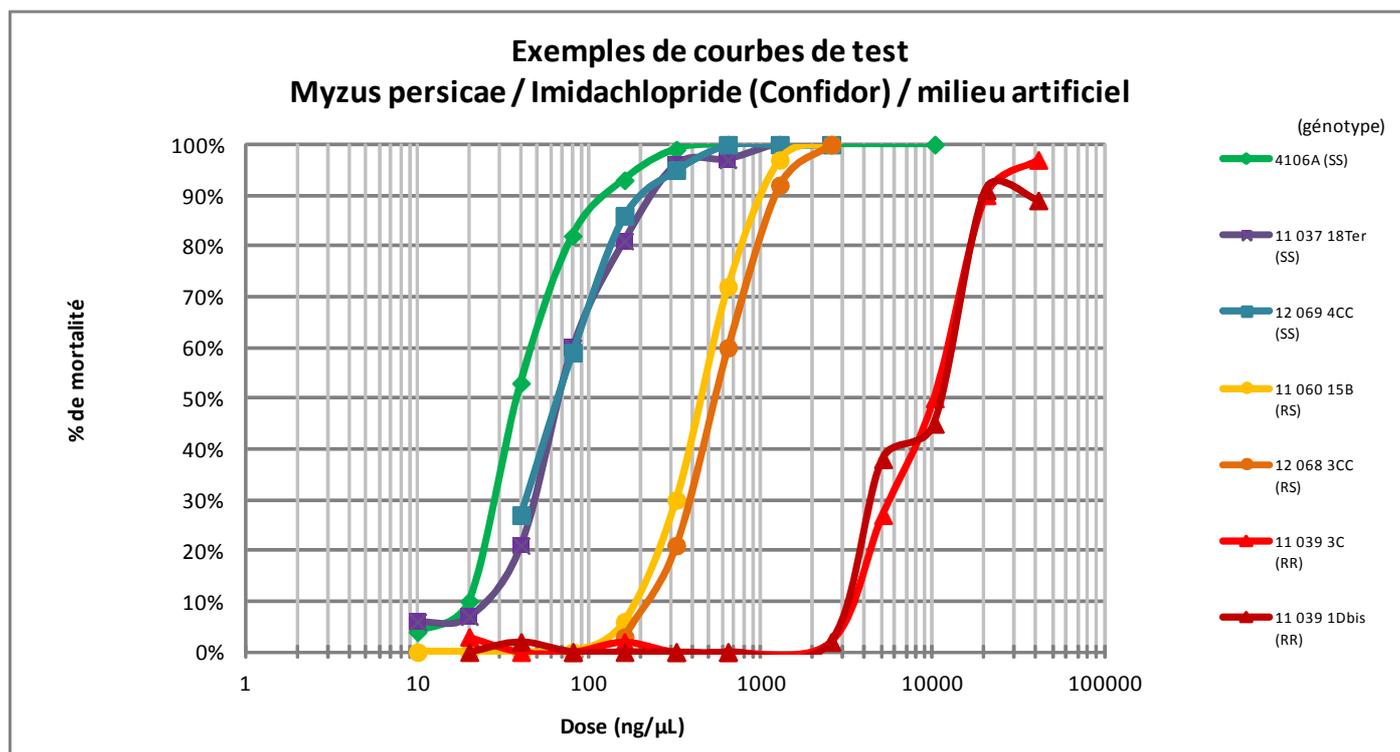


Figure 1 : Pourcentage de mortalité en fonction de la dose de Confidor (imidachlopride) pour des clones de différents génotypes :

- **Référence sensible de laboratoire** : clone **4106A**,
- **SS** (sensible pour la mutation R81T = génotype **Arg/Arg**) : clones 11-037 18ter et 12-069 4CC
- **RS** (hétérozygote pour la mutation R81T = génotype **Arg/Thr**) : clones 11-060 15B et 12-068 3CC
- **RR** (homozygote pour la mutation R81T = génotype **Thr/Thr**) : clones 11-039 3C et 11-039 1Dbis

Les tests biologiques de résistance aux néonicotinoïdes présentés ici ont d'abord porté sur l'imidachlopride (ils seront, dans un deuxième temps, étendus au thiaclopride et au thiaméthoxam). Ils ont été effectués sur des clones provenant de prélèvements réalisés en 2011 et 2012 dans des parcelles de pêcher. Les pucerons ont été élevés et multipliés en clones sur chou chinois.

Les tests ont consisté à évaluer la mortalité de larves de stade L1, 48h après leur installation sur milieu nutritif liquide amendé (à 5%) avec l'insecticide (imidachlopride, Confidor) en gamme de doses (d'après une méthode développée par Rahbé et Febvay, 1993).

Plusieurs tests ont été réalisés pour chaque clone avec, à chaque date, deux répétitions d'au minimum 15 larves par dose d'insecticide.



ANNEXE 3 : provenance des parcelles analysées

Référence Anses de l'échantillon	Référence expéditeur	Origine géographique	Année d'échantillonnage	Région	Correspondant	Code postal	Espèce Végétale
11-517	DUPONT-AI-68	Nambsheim	2011	Alsace	Bass Charlotte	68740	colza d'hiver
11-519	N.R.	Chuelles	2011	Centre	Ouy Myriam	45220	colza d'hiver
11-483	CETIOM-CA-3/10-THIBIE	Thibie	2011	Champagne-Ardennes	Ruck Laurent	51510	colza d'hiver
11-520	N.R.	Petites Loges	2011	Champagne-Ardennes	Marizy Christian	51400	colza d'hiver
11-521	N.R.	Petites Loges	2011	Champagne-Ardennes	Marizy Christian	51400	colza d'hiver
11-522	N.R.	Petites Loges	2011	Champagne-Ardennes	Marizy Christian	51400	colza d'hiver
11-506	Chambre d'agriculture IDF - Yvelines	Maulette	2011	Ile-De-France	Huguet Bertrand	78550	colza d'hiver
11-511	SRAL-IDF-78-02	Saint Martin de Brethencourt	2011	Ile-De-France	Huguet Bertrand	78660	colza d'hiver
11-518	CETIOM-MP-31-01	Mourvilles-Basse	2011	Midi-Pyrénées	Hebrail	31460	colza d'hiver
11-523	CETIOM-MP-31-02	Nailloux	2011	Midi-Pyrénées	Hebrail	31560	colza d'hiver
11-513	N.R.	Mesanger	2011	Pays De La Loire		44522	colza d'hiver
11-507	SYNGENTA	Froissy	2011	Picardie	Dewamin Nathalie	60480	colza d'hiver
11-039	N.R.	Saint-Félieu-d'Avall	2011	Languedoc-Roussillon	Gaizzia F.	66170	pêcher
11-060	DRAAF-SRAL-LR 03	Prades	2011	Languedoc-Roussillon	Sanquer Emmanuel	66500	pêcher
11-062	DRAAF-SRAL-LR-01	Beauvoisin	2011	Languedoc-Roussillon	Sanquer Emmanuel	30640	pêcher
11-036	SRAL PACA 10/01	Fos-Sur-Mer	2011	Provence-Alpes Côte d'Azur	Rouillé Bernard	13270	pêcher
11-037	SRAL PACA 13/02	Saint-Martin de Crau	2011	Provence-Alpes Côte d'Azur	Rouillé Bernard	13310	pêcher
12-067	ANSES 12-067	Ioriol	2012	Rhône-Alpes	ANSES Lyon	26270	pêcher
12-068	ANSES 12-068	La Roche-de-Glun	2012	Rhône-Alpes	ANSES Lyon	26271	pêcher
12-069	ANSES 12-069	La Roche-de-Glun	2012	Rhône-Alpes	ANSES Lyon	26271	pêcher

N.R. : Non renseigné