N°d'ordre NNT : 2025ISAL0061

THESE de DOCTORAT DE L'INSA LYON,

membre de l'Université de Lyon

Ecole Doctorale N° 341

Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité / discipline de doctorat :

Biologie Evolutive, Biologie des Populations, Ecophysiologie

Soutenue publiquement le 07/07/2025, par :

Séverine Fontaine

Développement d'outils moléculaires de détection des résistances aux produits de protection des plantes et leurs utilisations en surveillance

Devant le jury composé de :

Le-Goff, Gaëlle	Chargée de Recherche INRAE, Sophia Antipolis	Rapporteure
Raymond, Valérie	Professeur des Universités Université d'Angers	Rapporteure
Walker, Anne-Sophie	Chargée de Recherche INRAE, Paris-Saclay	Rapporteure
Da Silva, Pedro	Professeur des Universités INSA, Lyon	Président
Mouton, Laurence	Maître de Conférences UCBL, Lyon	Examinatrice
Calevro Federica	Directrice de Recherche INSA, Lyon	Directrice de Thèse
Barrès Benoît	Chargé de Recherche ANSES, Lyon	Encadrant des travaux, Invité

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
ED 206 CHIMIE	**CHIMIE DE LYON** https://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bâtiment Blaise PASCAL 7, Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne CEDEX secretariat@edchimie-lyon.fr	**M. Stéphane DANIELE** C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69616 Villeurbanne CEDEX directeur@edchimie-lyon.fr
ED 341 E2M2	**ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION** http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Bénédicte LANZA Bâtiment Atrium, 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	**Mme Sandrine CHARLES** Université Claude Bernard Lyon 1 UFR Biosciences, Bâtiment Mendel 43, Boulevard Du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne CEDEX e2m2.codir@listes.univ-lyon1
ED 205 EDISS	**INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ** http://ediss.universite-lyon.fr Sec. : Bénédicte LANZA Bâtiment Atrium, Université Claude Bernard Lyon 1 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	**M. Jérôme LAMARTINE** Université Claude Bernard Lyon 1 Equipe Intégrité Fonctionnelle du Tissu Cutané LBTI - UMR5305 CNRS IBCP - 7 passage du Vercors, 69367 Lyon CEDEX 07 Tel : 04.72.72.26.66 jerome.lamartine@univ-lyon1.fr
ED 34 EDML	**MATÉRIAUX DE LYON** http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.51 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	**M. Stéphane BENAYOUN** Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 Avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 stephane.benayoun@ec-lyon.fr
ED 160 EEA	**ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE** https://edeea.universite-lyon.fr Sec. : Philomène TRECOURT Bâtiment Charlotte PERRIAND, 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	**M. Philippe DELACHARTRE** INSA LYON Laboratoire CREATIS, Bâtiment Blaise Pascal, 7 Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 philippe.delachartre@insa-lyon.fr
ED 512 INFOMATHS	**INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES** http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bâtiment Blaise PASCAL 7, Avenue Jean CAPELLE, 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	**M. Dragos IFTIMIE** Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Braconnier 21 Avenue Claude BERNARD, 69 622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.44.79.58 direction.infomaths@listes.univ-lyon1.fr
ED 162 MEGA	**MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE** http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Philomène TRECOURT Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Charlotte PERRIAND, 69621 Villeurbanne CEDEX mega@insa-lyon.fr	**M. Etienne PARIZET** INSA Lyon Laboratoire LVA Bâtiment St. Exupéry 25 bis Avenue Jean CAPELLE, 69621 Villeurbanne CEDEX etienne.parizet@insa-lyon.fr
ED 483 ScSo	**ScSo**[1] https://edsciencessociales.universite-lyon.fr Sec. : Mélina FAVETON Tél : 04.78.69.72.76 Université Lyon 2 Campus Berges du Rhône, Bureau BEL 309 18, Quai Claude BERNARD, 69365 LYON CEDEX 07 melina.faveton@univ-lyon2.fr	**M. Bruno MILLY** Université Lyon 2 Campus Berges du Rhône Bureau BEL 204 18, Quai Claude BERNARD 69365 LYON CEDEX 07 bruno.milly@univ-lyon2.fr

[1] ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

RESUME

La résistance aux produits de protection des plantes (PPP) est définie comme la capacité héritable d'un bioagresseur des cultures (insecte ravageur, champignon phytopathogène ou adventice) à survivre à une dose létale de produit correctement appliqué. C'est un phénomène micro-évolutif en réponse à une pression de sélection exercée par l'activité humaine. La surveillance et l'étude des résistances aux PPP ont pour ambition une détection la plus précoce possible des individus résistants, leur suivi spatio-temporel et la caractérisation du ou des mécanisme(s) biologique(s) impliqué(s) dans ce phénomène. Ces études passent par l'analyse en laboratoire d'individus issus du terrain à l'aide de diverses approches analytiques telles que des tests biologiques de sensibilité aux PPP et l'utilisation d'outils de biologie moléculaire.

À travers mes travaux, je discuterai des opportunités offertes par le développement d'outils de biologie moléculaire traditionnels et de nouvelle génération dans la détection, la surveillance et la caractérisation des phénomènes de résistance aux PPP. Mes études portent notamment sur trois bioagresseurs majeurs qui ont démontré de fortes capacités d'adaptations par l'évolution de résistances à de nombreux PPP : *Venturia inaequalis*, l'agent de la tavelure du pommier, *Plasmopara viticola*, l'agent du mildiou de la vigne et *Myzus persicae*, un puceron dommageable pour de nombreuses cultures.

La complémentarité des analyses par biologie moléculaire et par tests biologiques sera illustrée par l'étude et le suivi des résistances à des fongicides chez deux biotrophes obligatoires : *V. inaequalis* et *P. viticola.* L'ensemble des approches analytiques déployées ont permis d'identifier les mutations impliquées dans des résistances de cible à des inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire et de suspecter l'existence de résistances non liées à la cible. Cela a également permis de montrer que les méthodes moléculaires permettent de s'affranchir des biais induits par l'adaptation au laboratoire des populations lors de leur multiplication.

L'intérêt de l'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour la caractérisation génotypique liée aux modifications des protéines cibles de familles d'insecticides neurotoxiques sera illustré à travers mes travaux sur le modèle *M. persicae*. Ces travaux ont permis d'identifier l'omniprésence d'un génotype combinant une résistance aux carbamates et aux pyréthrinoïdes dans les populations vivant sur colza. Nous avons également pu démontrer le caractère semi-récessif de la résistance de cible aux néonicotinoïdes.

La diversité des populations de bioagresseurs et la complexité des bases génétiques des mécanismes de résistance vis-à-vis des PPP sont deux défis majeurs pour la surveillance des résistances. Les approches de séquençage à haut débit apportent de nouvelles opportunités de multiplexage aussi bien en termes de populations qu'en termes de nombre de gènes ciblés. La contribution de ces techniques dans la surveillance des résistances aux PPP sera présentée et discutée à travers deux cas d'études portant sur des résistances liées à la modification de la cible impliquant divers loci : une adventice, *Ambrosia artemisiifolia,* et un agent phytopathogène de la betterave, *Cercospora beticola.*

Les défis à relever pour la caractérisation, la surveillance et la compréhension des dynamiques évolutives en œuvre chez ces mécanismes de résistance sont également discutés. Dans un contexte européen où le nombre de substances actives approuvées devrait continuer à diminuer en raison de profils toxicologiques et écotoxicologiques défavorables, la gestion des résistances aux PPP restants sera un des enjeux clefs dans la lutte contre les bioagresseurs des plantes. Les outils moléculaires seront certainement essentiels pour l'élaboration des futures stratégies anti-résistances aux PPP.

Mots-Clés : Bioagresseurs, Cultures, Produits de protection des plantes, Mécanismes de résistance, Bases génétiques, Diagnostic

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

ABSTRACT

Resistance to plant protection products (PPPs) is defined as the heritable capacity of a crop pest (insect pest, phytopathogenic fungus or weed) to survive a lethal dose of a product applied correctly. It is a micro-evolutionary phenomenon in response to selection pressure exerted by human activity. The aim of monitoring and studying resistance to PPPs is to detect resistant individuals as early as possible, monitor them over time and space and characterize the biological mechanism(s) involved. These studies involve the laboratory analysis of individuals from the field, using various analytical approaches such as biological tests to assess the sensitivity to PPPs and the use of molecular biology tools.

Through my work, I will discuss the opportunities offered by the development of traditional and new-generation molecular biology tools for detecting, monitoring and characterizing PPP resistances. My studies focus in particular on three major pests that have demonstrated a strong capacity for adaptation through the successive evolution of resistance to numerous PPPs: *Venturia inaequalis*, the apple scab agent, *Plasmopara viticola*, the grapevine downy mildew agent, and *Myzus persicae*, an aphid that causes damage to various crops.

The complementary nature of molecular biology analyses and biological tests will be established through the study and monitoring of fungicide resistance in two obligate biotrophs: *V. inaequalis* and *P. viticola*. All the analytical approaches deployed have allowed the identification of mutations involved in target-site resistance to fungicides belonging to the complex III inhibitors of the cellular respiration family and to assume the existence of non-target-site resistance mechanisms. Our work has also shown that molecular methods can overcome the biases induced by the adaptation of populations to laboratory conditions during the multiplication steps often required for biological assays.

The purpose of using molecular biology tools for genotypic characterization linked to changes in the target proteins of neurotoxic insecticide families will be illustrated through work done on *M. persicae*. Our work has enabled us to identify the ubiquity of a genotype combining resistance to carbamates and pyrethroids in oilseed rape populations. The semi-recessive level of the allele involved in target-site resistance to neonicotinoids was also demonstrated.

The diversity of pest populations and the complexity of the genetic basis of PPP resistance mechanisms represent two major challenges for resistance monitoring. High-throughput sequencing approaches offer new opportunities for multiplexing, both in terms of populations and the number of genes targeted. The contribution of these techniques to the monitoring of PPP resistance will be presented and discussed through two case studies of target-modification resistance involving various loci: a weed, *Ambrosia artemisiifolia*, and a beet plant pathogen, *Cercospora beticola*.

The challenges involved in characterizing, monitoring and understanding the evolutionary dynamics at work in these resistance mechanisms are also discussed. In a European context where the number of approved active substances is set to continue falling due to adverse toxicological and ecotoxicological profiles, managing resistance to the remaining PPPs will be one of the key challenges in the control of plant pests. Molecular tools will certainly play a key role in the development of future PPP resistance strategies.

Keywords: Crop pests, Crop production, Plant protection products, Resistance mechanisms, Genetic markers, Diagnostic

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Federica Calevro qui, sans me connaître, a spontanément accepté d'être ma directrice de thèse dans le cadre bien particulier d'une Valorisation des Acquis d'Expériences. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour son accompagnement bienveillant et ses encouragements dans cette aventure. J'espère avoir réussi à prendre en compte l'ensemble de ses conseils pour améliorer ce manuscrit et avoir été à la hauteur de l'investissement qu'elle m'a consacré.

Je tiens également à remercier grandement Benoît Barrès qui m'a fait confiance et m'a soutenue dans cette démarche. Je lui suis reconnaissante de sa disponibilité pour me conseiller et m'apporter un regard critique et constructif au cours de la réalisation de ce travail. Cet accompagnement désintéressé a contribué à bonifier ce manuscrit.

Mes remerciements vont ensuite à l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci à Pedro Da Silva d'avoir accepté la présidence de ce jury, à Gaëlle Le-Goff, Valérie Raymond et Anne-Sophie Walker d'avoir bien voulu être les rapporteures de cette thèse et à Laurence Mouton d'avoir accepté le rôle d'examinatrice.

Je tiens également à remercier l'Anses pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en VAE dans le cadre de ma formation professionnelle.

Les travaux présentés dans ces pages sont les résultats d'études menées avec de nombreuses personnes sur plus de quinze ans. Il me sera difficile de faire part à tous de ma reconnaissance sans en oublier et j'en suis désolée. Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai publié, les membres actuels de l'unité CASPER mais également ceux qui ont participé de près ou de loin à ces travaux et qui sont partis vers d'autres aventures : Christine Brazier, Lise Roy, Lucile Blouquy, Mickaël Leguellec et Annie Micoud. Un très grand merci plus particulièrement à Laetitia Caddoux pour son travail de qualité, son sérieux, son dynamisme et sa bonne humeur qui m'accompagnent depuis plus de quinze ans. Sans son implication les travaux présentés ici ne seraient pas les mêmes. Merci également aux étudiants qui ont participé à la réalisation de ces travaux, leur présence bien que temporaire a été essentielle à l'avancement des études.

Merci aux personnes de l'Anses Lyon qui font que le laboratoire est aussi un lieu d'échanges enrichissants et de convivialité : Charlotte, Christian, Claire A, Eric, Laetitia D, Jean Luc, Nadine, Pauline et les équipes AVB & Mycoplasme pour la sereine coactivité dans les labos ainsi que les invitations à leur pause-café agrémentée de « quelques » pâtisseries.

Pour leur amical soutien, je tiens à remercier Corinne et Pierre et toute ma reconnaissance à ce dernier pour son précieux appui technique lors des dysfonctionnements des Qiaxcels ou autres appareils d'analyses parfois capricieux…

Merci à mes parents pour leur soutien infaillible qui m'a été si précieux pour résister aux tempêtes de la vie. Un très grand merci à Baptiste et à mes enfants, Mathilde, Eloi & Abel, pour tout ce que vous m'apportez.

…à Marcelle et Camille

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés ici ont été conduits au Service Régional de la Protection des Végétaux de Rhône-Alpes puis au laboratoire Anses de Lyon dans l'USC CASPER.

Conformément aux directives de l'INSA de Lyon, pour la réalisation d'une thèse dans le cadre d'une Valorisation des Acquis d'Expériences, ce mémoire de doctorat se divise en deux parties distinctes :

- une première partie, située page 11, est consacrée à la présentation et à l'analyse de mon parcours professionnel.
- une seconde partie, située page 37, est consacrée à la présentation et à l'analyse de travaux de recherche déjà accomplis.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

SOMMAIRE

PARTIE I : DESCRIPTION & ANALYSE DU PARCOURS PROFESSIONNEL 11

MON PARCOURS PROFESSIONNEL 12

1. Ingénieur d'études au laboratoire du Service Régional de la Protection des Végétaux 12
2. Chargée d'expertises scientifiques et techniques au Laboratoire Anses de Lyon 14
2.1. Description de mes activités de référence 14
2.2. Description de mes activités de recherche 15
2.3. Autres activités 16

ANALYSE DE MON PARCOURS PROFESSIONNEL 22

1. Compétences et expertises scientifiques et techniques 22
2. Compétences transverses 25

CONCLUSION 26

ANNEXES - PARCOURS PROFESSIONNEL 27

PARTIE II : PRESENTATION ET ANALYSE DES RECHERCHES ACCOMPLIES 37

ELEMENTS DE CONTEXTE 38

INTRODUCTION 46

1. L'origine de la résistance 47
1.1. Les théories évolutives sur les résistances aux PPP 47
1.2. Résistances dites naturelles 50
1.3. Transferts inter-espèces 51

2. Evolution de la résistance aux produits de protection des plantes 51
2.1. Facteurs liés aux caractéristiques biologiques du bioagresseur 52
2.2. Facteurs liés aux bases génétiques de la résistance 53
2.3. Facteurs liés aux PPP et à leur application 56

3. Les mécanismes de résistance aux produits de protection des plantes 57
3.1. Résistances liées à une modification de la cible 57
3.2. Résistances non liées à une modification de la cible 59
3.3. Résistances croisées, Résistances multiples 65

4. L'étude des résistances au laboratoire 66
4.1. Les tests biologiques 66
4.2. Les approches biochimiques 71
4.3. Les principales approches de biologie moléculaire 73

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

PRESENTATION DES TRAVAUX **87**

1. Quelles contributions apportent les outils de biologie moléculaire à la détection et au suivi des résistances ? **87**
1.1. Premier article : “Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays” 93
1.2. Deuxième article : “Investigation of the sensitivity of *Plasmopara viticol*a to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools” 101

2. Quelles sont les contributions des connaissances issues de la caractérisation des mécanismes sous- jacents aux phénomènes de résistance aux PPP pour la mise en œuvre de mesures de gestion ? **110**
2.1. Premier article : “Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops” 113
2.2. Deuxième article : “Assessment of the dominance level of the R81T target resistance to two neonicotinoid insecticides in *Myzus persicae* (*Hemiptera* : *Aphididae*)” 118

3. Quelles perspectives et opportunités sont offertes par les techniques de séquençage à haut débit dans le cadre de la surveillance des résistances aux PPP ? **126**
3.1. Premier article : “A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia L*.)” 131
3.2. Deuxième article : Détection et quantification, à l’aide d’outils de séquençage à haut débit, d’allèles impliqués dans la résistance aux fongicides chez l’agent de la cercosporiose de la betterave (*Cercospora beticola*) 144

DISCUSSION GENERALE **146**

PERSPECTIVES DE RECHERCHE **155**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **157**

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES FIGURES

PARTIE 1 : DESCRIPTION & ANALYSE DU PARCOURS PROFESSIONNEL

Figure 1 : Représentation de mon parcours professionnel……12

Figure 2 : Différents visuels de l'application Prosper permettant l'enregistrement dans une base de données des prélèvements et des analyses réalisés dans l'unité CASPER……..17

Figure 3 : Les différentes entités de l'Anses concernées par la problématique des résistances et appartenant au réseau RésisTrans……..19

Figure 4 : Visuel du sommaire de la 1ière newsletter du réseau ResisTrans……20

Figure 5 : Localisation des différentes unités ou laboratoires du réseau R4P……21

Figure 6 : Photos de la fête de la science à l'ENS et de fiches explicatives préparées pour les élèves de l'atelier……22

Figure 7 : Synthèse des compétences acquises et développées au cours de mon parcours professionnel ……..25

PARTIE 2 : PRESENTATION ET ANALYSE DES RECHERCHES ACCOMPLIES

Figure 1 : Evolution des rendements de 4 grandes cultures vivrières depuis 1960…… 38

Figure 2 : Évolution du nombre de cas répertoriés de résistances aux insecticides (en noir), herbicides (en bleu) et fongicides (en rouge) de 1920 à 2010……41

Figure 3 : Représentation schématique de l'évolution de la résistance à un produit de protection des plantes……46

Figure 4 : Représentation des théories sur l'évolution des résistances aux PPP……..49

Figure 5 : Evolution de la distribution de la sensibilité initiale (A) d'une population vis-à-vis d'un PPP dans le cas d'une résistance quantitative (B) et qualitative (C)……54

Figure 6 : Simulation de l'évolution de la fréquence d'un allèle de résistance en fonction du nombre de générations et selon deux scénarii de dominance chez l'agent vectoriel de la dengue, *Aedes aegypti*……55

Figure 7 : Principaux facteurs pouvant influencer la dynamique d'évolution de la résistance à un PPP dans les populations de bioagresseurs des cultures……..57

Figure 8 : Représentation schématique des mécanismes de résistance liés à une modification de la cible……59

Figure 9 : Structure générale typique des transporteurs ABC avec deux domaines transmembranaires (TMD1 et 2) et deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD), *i.e.* domaine de liaison à l'ATP……61

Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes de la résistance liée à une métabolisation accrue du PPP……63

Figure 11 : Exemple de courbe dose réponse pour A. la mesure de la mortalité ou B. d'une inhibition d'un trait phénotypique en fonction d'une dose de pesticide……67

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 12 : Principes des tests de résistance aux fongicides les plus courants pour les champignons et oomycètes phytopathogènes……..69

Figure 13 : Exemples des principaux modes d'application pour les tests de résistance aux insecticides……..70

Figure 14 : Principe général d'un test de résistance à un herbicide A. sur plantes entières ou B. sur semences pré-germées……..71

Figure 15 : Principe de la méthode LAMP basée sur la synthèse d'ADN en condition isotherme à l'aide d'une polymérase Bst (*Bacillus stearothermophilus*)……..75

Figure 16 : Exemple de résultats d'analyse HRM en vue de détecter des polymorphismes en position 412 dans le gène de la protéine Erg27 impliqué dans la résistance au fenhexamid chez l'agent de la pourriture grise, *B. cinerea*……77

Figure 17 : Evolution du coût en dollars du séquençage d'une mégabase depuis 2001…..79

Figure 18 : Représentation de la réaction lors d'un pyroséquençage……81

Figure 19 : Principales étapes du séquençage avec la technologie Illumina……83

Figure 20 : Principales étapes du séquençage Ion torrent……84

Figure 21 : Principe du séquençage par nanopores avec un MinION……86

Figure 22 : Représentation de la chaine respiratoire avec les différents complexes……89

Figure 23 : Chronologie de l'évolution des résistances aux différentes familles d'insecticides chez *M. persicae*……111

Figure 25 : Exemple de cultures colonisées par l'ambroisie à feuille d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia)*……127

Figure 26 : En rouge les positions des différents codons impliqués et suspectés d'être impliqués dans une perte de sensibilité aux herbicides inhibiteurs de l'ALS……128

Figure 27 : En rouge positions des différents codons impliqués dans la résistance aux : A- QoI, B- benzimidazoles, C- IDM……..129

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE 2 : PRESENTATION ET ANALYSE DES RECHERCHES ACCOMPLIES

Tableau 1 : Cas et délais d'émergence des résistances vis-à-vis de différents PPP chez deux bioagresseurs majeurs en pomiculture, *Venturia inaequalis* et *Cydia pomonella*……..42

Tableau 2 : Constantes inhibitrices (ki) obtenues pour différentes molécules herbicides inhibitrices de l'acétohydroxyacide synthase A (AHAS) chez différentes souches d'*Arabidopsis thaliana* mutées pour le gène de l'acétohydroxyacide synthase……58

Tableau 3 : Mécanismes de résistance et mutations affectant le cytochrome b connues en 2024 chez *P. viticola* et *V. inaequalis* ainsi que leur impact sur la sensibilité aux différents fongicides inhibiteurs du complexe III commercialisés……90

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

PARTIE I

DESCRIPTION & ANALYSE

DU PARCOURS PROFESSIONNEL

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Dans cette première partie, je présenterai mon parcours professionnel qui est décrit succinctement dans le curriculum vitae situé en annexe. Les principales étapes de ce parcours sont illustrées dans la Figure 1 ci-dessous. Dans une seconde partie, j'analyserai en quoi ce parcours m'a permis de renforcer, de développer et d'acquérir les compétences attendues dans le cadre d'un doctorat.

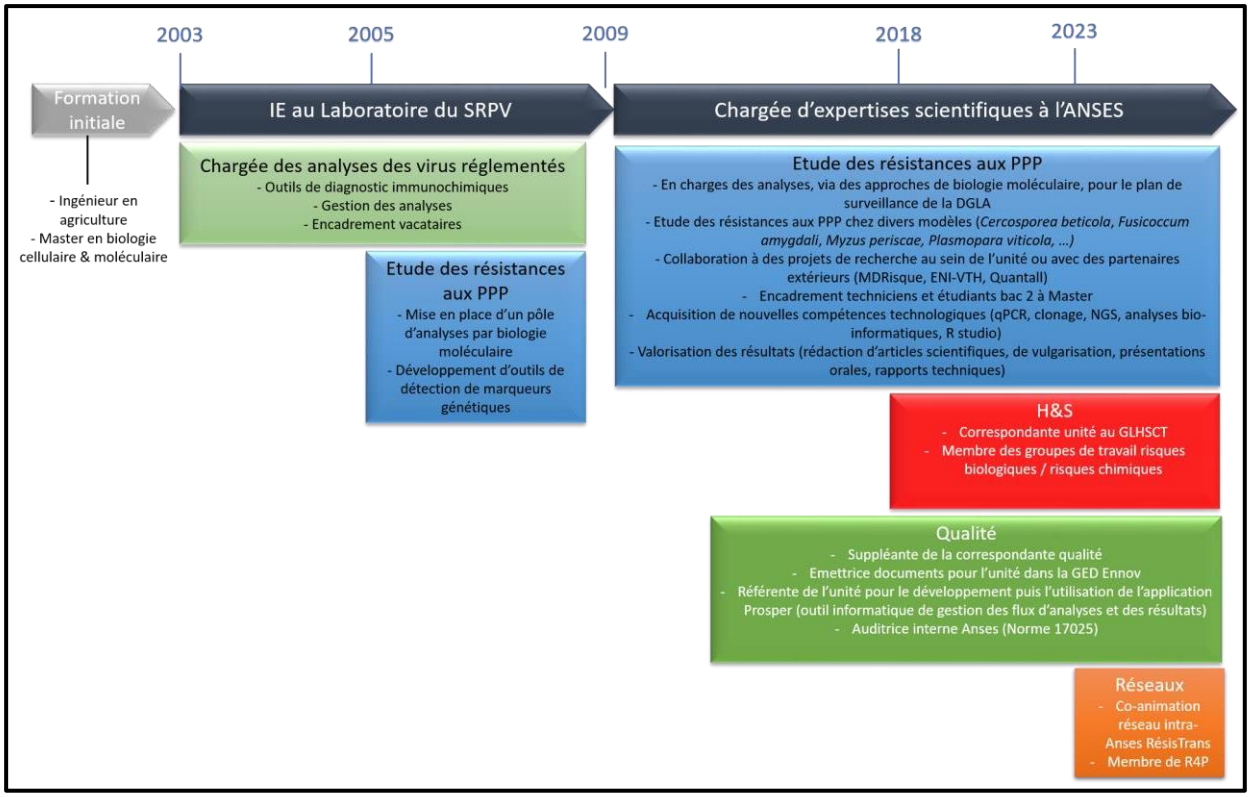


Figure 1 : Représentation de mon parcours professionnel

MON PARCOURS PROFESSIONNEL

1. Ingénieur d'études au laboratoire du Service Régional de la Protection des Végétaux

A l'issue de mes études d'ingénieur en agriculture complétées par un master en biologie cellulaire et moléculaire, j'ai été recrutée en 2003 au laboratoire régional du Service de la Protection des Végétaux (SRPV), qui était alors sous la Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt (DRAF) de Rhône-Alpes. Initialement, j'ai eu en charge la réalisation des analyses pour la recherche de virus et de phytoplasmes réglementés à l'aide de techniques immunochimiques, sous la responsabilité d'Annie Micoud, la directrice du laboratoire. Les organismes règlementés regroupent les virus et phytoplasmes de

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

quarantaine dont la lutte est obligatoire de tout temps et en tous lieux, et les virus et phytoplasmes réglementés non de quarantaine pour lesquels la lutte est obligatoire selon le végétal atteint. Pour ces derniers la lutte est généralement obligatoire pour les végétaux destinés à la plantation car ils peuvent avoir des incidences économiquement inacceptables du fait de l'usage prévu de ces végétaux.

Ces analyses, réalisées dans un cadre réglementaire, concernaient :

- le contrôle import-export de matériel végétal, pour la recherche du virus *de la mosaïque du pépino* ((Pepino mosaic virus), par exemple dans les semences de tomates,
- le contrôle du matériel de multiplication, comme la recherche des virus du court-noué et de l'enroulement viral de la vigne, de vignes mères de porte-greffes et de greffons,
- le contrôle pour les luttes dites obligatoires, telle que la recherche du virus de la sharka (*Plum Pox* virus) en culture pêchers, abricotiers ou aux autres prunus.

A ces activités que je menais en totale indépendance, s'ajoutait l'encadrement saisonnier de trois vacataires pour la campagne dédiée à la recherche des nématodes *Ditylenchus dipsaci* dans des bulbilles d'ail en vue de leur certification en tant que plants.

Ces activités de diagnostic dans un cadre réglementaire m'ont permis de développer ma rigueur pour mener à bien des analyses dont les résultats, généralement attendus dans un temps très contraint, pouvaient être très lourds de conséquences pour les professionnels. Elles m'ont également permis d'acquérir des connaissances sur des problématiques sanitaires variées du secteur végétal.

En 2005, mes missions ont été élargies et il m'a été confié de développer l'étude des résistances aux produits phytosanitaires *via* des approches de biologie moléculaire. Le laboratoire du SRPV travaillait sur ce type de thématiques depuis quelques années mais uniquement via des approches par tests biologiques. Par manque de place, il n'était pas possible de développer ce pôle d'analyses dans les locaux du laboratoire. J'ai donc été fortement impliquée dans le développement d'un partenariat avec l'équipe symbiose mycorhizienne de laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) de l'université Lyon 1 afin d'accueillir cette nouvelle activité du SRPV au sein de locaux de l'université.

J'ai ainsi pu mettre en place des analyses par biologie moléculaire des résistances aux produits de protections des plantes (PPP) dans ce nouvel environnement de travail. Cela fut donc un double challenge à la fois scientifique et humain. Le développement de ce secteur d'analyses dans un environnement universitaire a été extrêmement enrichissant à tous points de vue. Initialement, la thématique étudiée portait sur la résistance à certains fongicides de l'agent de la tavelure du pommier, puis les thèmes se sont élargis à d'autres agents phytopathogènes et aux résistances aux insecticides. Au cours de cette période j'ai encadré un étudiant de l'EPHE ('École Pratique des Hautes Études) en alternance pour l'obtention de son diplôme de master, et j'avais toujours en charge la réalisation des diagnostics avec des approches immunochimiques au sein du laboratoire du SRPV.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

La gestion parallèle de deux missions distinctes en termes de thématiques, de techniques, situées dans des environnements professionnels très différents et distants physiquement, a été un vrai défi, qui m'a permis de coupler mes connaissances scientifiques avec mes capacités d'organisation et d'adaptation.

En 2009, une réorganisation des laboratoires des services régionaux de la protection des végétaux a conduit au transfert des études menées sur les résistances aux PPP de la DRAF Rhône-Alpes à l'Afssa (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) qui deviendra en 2010 l'Anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) suite à la fusion avec l'Afsset (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). Afin de garder l'expertise acquise sur cette thématique, le personnel du laboratoire du SRPV a été intégré à l'Anses.

2. Chargée d'expertises scientifiques et techniques au Laboratoire Anses de Lyon

Suite au transfert des missions du laboratoire du SRPV à l'Anses, j'ai commencé à travailler au sein du laboratoire Anses de Lyon en février 2009 en tant que chargée d'expertises scientifiques et techniques. Je fus la première personne du laboratoire du SRPV à intégrer physiquement le laboratoire Anses afin de poursuivre les études des résistances aux PPP via des approches de biologie moléculaire, le reste de l'unité n'étant arrivé que six mois plus tard lors de la fermeture effective du laboratoire du SRPV.

Depuis mon arrivée à l'Anses, j'ai en charge deux types de missions scientifiques : des missions dites de référence et des missions dites de recherche sur les résistances aux produits de protection des plantes. J'exerce aussi des activités transversales d'intérêt collectif en lien avec l'hygiène et la sécurité ou la qualité. La vulgarisation scientifique est un aspect du travail de recherche dans lequel je m'implique aussi très volontiers. Ces missions étaient toujours exercées sous la responsabilité d'Annie Micoud jusqu'en 2016, année où Benoît Barrès a pris la direction de l'unité. Initialement, unité Anses, l'unité CASPER (Caractérisation et Suivi des Phénomènes d'Evolution des Résistances) est devenue en 2018 une unité sous contrat (USC) avec INRAE.

2.1. Description de mes activités de référence

Mes missions dites de référence concernent notamment la gestion des analyses de résistance aux PPP *via* des approches de biologie moléculaire. Ces analyses sont réalisées dans le cadre de plans de surveillance diligentés annuellement par la DGAL (Direction Générale de l'ALimentation). Ce plan de surveillance est intégré au réseau de suivi des effets non intentionnels des produits phytosanitaires. Concrètement, les cinq experts filières de la DGAL (grandes cultures, vigne, arboriculture, maraîchage, jardins et espaces verts) définissent annuellement des thématiques pour lesquelles une surveillance de l'émergence ou du suivi de la résistance est nécessaire. Le choix des experts est justifié par les remontées du terrain, le risque d'émergence de résistances en fonction des usages (fréquence d'utilisation d'une substance active), ou de changements de pratiques que cela soit pour

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

des raisons réglementaires, agronomiques ou économiques. Une thématique du plan de surveillance se définit par une espèce de bioagresseur étudiée vis-à-vis d'une substance active ou d'une famille de substances actives dans une culture donnée. Certaines thématiques ne sont étudiées qu'avec des approches biologiques, d'autres avec des approches de biologie moléculaire ou, plus rarement, avec les deux. Les approches de biologie moléculaire visent généralement à rechercher les marqueurs génétiques de la résistance à une ou plusieurs substance(s) active(s) chez un bioagresseur.

Concrètement pour ces missions de surveillance, j'assure l'encadrement d'une technicienne (Laëtitia Caddoux) pour la réalisation des analyses, la veille bibliographique, le développement de méthodes d'analyses pour les nouvelles thématiques, la présentation des résultats et les rédactions de bilans annuels destinés à la DGAL.

A ces missions de surveillance ou de référence s'ajoutent des missions de recherches sur des thématiques en lien avec la résistance aux PPP.

2.2. Description de mes activités de recherche

Dans le cadre de mes activités de recherche, j'étudie les phénomènes de résistance d'un point vue plus fondamental, tout en restant en lien avec des problématiques du terrain. Ces recherches peuvent avoir divers objectifs dont :

- l'identification des marqueurs génétiques impliqués dans les phénotypes résistants détectés *via* les approches biologiques (mutations, …),
- l'étude et la caractérisation du (ou des) mécanisme(s) qui a (ont) évolué,
- la détermination du niveau dominance d'un allèle impliqué dans la résistance,
- l'évaluation du coût évolutif potentiel de la résistance à un PPP,
- l'étude de la dynamique de dispersion des allèles de résistance dans les populations.

De plus, l'étude des résistances aux PPP correspond à l'étude de changements observés au sein de populations données ou d'une espèce donnée sur une échelle de temps courte. Cela représente donc une opportunité d'observation et d'étude d'un phénomène de microévolution.

Concrètement les projets de recherche peuvent découler de questions qui ont émergé dans le cadre des plans de surveillance ou aboutir à des travaux en lien avec la référence. Les deux pans de mes activités recherche / expertise sont souvent alimentés l'un par l'autre. Je détaillerai plus concrètement mes activités de recherche en lien avec les résistances aux PPP dans la partie concernant l'analyse de mon parcours professionnel en vue de l'obtention d'un doctorat en VAE.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2.3. Autres activités

Outre mes missions de références et de recherche, j'assure également des missions transversales et d'intérêt collectif en lien avec la qualité, l'hygiène et sécurité ainsi que des activités de communication et vulgarisation.

a) Activités en lien avec la qualité

Je suis suppléante de la correspondante qualité de notre unité, Claire Mottet (Chargée d'expertises scientifique et technique à l'Anses). Je m'investis au côté de la titulaire dans les missions liées au développement d'une démarche qualité au sein de l'unité afin de répondre aux attentes de l'Anses dans ce domaine. Ainsi, j'apporte mon appui à la correspondante qualité dans son rôle de relais entre la responsable qualité du laboratoire Anses de Lyon (Isabelle Desserle) et l'unité CASPER. La démarche qualité que nous mettons en œuvre vise notamment à se rapprocher de la norme ISO/IEC 17025 qui correspond à la norme d'accréditation Cofrac (Comité Français d'Accréditation) des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

J'assure la fonction d'émettrice de documents qualité pour l'unité CASPER *via* le logiciel Ennov (plateforme unifiée de gestion de l'information pour enrichir l'intégralité du cycle de vie du produit) que nous permet une Gestion Électronique des Documents (GED) qualité à l'Anses. Dans ce cadre j'assure la rédaction et la révision de procédures et d'instructions internes à l'unité dont celles liées aux analyses dont j'ai la charge, notamment pour les plans de surveillance. Je gère le cycle de vie de ces documents (création, envoi en signature pour validation, diffusion, révision, annulation et archivage) en lien avec le service qualité du laboratoire de Lyon.

J'ai également été en charge en collaboration avec un informaticien (Jean Luc Vinard, Analyste Programmeur) de l'unité EAS (Epidémiologie et Appui à la Surveillance) du laboratoire Anses de Lyon, de l'élaboration du cahier des charges pour le développement d'un outil informatique permettant la gestion de l'information des flux d'analyses dans notre unité, plus particulièrement, pour les analyses réalisées pour le plan de surveillance. Ce travail a abouti à la mise en place en 2018 de l'application Prosper qui permet l'enregistrement des prélèvements reçus, le suivi des analyses réalisées sur les échantillons, l'enregistrement des résultats d'analyse et l'aide à l'édition de rapports d'analyse et des factures (Figure 2). J'assure la formation à l'utilisation de l'outil des nouveaux arrivants dans l'unité. J'ai, d'ailleurs, rédigé une procédure pour faciliter la prise en main de cet outil. J'assure toujours le lien entre les membres de l'unité et l'informaticien lorsque des dysfonctionnements ou des optimisations sont nécessaires. Enfin, je gère également pour l'unité la création des requêtes via le logiciel Access lorsque des extractions complexes de données sont nécessaires.

Cet outil a permis à notre unité de rationaliser et d'uniformiser les pratiques en termes de suivi des analyses et de l'enregistrement des résultats ainsi que de sécuriser la sauvegarde de ces données. Je suis administratrice de cet outil afin de gérer les mises à jour des thésaurus de l'application, d'attribuer les droits aux utilisateurs, de former et d'accompagner les utilisateurs.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

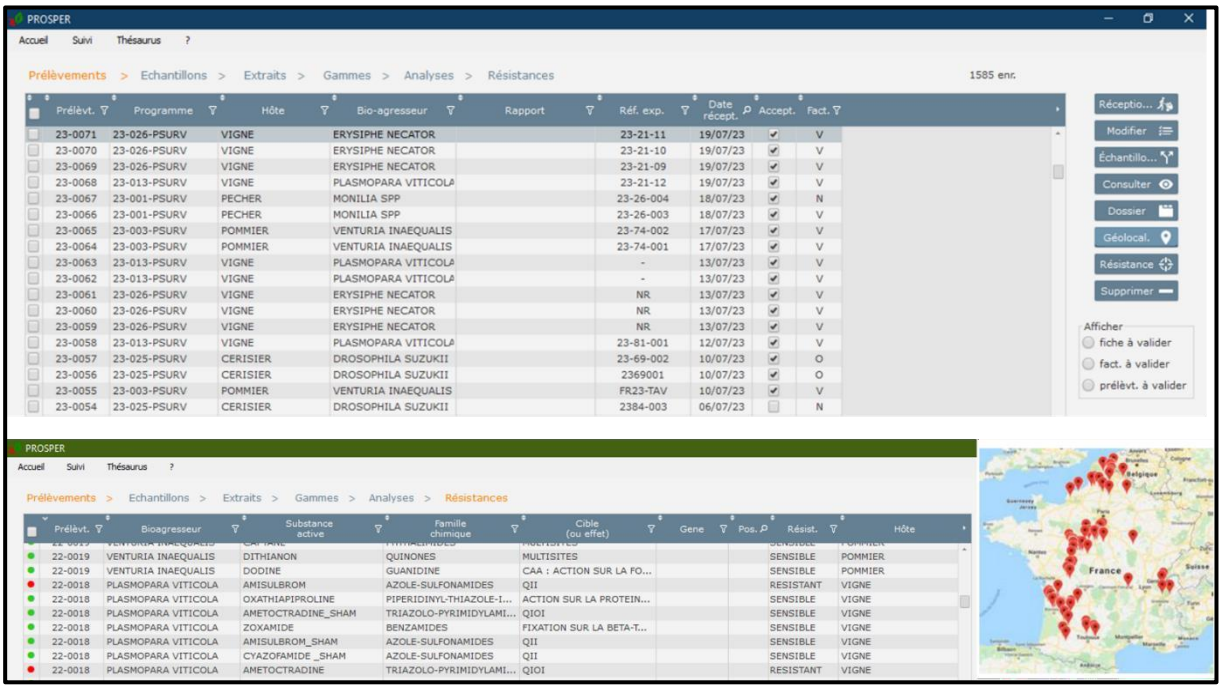


Figure 2 : **Différents visuels de l'application Prosper permettant l'enregistrement dans une base de données des prélèvements et des analyses réalisés dans l'unité CASPER**. En haut : liste des prélèvements reçus et leurs caractéristiques (bioagresseur, culture hôte, thématique) ; en bas à gauche : liste des prélèvements et leur statut sensible ou résistant en fonction de la substance active ou de la famille chimique étudiée ; en bas à droite : cartographie liée à l'application permettant de représenter l'origine géographique de prélèvements reçus dans le cadre d'un plan de surveillance.

Je suis également habilitée à la conduite d'audits qualité internes selon la norme ISO/IEC 17025, une norme internationale qui spécifie les « exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ». Dans ce cadre, je suis amenée à réaliser des audits qualité internes c'est-à-dire dans les unités du laboratoire de Lyon mais également au sein d'autres laboratoires Anses. A l'Anses, de nombreuses unités possèdent des analyses sous accréditation Cofrac ainsi que des mandats de références nationaux, européens ou internationaux (Encadré 1). La réalisation d'un audit interne se fait pour les unités sous accréditation en vue de préparer un audit externe. Des audits internes sont également effectués pour les unités hors accréditation dans l'objectif d'une amélioration continue des pratiques de la qualité en laboratoire de recherche ou d'analyses, du perfectionnement de la traçabilité des flux d'analyses, du suivi des équipements et des compétences du personnel (…).

L'ensemble de ces missions m'ont permis de développer une meilleure culture de la démarche qualité et ainsi d'améliorer les pratiques mises en œuvre dans le cadre des travaux d'analyses et de recherches dont j'ai la charge.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Encadré 1 : Les différents mandats des laboratoires de référence

Pour chaque pathogène ou contaminant réglementé à surveiller, des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses, ainsi qu'un laboratoire dit « de référence », sont désignés par les autorités sanitaires. Ce laboratoire de référence est le garant de la fiabilité des analyses effectuées par l'ensemble des laboratoires agréés. Son mandat peut être :

- national (LNR pour la pour la santé animale, la santé des végétaux ou la sécurité sanitaire des aliments),
- européen (LRUE ; il est alors à la tête d'un réseau de laboratoires nationaux de référence),
- international (laboratoire de référence Office international).

b) Activités en lien avec l'hygiène et sécurité

Je suis correspondante hygiène et sécurité pour mon unité. A ce titre, je participe au GLHSCT (Groupe Local d'Hygiène, de Sécurité et des Conditions de Travail) du laboratoire Anses de Lyon. En tant que correspondante hygiène et sécurité, je suis chargée de la gestion du document unique pour notre unité, de l'information des agents de l'unité sur les procédures en hygiène et sécurité et en prévention des risques, de la rédaction des documents hygiène et sécurité internes à l'unité et de la mise en place dans l'unité des mesures d'hygiène et sécurité décidées par le GLHSCT. Dans le domaine de l'hygiène et sécurité, je participe également à deux groupes de travail du laboratoire de l'ANSES de Lyon, l'un sur la prévention des risques chimiques, le second sur les risques biologiques. Ces groupes sont réunis régulièrement pour travailler sur des thématiques qui concernent l'ensemble des unités du laboratoire ou pour proposer au GLHSCT des mesures à mettre en œuvre face à un risque biologique ou chimique particulier.

c) Participation à des réseaux sur les résistances aux PPP

- *Co-animation du réseau RésisTrans*

Depuis 2023, je suis co-animatrice, avec quatre experts issus d'autres entités de l'Anses d'un réseau interne nommé « RésisTrans ». Ce réseau a pour but de renforcer les échanges et de développer une culture commune sur la résistance aux PPP entre les différentes entités de l'Anses concernées par cette problématique et géographiquement distantes. En outre des activités de surveillance et de recherche de l'unité CASPER, la résistance aux PPP est une problématique qui est prise en compte dans le cadre de l'évaluation des demandes de mise sur le marché des PPP par l'unité Evaluation de l'Efficacité des Intrants du Végétal (UEEFFIV) de la Direction d'Evaluation des Produits Réglementés (DEPR). Sur la base des conclusions de l'évaluation du dossier de demande d'AMM, l'Unité Décision de la Direction des Autorisations de Mise sur le Marché (DAMM) délivre les autorisations de mise sur le marché et peut appliquer des restrictions liées aux problèmes de résistance. L'Unité PhytoPharmacovigilance du Végétale (UPPV) de la Direction de l'Evaluation du Risque (DER) gère en aval les alertes éventuelles et les remontées du terrain liées à la résistance. Enfin l'unité Expertise sur les Risques Biologiques

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

du Laboratoire Santé Végétal (ERB-LSV) est également intéressée par cette problématique dans le cadre de l'analyse de risque phytosanitaire (Figure 3).

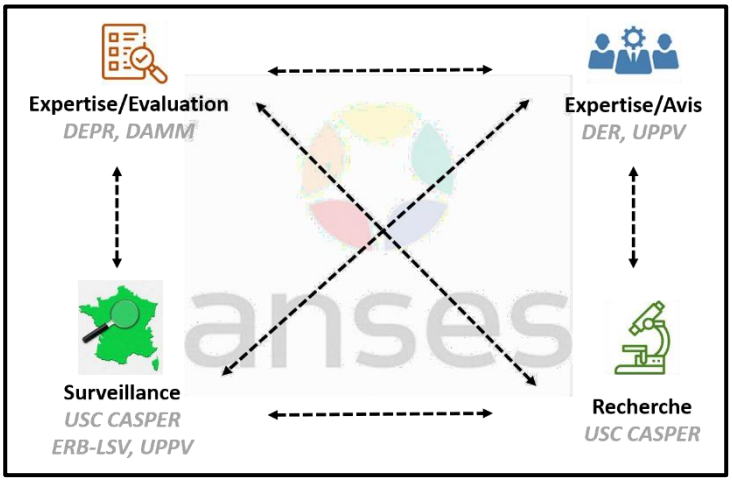
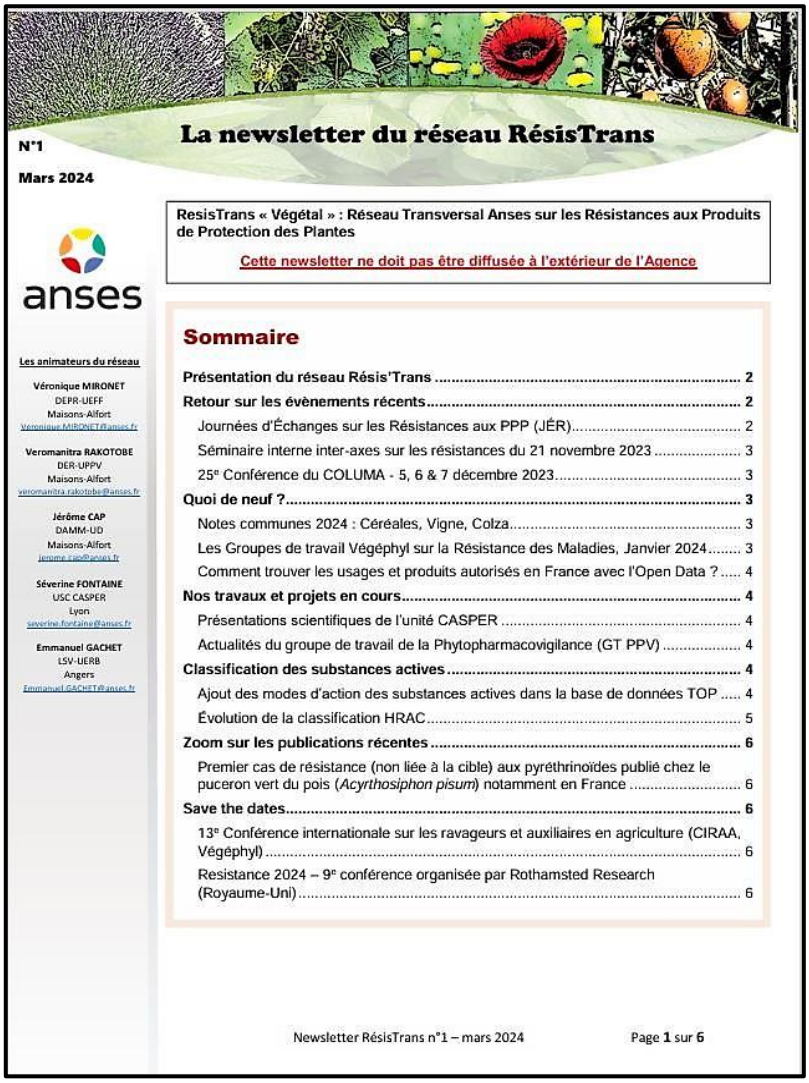


Figure 3 : Les différentes entités de l'Anses concernées par la problématique des résistances et appartenant au réseau RésisTrans. DEPR : Direction d'Evaluation des Produits Réglementés ; DAMM : Direction des Autorisations de Mise sur le Marché ; DER : Direction de l'Evaluation du Risque ; UPPV : Unité PhytoPharmacovigilance du Végétale ; USC CASPER : Unité Sous Contrat Caractérisation et Suivi des Phénomènes d'Evolution des Résistances. ERB-LSV : Expertise sur les Risques Biologiques du Laboratoire Santé Végétal.

L'animation de ce réseau se traduit par la co-rédaction trimestrielle d'une newsletter (Figure 4) sur la thématique des résistances qui permet d'échanger des informations sur l'actualité en lien avec cette thématique (les faits marquants, les nouvelles données telles que les cas de résistance, les nouvelles substances actives ou d'éventuelles évolutions règlementaires, la synthèse d'un article…) et de communiquer sur l'actualité des différentes entités travaillant sur la résistance. Les membres du réseau (une trentaine de personnes) ont maintenant la possibilité d'assister en visioconférence aux séminaires scientifiques mensuels initialement internes à l'unité CASPER. Cela permet une meilleure visibilité et compréhensibilité des résultats de nos travaux de surveillance et de recherche, de faciliter les échanges et les remontées d'informations entre les différentes entités concernées par la résistance aux PPP. Un réseau partagé permet également la mise en commun de nombreux documents tels que des articles scientifiques ou de vulgarisation, des présentations et des comptes rendus de réunions. Des évènements communs ponctuels sont également envisagés afin de poursuivre le renforcement des interactions. Ce réseau contribue à améliorer la formation et la veille sur les méthodes d'études de la résistance au laboratoire des membres du réseau n'appartenant pas à l'USC CASPER et de faciliter les échanges sur la surveillance des résistances aux PPP. Les agents de l'USC CASPER, y acquièrent une meilleure vision du processus d'évaluation, de décision, des évolutions réglementaires et de la phytopharmacovigilance. Ce réseau participe au développement d'une culture partagée et d'une approche transversale de la problématique des résistances aux PPP.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés



La newsletter du réseau RésisTrans

N°1

Mars 2024

ResisTrans « Végétal » : Réseau Transversal Anses sur les Résistances aux Produits de Protection des Plantes

Cette newsletter ne doit pas être diffusée à l'extérieur de l'Agence

anses

Les animateurs du réseau

Véronique MIRONET
DEPR-UEFF
Maisons-Alfort
Veronique.MIRONET@anses.fr

Veromanitra RAKOTOBE
DER-UPPV
Maisons-Alfort
veromanitra.rakotobe@anses.fr

Jérôme CAP
DAMM-UD
Maisons-Alfort
jerome.cap@anses.fr

Séverine FONTAINE
USC CASPER
Lyon
severine.fontaine@anses.fr

Emmanuel GACHET
LSV-UERB
Angers
Emmanuel.GACHET@anses.fr

Sommaire

Présentation du réseau Résis'Trans 2
Retour sur les évènements récents 2
Journées d'Échanges sur les Résistances aux PPP (JÉR) 2
Séminaire interne inter-axes sur les résistances du 21 novembre 2023 3
25e Conférence du COLUMA - 5, 6 & 7 décembre 2023 3
Quoi de neuf ? 3
Notes communes 2024 : Céréales, Vigne, Colza 3
Les Groupes de travail Végéphyl sur la Résistance des Maladies, Janvier 2024 3
Comment trouver les usages et produits autorisés en France avec l'Open Data ? 4
Nos travaux et projets en cours 4
Présentations scientifiques de l'unité CASPER 4
Actualités du groupe de travail de la Phytopharmacovigilance (GT PPV) 4
Classification des substances actives 4
Ajout des modes d'action des substances actives dans la base de données TOP 4
Évolution de la classification HRAC 5
Zoom sur les publications récentes 6
Premier cas de résistance (non liée à la cible) aux pyréthrinoïdes publié chez le puceron vert du pois (*Acyrthosiphon pisum*) notamment en France 6
Save the dates 6
13e Conférence internationale sur les ravageurs et auxiliaires en agriculture (CIRAA, Végéphyl) 6
Resistance 2024 – 9e conférence organisée par Rothamsted Research (Royaume-Uni) 6

Newsletter RésisTrans n°1 – mars 2024 Page 1 sur 6

Figure 4 : Visuel du sommaire de la 1ière newsletter du réseau ResisTrans. Le bandeau de gauche présente les différents animateurs du réseau.

- *Membre du réseau R4P*

Depuis 2023, j'ai intégré le réseau de Réflexion et de Recherche sur la Résistance aux Pesticides (R4P). Ce réseau français fondé en 2011 est composé de scientifiques de l'INRAE, de l'Anses et du ministère de l'agriculture (DGAL). Il regroupe des scientifiques impliqués dans des activités de recherche sur les résistances aux PPP, d'origine naturelle ou de synthèse, et appartenant à six entités réparties dans toute la France (listées dans la Figure 5). Ce réseau a un rôle d'expertise sur les résistances aux PPP vis-à-vis de la profession, il a comme objectifs de favoriser les échanges et le partage des connaissances entre la recherche et la profession, de construire des projets de recherche communs sur les résistances aux PPP. R4P permet une mutualisation de moyens techniques et humains ainsi que l'accueil de personnel au sein de l'unité CASPER dédié à des projets de recherche. Un suivi de ces travaux de recherche est réalisé de manière collective.

Ce réseau est animé par Anne-Sophie Walker (UMR BIOGER) et Christophe Délye (UMR Agroécologie) et est financé par le département SPE (Santé des Plantes et

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Environnement) de l'INRAE. Le financement du Département SPE permet l'organisation de plusieurs réunions annuelles pour l'élaboration et le suivi des projets.

De plus, le réseau organise tous les 2 ou 3 ans des Journées d'Echanges sur les Résistances. Ces journées à destination des professionnels impliqués dans le conseil pour l'utilisation des PPP visent à former à la problématique des résistances, à présenter un état des lieux en France des résistances pour les trois catégories de PPP et à préconiser des mesures pour prévenir et gérer ces résistances. Lors de la dernière édition, j'ai eu l'occasion de présenter des résultats concernant la résistance aux fongicides chez l'agent de la cercosporiose de la betterave.

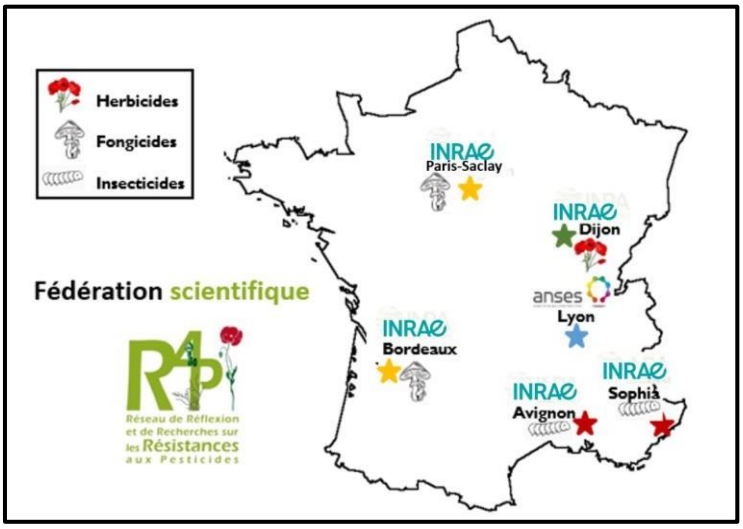


Figure 5 : Localisation des différentes unités ou laboratoires du réseau R4P.

d) Vulgarisation scientifique dans la cadre de la fête de la science

Depuis 2018, je participe régulièrement à la Fête de la Science en contribuant à l'animation d'ateliers à destination d'un public scolaire accueilli à l'ENS (Ecole Normale Supérieure) de Lyon. Ces ateliers se déroulent une fois par an sur une ou deux journée(s). Initialement, j'assistais une collègue pour l'animation d'un atelier sur les insectes, puis j'ai mis en place un atelier pour réaliser une extraction d'ADN de divers fruits à l'aide de produits ménagers afin que les élèves puissent reproduire facilement l'expérience chez eux (Figure 6). Les élèves présents sur ce jour sont d'un niveau scolaire très variable allant du primaire au lycée, voire des adultes en formation ou en cours de réinsertion. Les élèves ont l'opportunité de manipuler en participant à tour de rôle à l'extraction. Ils peuvent repartir s'ils le souhaitent avec un protocole réalisable chez eux ainsi qu'avec un tube contenant de l'ADN précipité et conservé dans l'alcool. Participer à ces ateliers est pour moi l'occasion de faire preuve de pédagogie, de partager mon intérêt pour la science, de stimuler la curiosité, ainsi que de participer à une meilleure connaissance de l'Anses et de ses missions.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

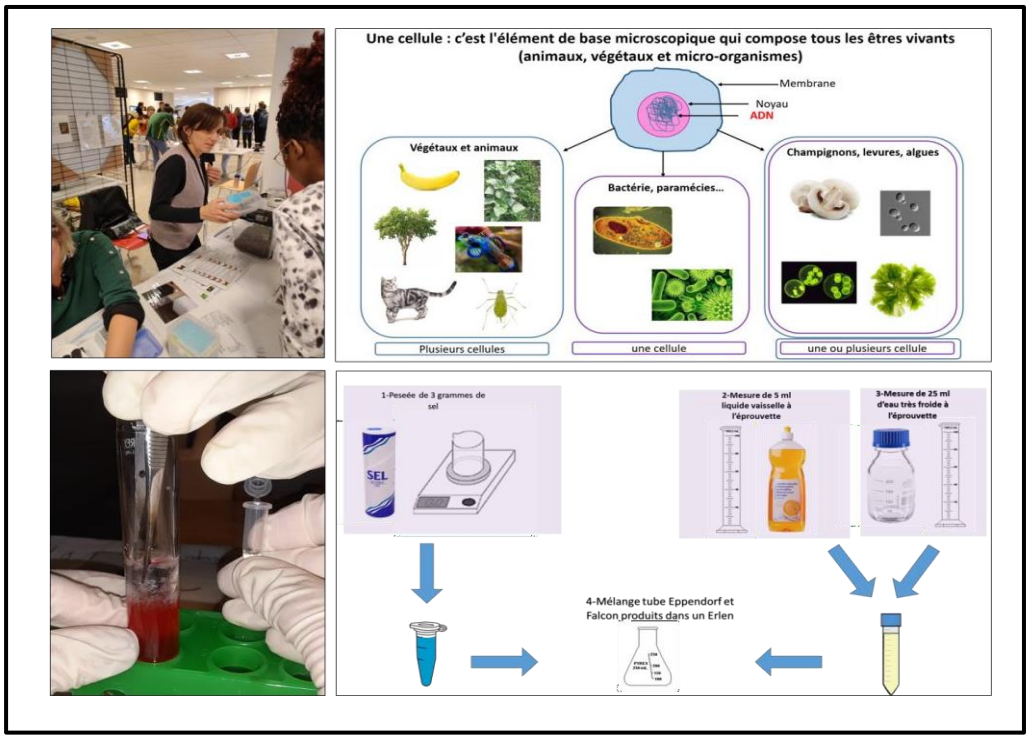


Figure 6 : Photos de la fête de la science à l'ENS et de fiches explicatives préparées pour les élèves de l'atelier.

ANALYSE DE MON PARCOURS PROFESSIONNEL

Au cours de mon parcours professionnel, j'ai été amenée à travailler sur des projets d'études variés qui m'ont permis de développer mes compétences de chercheuse. La section suivante explique et détaille la démarche et les raisons qui m'amènent aujourd'hui à présenter mon manuscrit et mon dossier afin d'obtenir un diplôme de doctorat par VAE.

1. Compétences et expertises scientifiques et techniques

Au cours de mon parcours professionnel, j'ai acquis une **expertise scientifique et pluridisciplinaire** dans les domaines liés à l'étude des résistances des bioagresseurs des plantes vis à vis des PPP. Les nombreuses thématiques sur lesquelles j'ai travaillé m'ont permis d'acquérir des **connaissances techniques et théoriques solides** en lien avec ce sujet d'étude**.** D'une part, en ayant mené des études sur des bioagresseurs appartenant à différents règnes, j'ai développé des connaissances théoriques dans les domaines en lien avec la **mycologie** et **l'entomologie** ainsi que sur les bases **génétiques, cellulaires et biochimiques** des résistances aux PPP. D'autre part, j'ai également **acquis et enrichi tout au long de ma vie professionnelle la maitrise des divers outils d'analyses,** que cela soit *via* des approches biologiques (tests de sensibilité *in vitro*), biochimiques (Elisa, DAS-Elisa) ou de biologie moléculaire (PCR, qPCR, clonage, séquençage à haut débit…). J'ai également développé **des compétences dans le traitement, l'analyse et la présentation des données** (tests statistiques, R studio, outils de bio- informatique en ligne ou logiciels tels que BioEdit, CodonCode Aligner, IGV, Galaxy…).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Tout au long de mon parcours j'ai montré mes aptitudes **à réaliser et à mener à terme des projets de recherche, en réalisant les développements technologiques nécessaires à faire aboutir pratiquement un projet, ainsi qu'en participant à leur élaboration.**

J'ai ainsi **développé des dizaines de protocoles** d'analyse appliqués dans des conditions optimales de sécurité et de traçabilité. Dans un premier temps, j'ai développé des outils de biologie moléculaire afin d'identifier des marqueurs génétiques impliqués dans les résistances. Du fait de la diversité des bioagresseurs et des matrices (lésions foliaires, lésions sur fruits, cultures mycéliennes, insectes à divers stades de développement) j'ai notamment acquis une expertise dans l'extraction et la purification des acides nucléiques et dans leur analyse. Pour exemple, dans le cadre de mes activités j'ai développé une approche de PCR-dCAPS (Polymerase Chain Reaction Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), une méthode pour la détection de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), que j'ai utilisée pour le génotypage individuel de pucerons verts du pêcher (*Myzus persicae*) vis-à-vis d'une résistance aux carbamates causée par une mutation de la protéine cible. Cette méthode a été décrite avec d'autres méthodes de génotypage des résistances chez le puceron vert du pêcher dans EuroReference (Fontaine et al., 2013) et appliquée dans le cadre de travaux de recherche au sein de notre unité (Roy et al, 2022). Ensuite, j'ai également développé des méthodes avec des approches quantitatives. Pour exemple, dans le cadre de la thèse de Saad Azedine (co-financée, par l'INRAE et l'Anses : « Résistance au fenhexamid dans le complexe d'espèces *Botrytis cinerea* / *Botrytis pseudocinerea* : Etudes génétiques et moléculaires ») j'ai développé un outil de biologie moléculaire permettant la détection et la quantification d'une espèce cryptique*, Botrytis pseudocinerea,* au sein du complexe d'espèces *Botrytis*. A l'issue de la thèse cet outil a été utilisé dans l'USC CASPER afin de mieux connaitre la niche écologique de *B. pseudocinerea* un champignon intrinsèquement résistant à une molécule fongique, le fenhexamid (données non encore publiées). Des approches de PCR quantitative ont également été développées en vue de participer à des projets de recherche s'intéressant à l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la résistance à une famille d'insecticides chez l'un des bioagresseurs modèles étudiés dans note unité, *M. persicae* (Mottet et al, 2024). Plus récemment, j'ai développé mes compétences en vue d'utiliser des approches de séquençage à haut débit telles que la technologie Illumina® dans l'étude et la surveillance des résistances aux PPP. Cette montée en compétences va se poursuivre avec l'acquisition de la maitrise d'autres approches de séquençage à haut débit dans le cadre de travaux de recherche.

Au cours de mon parcours, j'ai également pu développer mes **aptitudes à participer, à concevoir et élaborer des projets scientifiques.** Ma première expérience de gestion de projet a concerné le développement d'approches par biologie moléculaires, au sein du SRPV, en vue d'étudier les résistances aux PPP. J'ai mis en place le pôle d'analyses de biologie moléculaire afin de caractériser les mécanismes de résistance et de développer des approches analytiques plus rapides. Ce projet s'est notamment **concrétisé par la publication d'un article scientifique** dans une revue internationale à comité de lecture sur la surveillance de la mutation G143A impliquée dans la résistance au QoI chez *Venturia inaequalis* dans les vergers français (Fontaine et al., 2011). J'ai ensuite collaboré à des projets en lien avec des collègues de mon unité ou appartenant à d'autres organismes de recherche tels que l'INRAE. Ainsi, au sein de mon unité j'ai participé à plusieurs des projets de recherche qui concernent notamment l'un des modèles de recherche de notre

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

unité, le puceron *M*. *persicae*. Ces projets ont donné lieu à plusieurs publications et ont apporté de meilleures connaissances sur les mécanismes de résistances présents dans les populations de *M. persicae* dans les cultures pérennes et annuelles ainsi que sur leur dispersion (Roy et al, 2013 ; Mottet et al, 2016 ; Mottet et al, 2024).

Concernant les collaborations avec des partenaires extérieurs à l'Anses, j'ai participé au projet MDrisque qui visait à évaluer le risque de la résistance multidrogues (MDR) chez l'agent de la septoriose du blé, *Zymoseptoria tritici*. J'ai participé à l'axe 2 (outils de diagnostic) de ce projet afin de développer un outil de détection et de quantification des marqueurs (inserts) impliqués dans les profils MDR et assuré l'encadrement d'un apprenti ingénieur pour cette partie du projet. Cet outil de qPCR devait permettre de déterminer la capacité de différents programmes de traitement à sélectionner les souches MDR de *Z. tritici*. Cet outil n'a malheureusement pas été opérationnel du fait d'un manque de précision dans la quantification des souches MDR.

Plus récemment, j'ai **participé** à un projet ANSES-INRAE nommé ENI-VTH (Effets Non Intentionnels associés à l'utilisation des Variétés de tournesol Tolérantes aux Herbicides). Ce projet, financé dans le cadre du plan Ecophyto II[1], visait à déterminer les impacts des VTH sur les pratiques, la flore adventice et les populations d'ambroisie, et à la proposition de nouveaux outils de surveillance et de gestion. Ce travail a été valorisé par la publication d'un article scientifique dans une revue internationale à comité de lecture dont je suis l'un des co-auteurs (Loubet et al, 2021). Par la suite j'ai développé ce type d'approche au sein de mon unité dans le cadre du projet QUANTALL (Détection et QUANTification haut débit d'ALLèles liées à la résistance des bioagresseurs aux PPP). J'ai assuré la **cogestion de ce projet en collaboration** avec Christophe Plantamp (Chargé de projet scientifique et technique dans l'USC CASPER). Une partie de ce travail, portant sur l'agent de la cercosporiose de la betterave, m'a permis de réaliser une **communication orale** à la 13e Conférence internationale sur les maladies des plantes (Orléans 2022) et de présenter un poster à la conférence internationale "Resistance2024" (Rothamsted - Royaume Uni ; 2024). J'ai initié la rédaction d'un article sur l'entièreté de ce projet qui devrait être finalisé fin 2025.

Enfin, concernant l'agent de la cercosporiose de la betterave, j'ai encadré des travaux, dans le cadre d'un master 2, sur la surexpression du gène cible dans la résistance aux inhibiteurs de l'14α-déméthylase, les triazoles. Les travaux menés ont exploré le rôle potentiel de cette surexpression dans la variabilité des phénotypes observés de ces différentes souches *C. beticola* lors d'un précèdent projet mené dans l'unité. Les premiers résultats obtenus ont donné lieu à un poster à l'ICPP (International Congress of Plant Pathology) en 2023. Des études sur ce modèle vont se poursuivre afin de mieux caractériser la diversité des mécanismes de résistance aux triazoles présents chez les souches de *C. beticola* en France.

Au sujet du travail en réseau, la co-animation du réseau ResisTrans me permet de développer des capacités d'échanges avec les différents acteurs de l'Anses dont la problématique des résistances fait partie des éléments à prendre en compte dans le cadre de leurs travaux d'expertise pour l'évaluation, de la mise sur le marché et le suivi post-homologation des PPP. C'est également l'opportunité de communiquer sur les résultats et projets de l'unité CASPER avec une démarche pédagogique vis-à-vis d'agents appartenant

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

à d'autres directions de l'Anses et dont les pratiques et le cœur de métier (évaluation de dossier, expertise, …) sont assez éloignés des approches et problématiques du laboratoire. Le réseau R4P est une opportunité pour m'impliquer plus globalement dans la construction et le suivi de projets de recherche avec des scientifiques experts sur les résistances aux PPP en y apportant mon expertise technique et scientifique.

Mon implication dans la démarche qualité de l'unité montre également ma volonté de travailler avec des **méthodes reproductibles et de produire des résultats fiables**, ce qui est un aspect fondamental de la recherche scientifique. Ainsi, j'assure la rédaction (ou co-rédaction) et la co-validation des modes opératoires et des protocoles utilisés dans le cadre des différentes analyses et études dont j'ai la charge. J'ai également la responsabilité de leur gestion documentaire *via* la GED « Ennov » afin de rendre accessible, à tous les membres de l'unité, les différentes procédures utilisées, de protéger les documents de toutes modifications non intentionnelles et de tracer les éventuels changements amenés à une procédure ou à un protocole. J'ai également montré ma capacité à **assurer la traçabilité et la validité des résultats produits**. Un audit qualité interne sur la traçabilité en recherche a d'ailleurs été mené fin 2018 dans notre unité. Il portait sur la traçabilité des résultats présentés dans une production scientifique dont j'étais la première autrice (Fontaine et al, 2019). Cet audit a conclu à une très bonne traçabilité des informations et des résultats permettant ainsi d'**assurer à la fois la fiabilité des données et de leur traitement**.

2. Compétences transverses

Tout au long de mon parcours professionnel, j'ai montré **mes aptitudes à encadrer** des étudiants en stage du BAC+2 au doctorant (une dizaine d'étudiants) ainsi que du personnel technique. Le suivi de ces étudiants a toujours été très enrichissant. Ces expériences m'ont demandé de la **pédagogie** ainsi que des capacités **de planification**. Depuis 2009, j'assure l'encadrement d'une technicienne pour la gestion des analyses et des résultats des thématiques du plan de surveillance et de nos travaux de recherche. La cogestion avec réussite de thématiques de recherche et de référence demande également de **bonnes capacités d'organisation,** ainsi que de faire preuve de pragmatisme.

Dans la gestion de projets, que cela soit sur des thématiques organisationnelles ou scientifiques, j'ai montré ma capacité à **interagir et collaborer de façon efficace et constructive** avec des personnes de différents domaines. J'ai collaboré avec des scientifiques de mon unité, de l'INRAE ou de l'université de Lyon. Ces collaborations ont pu être valorisées par des publications en tant qu'autrice ou co-autrice.

Par la réalisation de communications dans des contextes variés que cela soit au sein de l'unité, du laboratoire, de l'Anses, pour des instituts techniques ou dans le cadre de conférences, j'ai également montré mes capacités à **communiquer oralement** sur mes travaux. J'ai également acquis des capacités de **communications écrites** grâce à mon implication dans la rédaction (5) et co-rédaction (5) d'articles scientifiques en anglais ou de vulgarisation en Français (5), ainsi que de nombreux rapports techniques rédigés dans le cadre des plans de surveillance de la DGAL.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les thématiques variées sur lesquelles j'ai travaillé ainsi que les nombreuses formations que j'ai suivies témoignent tout à la fois de mes **capacités d'adaptation**, de ma **curiosité scientifique** et de ma volonté de **progresser.**

CONCLUSION

L'ensemble de mon parcours professionnel m'a permis de développer des compétences scientifiques et techniques ainsi que des compétences transverses qui sont synthétisées dans la figure 7. Valoriser l'ensemble de ces acquis via une VAE pour l'obtention d'un doctorat est important sur le plan personnel car cela représente pour moi une opportunité de reconnaissance du travail de recherche accompli. Cela représente également une façon de remercier les personnes avec qui j'ai travaillé, qui m'ont accompagnée dans le développement de mes compétences et qui ont contribué à ce parcours professionnel. Cette thèse en VAE est également l'opportunité d'être pleinement reconnue comme une chercheuse à part entière. Pour mon avenir professionnel, cela confortera ma position au sein de mon unité et m'apportera de nouvelles opportunités telles que la possibilité de participer plus activement à des co-encadrements de thèse et à l'élaboration de projets de recherche. De plus, l'obtention d'un doctorat sera également très bénéfique pour l'équipe dans laquelle je travaille. C'est en effet l'opportunité de renforcer notre unité et d'augmenter la visibilité de nos capacités de recherches.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

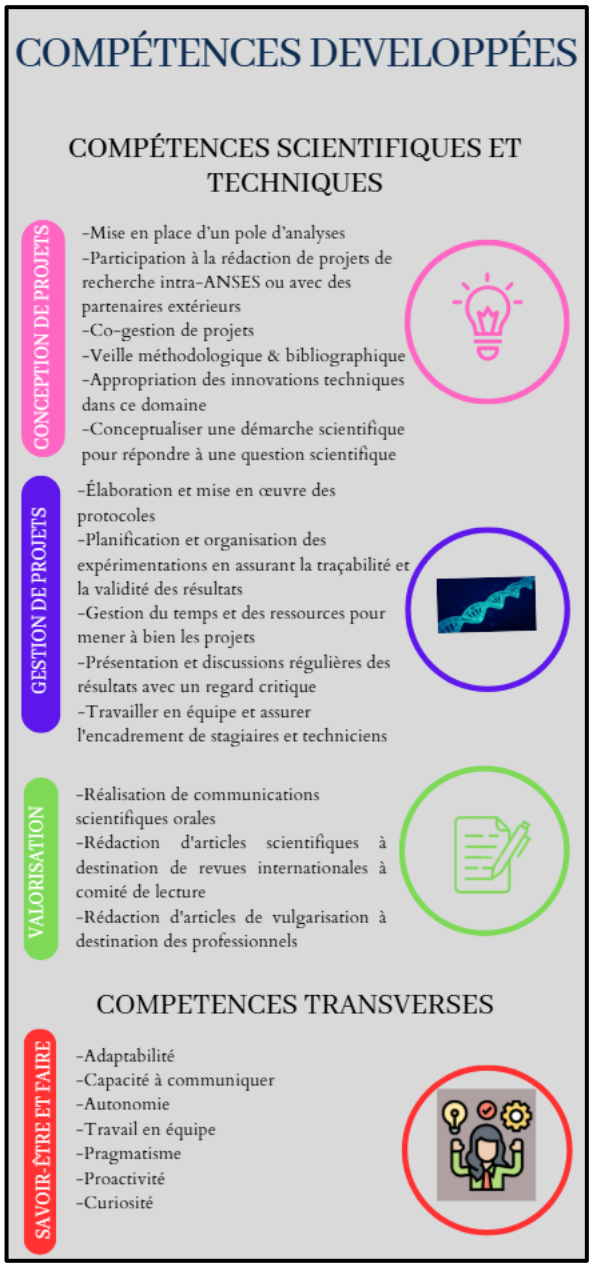


Figure 7 : Synthèse des compétences acquises et développées au cours de mon parcours professionnel

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Annexes

Parcours Professionnel

Curriculum Vitæ et productions scientifiques

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

FONTAINE Séverine
13 chemin des Egrivolays - 38690 TORCHEFELON
0685024607 – severine.fontaine@anses.fr

Chargée d'Expertise Scientifique & Technique

Biologie moléculaire - Développement de méthodes - Gestion de projet

COMPETENCES METIER

- Développement et mise au point de méthodes d'analyses de biologie moléculaire
- Conception, planification et gestion de projets scientifiques
- Analyse et synthèse des résultats
- Rédaction d'articles scientifiques et de rapports (en français et en anglais)
- Expertise en Biologie moléculaire, Génétique, Entomologie, Mycologie.
- Capacité de travail en équipe

LANGUE

-Anglais : bon niveau lu, écrit ; oral correct.

INFORMATIQUE

- Pack office : Excel, Word, Powerpoint, Acces
- Logiciels d'analyses de séquences nucléiques et protéiques (Bioedit, CodonCode, Blast, IGV…)
- Design d'amorces et de sondes qPCR
- R Studio

DIVERS

Sauveteur Secouriste du Travail

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

De 2009 à ce jour : ANSES – LABORATOIRE DE LYON
Chargée d'activité d'expertise scientifique et technique
dans le secteur bases génétiques de la résistance de l'USC CASPER

- ✓ Etudes des mécanismes de résistances aux produits phytosanitaires chez les bioagresseurs des cultures : caractérisation des mécanismes de résistance, de leur dispersion, étude d'impact sur la fitness…
- ✓ Collaboration avec les autres secteurs de l'unité et des équipes de recherche de l'INRAE (BIOGER de Versailles-Grignon, INRA de Dijon)
- ✓ Gestion et planification des analyses dans le cadre des plans de surveillance nationaux diligentés par la DGAL
- ✓ Gestion de la base de données des analyses pour l'unité
- ✓ Encadrement de stagiaires (niveau Bac+2 à bac +5) et techniciens
- ✓ Correspondante hygiène et sécurité de l'unité
- ✓ Correspondante suppléante Qualité de l'unité
- ✓ Habilitée à la conduite d'audit qualité interne selon la norme 17025

De 2003 à 2009 : DRAAF – Rhône-Alpes

Ingénieur d'études
au Laboratoire Régional de la Protection des Végétaux

- ✓ Chargée des analyses pour la recherche de virus et phytoplasmes réglementés
- ✓ Mise en place et développement d'un secteur d'analyses par biologie moléculaire

FORMATION

- ✓ 2002 : Master 2 "Signalisation et Interactions cellulaires et moléculaires" de l'Ecole Doctorale Santé, Sciences et Technologies de Tours.
- ✓ 2001 : Ingénieur en Agriculture - Diplômée de l'Institut Supérieur d'Agriculture de Rhône Alpes (ISARA, Lyon).
- ✓ 1996 : Baccalauréat scientifique au lycée Philibert Delorme (Isère).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

1. Mottet C., Caddoux L., **Fontaine S**., Plantamp C., Bass C., Barrès, B., 2024 - *Myzus persicae* resistance to neonicotinoids—unravelling the contribution of different mechanisms to phenotype. *Pest Management Science*, 80(11), 5852-5863. https://doi.org/10.1002/ps.8316.

2. **Fontaine S.,** Caddoux L., Barrès, B., 2023 - First report of the kdr pyrethroid resistance mutation in a French population of the English grain aphid, *Sitobion avenae*. *Crop Protection*, 165, 106153. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106153.

3. **Fontaine S.**, Caddoux L., Remuson F. Barrès B., 2022 - Thiophanate-methyl and carbendazim resistance in *Fusicoccum amygdali*, the causal agent of constriction canker of peach and almond. *Plant Pathology*, 1– 8. https://doi.org/10.1111/ppa.13525.

4. Loubet I., Caddoux L., **Fontaine S.**, Michel S., Pernin F., Barrès B., Le Corre V., Délye C., 2021 - A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Scientific reports*, 11, 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-021-99306-9.

5. **Fontaine S.**, Remuson F., Caddoux L., Barrès B., 2019 - Investigation of the sensitivity of *Plasmopara viticola* to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools. *Pest management science*. 75(8). https://doi.org/10.1002/ps.5461.

6. Mottet C., **Fontaine S.**, Caddoux L., Brazier C., Maheo F., Simon J.C., Micoud A., Roy L., 2016 - Assessment of the dominance level of the R81T target resistance to two neonicotinoid insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology,* 109, 2182-2189. https://doi.org/10.1093/jee/tow148.

7. Roy L., **Fontaine S.**, Caddoux L., Micoud A., Simon J.C., 2013 - Dramatic changes in the genotypic frequencies of target insecticide resistance in French populations of *Myzus persicae* (*Hemiptera* : *Aphididae*) over the last decade. *Journal of Economic Entomology*. 106(4):1838-47. https://doi.org/10.1603/EC12475.

8. **Fontaine S.**, Caddoux L., Brazier C., Bertho C., Bertolla P., Micoud A., Roy L., 2011 - Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. *Pest Management Science,* 67, 881- 885. https://doi.org/10.1002/ps.2224.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

9. Dufour M.C., **Fontaine S.**, Montarry J., Corio-Costet M.F., 2011 - Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Managment Science,* 67, 60-69. https://doi.org/10.1002/ps.2032.

10. **Fontaine S**., Remuson F., Fraissinet-Tachet L., Micoud A., Marmeisse R., Melayah D., 2009 - Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Management Science,* 65, 74-81. https://doi.org/10.1002/ps.1649.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES DANS DES REVUES NATIONALES A COMITE DE LECTURE

1. Loubet I., Pernin F., **Fontaine S.**, Caddoux L., Barrès B., Le Corre V., Délye C., 2020 - Résistance aux phytos : le diagnostic passe au haut débit. *Phytoma*, 735, 34-38.

2. **Fontaine S.**, Caddoux L., Roy L., Mottet C., Micoud A., 2012 - Puceron vert dans les colzas, les résistances évoluent. *Phytoma,* 656, 13-16.

3. Corio-Costet M.F., Dufour M.C., **Fontaine S**., Caddoux L., Micoud A., 2012 - Oïdium de la vigne, évolution de la résistance aux fongicides de 2008 à 2011. *Phytoma,* 655, 11-14.

4. Remuson F., **Fontaine S.**, Micoud A., Fraissinet-Tachet L., Marmeisse R., Melayah D., 2007 - Tavelure du pommier sa résistance aux strobilurines en France - Tests biologiques et moléculaires 2004-2006. *Phytoma,* 605, 41-45.

RAPPORTS TECHNIQUES

(Consultables sur : https://www.r4p- inra.fr/fr/rapports-techniques-sur-les-resistances- en-france/)

1. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2021. Développement d'une méthode de génotypage de la résistance de cible d'*Aphis fabae* vis-à-vis des pyréthrinoïdes sur pois maraîcher - Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5888893.

2. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2021. Développement d'une méthode de génotypage de la résistance de cible de *Peronospora destructor* vis-à-vis de la cyazofamide (QiI) sur oignon – Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5889445

3. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2021. Etat des lieux de la résistance de cible de *Myzus persicae* vis- à-vis des pyréthrinoïdes sur betterave ou colza – Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5889382.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

4. **Fontaine S.**, Caddoux L., Barrès B., 2021. Etat des lieux de la résistance de cible de *Myzus persicae* vis-à-vis des carbamates sur betteraves ou colza- Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5889346.

5. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2021. Recherche de l'émergence de la résistance de cible d'*Acyrthosiphon pisum* vis- à-vis des pyréthrinoïdes sur pois protéagineux – Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5888772.

6. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2021. Surveillance de l'évolution de la résistance de cible de *Plasmopara viticola* vis- à-vis des QioI (amétoctradine) sur vigne – Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5884675.

7. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2021. Surveillance de l'évolution de la résistance de cible de *Sitobion* avenae vis-à-vis des pyréthrinoïdes sur céréales – Bilan : Plan de surveillance 2020, Anses Lyon. https://doi.org/10.5281/zenodo.5888565.

8. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2019. *Acyrthosiphon pisum* sur pois protéagineux et maraicher et la résistance aux pyréthrinoïdes - Plan de surveillance 2019, Anses Lyon.

9. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2019. *Myzus persicae* / Betterave / pyréthrinoïdes - Bilan : Plan de surveillance 2019, Anses Lyon.

10. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2019. *Myzus persicae* / Betterave / carbamates - Bilan : Plan de surveillance 2019,

11. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2019. *Sitobion avenae* / résistance aux pyréthrinoïdes - Bilan : Plan de surveillance 2019, Anses Lyon.

12. **Fontaine S**., Caddoux L., Barrès B., 2018. Résistance aux SDHI chez *Erysiphe necator*, l'agent de l'oïdium de la vigne, Plan de surveillance 2017, Anses Lyon.

13. **Fontaine S.**, Caddoux L., Barrès B., 2018. Résistance aux Pyréthrinoïdes chez *Sitobion avenae* - Plan de surveillance 2017, Anses Lyon.

14. **Fontaine S**., Caddoux L., Remuson F., Le Guellec M., 2013. Résistance de la tavelure du pommier (*Venturia inaequalis*) vis-à-vis des Qol - Plan de Surveillance 2012 - Anses Lyon.

15. **Fontaine S.**, Caddoux L., Micoud A., 2013 - Méthodes de caractérisation des résistances de *Myzus persicae* aux carbamates, *aux pyréthrinoïdes et aux néonicotinoïdes*. *EuroRéférence,* 9, 20-24.

16. **Fontaine S**., Caddoux L., 2013. Résistance de l'Oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) vis-à-vis des Qol et des IDM - Plan de Surveillance 2012 - Anses Lyon. Anses Lyon.

17. **Fontaine S**., Caddoux L., 2013. Résistance des coquelicots (*Papaver rhoeas*) vis-à-vis des inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS) - Plan de Surveillance 2012 - Anses Lyon.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

18. **Fontaine S.**, Caddoux L., 2013. Résistance du carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) vis-à-vis des pyréthrinoïdes - Plan de Surveillance 2012 - Anses Lyon.

19. **Fontaine S**., Caddoux L., 2013. Résistance du puceron vert de pêcher (*Myzus persicae)* vis-à-vis des *pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes* - Anses Lyon. Anses Lyon.

TRAVAUX AYANT DONNES LIEU A DES COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

1. **Fontaine S.,** Caddoux L., Barrrès B., 2021**.** Résistance de cibles aux pyréthrinoïdes, carbamates et néonicotinoïdes et diversité génétique dans des populations de *Myzus persicae* en culture de betterave, Végéphyl - 12éme Conférence Internationale sur les ravageurs et auxiliaires en agriculture, Montpellier, France.

2. Caddoux L., **Fontaine S.,** Barrrès B., 2021. Les résistances de cible aux pyréthrinoïdes chez trois espèces de pucerons présentes en grandes cultures : A*cyrthosiphon pisum, Sitobion avenae et Aphis fabae,* Végéphyl - 12éme Conférence Internationale sur les ravageurs et auxiliaires en agriculture, Montpellier, France.

3. **Fontaine S.**, Remuson F., Caddoux L., Le Guellec M., Grosman J., Barrès B**.**, 2018. La résistance aux fongicides chez l'agent du mildiou de la vigne (*Plasmopara Viticola*) - Résultats des plans de surveillance de la DGAL-SDQSPV de 2015 à 2017, Végéphyl - 12éme Conférence Internationale sur les maladies des plantes, Tours, France, 1-11.

4. Plantamp C., Benhamou S., Mottet C., Segura E., Caddoux L., **Fontaine S**., Barrès B**.**, 2018. The importance of host specialization in insecticide resistance of the green peach aphid *Myzus persicae*, Meeting of Evolution 2018, Montpellier, France.

5. Remuson F., Le Guellec M., **Fontaine S**., Caddoux L., Couleaud G., Maufras J.-Y., Barrès B., 2018. Evaluation de la résistance aux SDHI chez des populations de *Pyrenophora Teres* (*Ana.Helminthosporium Teres*) sur orge, Végéphyl - 12ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes, Tours, France.

6. Barrès B., Capderrey C., Rohrlich C., **Fontaine S**., Micoud A., Simon J.C., 2015. Dynamics of insecticide resistance alleles in the green peach-potato aphid *Myzus persicae*., UK-French joint meeting on Aphids, Paris, France.

7. **Fontaine S.**, Caddoux L., Micoud A., Grosman J., Magnien C., Dufour M.-C., Corio-Costet M.F., 2012. Le point sur les résistances, liées à des mutations de cible, vis à vis des inhibiteurs de la 14 - demethylase et des strobilurines chez E*rysiphe necator*. Bilan de quatre années de suivi, AFFP - 10ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, France, 269-279.

8. Roy L., **Fontaine S**., Caddoux L., Micoud A., Simon J.-C., 2011. Structure des populations de *Myzus persicae* et dispersion de gènes de résistance, AFFP - 9ème Conférence Internationale sur les ravageurs en Agriculture, Montpellier, France.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

9. **Fontaine S.**, Caddoux L., Brazier C., Mottet C., Bertho C., Bertolla P., Morignat E., Micoud A., Roy L., 2011. Les résistances de cible aux carbamates et pyréthrinoïdes chez le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae)* sur colza état des lieux en 2009 et 2010, AFFP - 9ème Conférence Internationale sur les ravageurs en Agriculture, Montpellier, France.

10. Brazier C., **Fontaine S**., Micoud A., Mottet C., Speich P., Marmeisse R., Melayah D., Frayssinet-Tachet L., Sauphanor B., Franck P., 2008. Resistance of the codling moth (*Cydia pomonella*) to diflubenzuron and to pyrethrinoids situation in 2007, AFPP - 8ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Montpellier SupAgro, France, 457-465.

11. Brazier C., **Fontaine S**., Micoud A., Mottet C., Speich P., Marmeisse R., Melayah D., Fraissinet-Tachet L., Sauphanor B., Franck P., 2008. Résistance au carpocapse des pommes *(Cydia pomonella*) au diflubenzuron et aux pyrethrinoides : le point en 2007, AFPP - 8ème conférence internationale sur les ravageurs en agriculture Montpellier, France, 9.

TRAVAUX AYANT DONNES LIEU A DES POSTERS

1. **Fontaine S**., Caddoux L., Lucas P., Blanchard Y., Barrès B., 2024. High-throughput sequencing approach to detect and quantify mutations involved in resistance to sterol demethylation inhibitors in *Cercospora beticola*. Conférence Résistance 2024. Harpenden, Royaume Uni.

2. Mottet C., Caddoux L., **Fontaine S**., Plantamp C., Bass C., Barrès B., 2024. Teasing apart the contributions of the different mechanisms involved in *Myzus persicae* resistance to neonicotinoid. Resistance 2024. Rothamsted, Royaume-Uni.

3. **Fontaine S.**, Caddoux L., Del Negro R., Blouquy L., Walker A.-S., Barrès, B., 2023. Effect of CYP51 gene expression levels and haplotype diversity on resistance phenotypes of field isolates of *Cercospora beticola*. 12th International Congress of Plant Pathology. Lyon, France.

4. **Fontaine S**., Remuson F., Caddoux L., Barrès B., 2018. Détection d'un cas résistance au carbendazime chez l'agent du chancre du pêcher et de l'amandier (*fusicoccum amygdali*) en France, Végéphyl - 12éme Conférence Internationale sur les maladies des plantes, Tours, France, 1-8.

5. Dufour M.-C., **Fontaine S.**, Micoud A., Corio-Costet M.-F., 2009. Mise au point d'outils de q-PCR pour la détection et la quantification des deux groupes génétiques (A, B), de la résitance aux DMIs et aux QOIs chez l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) en France, AFPP - 9ème conférence Internationale sur les maladies des plantes, Tours, France, 1-10.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

6. **Fontaine S**., Remuson F., Micoud A., Fraissinet-Tachet L., Melayah D., Mermeisse R., 2006. Travelure du pommier (*Venturia inaequalis*) : détection de la résistance aux strobilurines par test biologique et par PCR-RFLP, AFPP - 8ème conférence internationale sur les maladies des plantes Tours, France, 1-6.

ENCADREMENT D'ETUDIANTS

Etudiants d'IUT

- 2020 : encadrement de Manon De Andrade en 2ème année de l'IUT d'Agronomie de Lyon 1 sur la détection et quantification de l'espèce *Botrytis pseudocinerea* au sein du complexe d'espèces *Botrytis spp*.
- 2019 : encadrement de Camille Bosson en 2ème année de l'IUT d'Agronomie de Lyon 1 sur la recherche de résistance de cible aux herbicides inhibiteurs de l'Acétolactate Synthase dans des populations de plantes d'Ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*) par séquençage haut débit.
- 2012 : encadrement de Claire PONS DE VINCENT en 2*ème* année de l'IUT d'Agronomie de Lyon 1 sur l'apparition des coquelicots (*Papaver rhoeas*) résistants aux herbicides inhibiteurs de l'acétolactate synthase en grandes cultures.
- 2011 : encadrement de Nelly Queruel en 2ème année de l'IUT d'Agronomie de Lyon 1 sur la recherche et caractérisation d'une résistance de cible aux pyréthrinoïdes chez le puceron vert du pêcher collecté sur colza (*Brassica napus* var. *napus*).
- 2010 : encadrement de Corentin Bertho en 2ème année de l'IUT d'Agronomie de Lyon 1 sur la recherche de résistance de cible aux pyréthrinoïdes et aux carbamates chez le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*) collecté sur colza (*Brassica napus* var. *napus*).

Etudiants en Licence

- 2020 : encadrement de Sarah Duchamp De Chastaigne en 3ème année de licence Sciences de la vie à l'ESTBB (École Supérieure de Biologie Biochimie Biotechnologies) sur la résistance de cible des pucerons verts du pêcher (*Myzus persicae*) aux néonicotinoïdes.
- 2013 : encadrement de Camille Marx en 2ème année d'assistant ingénieur à l'ESTBB (École Supérieure de Biologie
- Biochimie Biotechnologies) sur la résistance de cible aux carbamates, aux pyréthrinoïdes et aux néonicotinoïdes dans des populations de *Myzus* persicae vivant en culture de pêcher.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

- 2012 : encadrement de GHALMI Axel en 2ème année d'assistant ingénieur à l'ESTBB (École Supérieure de Biologie Biochimie Biotechnologies) sur les résistances de cible aux pyréthrinoïdes et aux néonicotinoïdes chez *Myzus persicae*.

Etudiants en Master

- 2022 : encadrement de Romain Del Negro en Master 2 de biologie végétale à l'université Lyon 1 sur l'implication de la surexpression du gène *Cyp51* dans la résistance aux triazoles de souches de *Cercospora beticola* isolées en France.

- 2018 : encadrement de Lucile Gonnon en Master 2 de Biologie Biochimie Biotechnologies de l'ESTBB (École Supérieure de Biologie Biochimie Biotechnologies) sur l'occurrence et coût biologique de la résistance à l'amétoctradine chez *Plasmopara viticola*, agent pathogène responsable du mildiou de la vigne.

- 2003-2004 : co-encadrement de Yohann Confais apprenti en Master à l'EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes) sur l'étude de la résistance de *Venturia inaequalis* à différentes familles chimiques de fongicides.

ÉVALUATION D'ARTICLES (REVIEWING)

Pour les revues : Acaralogia (2), Journal of Economic Entomology (1), Plant disease (1), Plant Protection Science (1), PLOS ONE (1) et Scientific Reports (1).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

PARTIE II

PRESENTATION ET ANALYSE DES RECHERCHES ACCOMPLIES

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

ELEMENTS DE CONTEXTE

L'utilisation de produits de protection des plantes (PPP), a représenté pour les hommes un moyen de préserver l'état sanitaire des cultures afin de sécuriser leurs ressources alimentaires. Historiquement, les produits utilisés étaient des composés minéraux et organiques tels que l'arsenic, le cuivre ou le soufre, dont les premières traces d'utilisation remonteraient à l'Antiquité. Le soufre est, par exemple, cité pour lutter contre les champignons par Homère en 750 avant J.-C. (Matthews, 2018). A partir du Moyen Age, à l'utilisation de ces composés minéraux et organiques s'ajoute peu à peu le recours à des extraits de plantes (Maïmonide a rédigé en 1135 un Traité des poisons). L'avènement de la chimie au cours du XXe siècle a permis le développement de l'utilisation des pesticides, à base de molécules de synthèse (Matthews, 2018). Ces produits ont accompagné la révolution verte et le développement d'une agriculture intensive. Avec la sélection variétale et la fertilisation, ils ont fortement contribué à l'augmentation des productions agricoles et des rendements (Figure 1), nécessaires pour faire face à la croissance démographique.

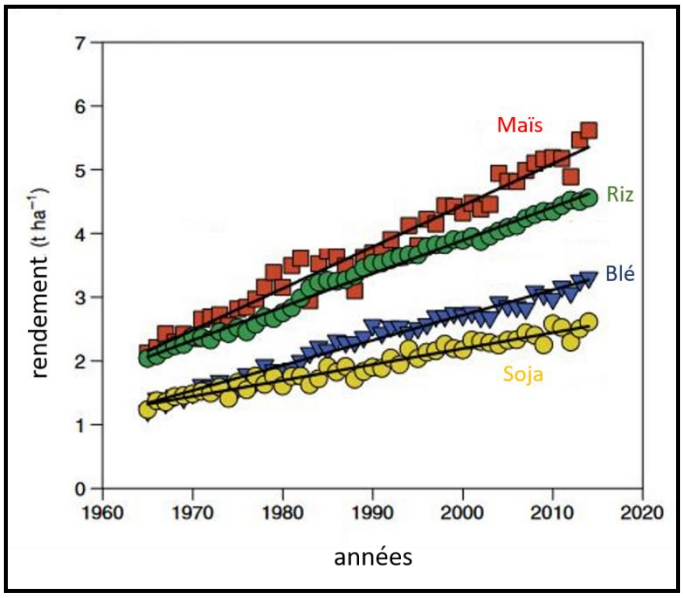


Figure 1 : Évolution des rendements de 4 grandes cultures vivrières depuis 1960 (adaptée de Cassman et Grassini, 2020).

Les agents ciblés par les PPP concernent des organismes très divers qui sont regroupés sous le terme de bioagresseurs des cultures. Ces bioagresseurs sont des organismes vivants nuisibles pour les plantes cultivées ou pour les récoltes. Ils se répartissent selon trois grandes catégories :

- les adventices, qui sont des plantes qui vont concurrencer les cultures en puisant dans les ressources hydriques et nutritionnelles de l'agrosystème, voire en limitant l'accès de la culture à la lumière ;
- les ravageurs, tels que les insectes, les acariens, les nématodes, les gastéropodes, oiseaux, rongeurs (…). Ils sont responsables de dégâts directs sur les cultures mais également, pour certains, de dégâts indirects via la transmission de virus. Dans le cadre de l'étude des résistances aux insecticides, le terme ravageur pourra être

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

utilisé dans ce manuscrit pour désigner plus précisément les insectes et les acariens.

- les organismes phytopathogènes qui sont susceptibles d'infecter les plantes et de déclencher des maladies chez les végétaux, tels que les champignons, les bactéries, les oomycètes, et les virus. Dans le cadre de l'étude des résistances aux fongicides, le terme d'agent phytopathogène pourra être utilisé dans ce manuscrit pour désigner les champignons et les oomycètes phytopathogènes.

Le recours à des PPP, en préservant les cultures des bioagresseurs, a été extrêmement bénéfique pour assurer et sécuriser la disponibilité en denrées agricoles. Mais l'utilisation généralisée de ces produits s'est accompagnée d'effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine (Rani et al, 2021). Ces effets indésirables sont regroupés sous le terme d'effets non intentionnels (ENI). Au niveau environnemental, les pesticides peuvent être à l'origine de la contamination des sols (Silva et al, 2019) et/ou de l'eau (Rad et al, 2022). Ils peuvent également induire une diminution de la biodiversité (Aktar et al, 2009) car la toxicité vis-à-vis des organismes ciblés peut aussi s'exercer sur de nombreux autres organismes vivants, tels que les oiseaux (Hallmann et al, 2014), les arthropodes (Serrão et al, 2022), les planctons et les poissons (Kumar et al, 2023). L'utilisation intensive des PPP peut aussi conduire à d'autres ENI tels que l'évolution de résistance chez les bioagresseurs visés qui vont ainsi être capables de survivre au traitement appliqué.

Une prise de conscience de l'impact environnemental et sanitaire des PPP a peu à peu émergé notamment à la suite de la publication de l'ouvrage « *Silent Spring* » en 1962, dans lequel l'écologue américaine Rachel Carson mettait en garde sur les dangers que les pesticides, en particulier le DDT, représentent pour la santé humaine et l'environnement. Ces changements de perception des conséquences de l'utilisation des PPP a conduit peu à peu les pays à mettre en œuvre des mesures pour encadrer et limiter leur utilisation. Initialement, la procédure d'autorisation de mise sur le marché en France pour les pesticides était centrée sur l'étude de l'efficacité des produits. Elle s'est graduellement durcie et impose actuellement aux industriels la prise en compte des risques environnementaux et sanitaires (Jouzel et Prete 2022). Aujourd'hui, en France, d'un point de vue réglementaire, le terme de PPP comprend tous les produits qui permettent de détruire, de repousser ou de rendre inoffensifs les bioagresseurs des cultures ou des plantes cultivées. Ils se répartissent selon plusieurs catégories (Encadré 1) en fonction de leur origine naturelle ou de synthèse, leur utilisation possible ou non en agriculture biologique et des risques que leur utilisation engendre sur l'environnement ou la santé humaine. Selon le mode d'action du PPP ainsi que les caractéristiques du bioagresseur le risque d'évolution de résistance sera différent (Jutsum et al, 1998 ; Moss et al, 2019 ; Grimmer et al, 2014 ; Grimmer et al 2015).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Encadré 1 : Classification règlementaire des produits de protection des plantes en France

Les préparations naturelles peu préoccupantes, utilisables en agriculture biologique, comprennent une ou plusieurs substances de base à faible risque (non persistante, à faible bio-concentration et sans effet perturbateur endocrinien) ou des substances naturelles à effet biostimulant. **Les substances de base** sont des substances naturelles qui peuvent être utilisées à des fins phytopharmaceutiques en agriculture pour protéger les cultures mais cela n'est pas leur vocation première. Dans cette catégorie, il y a par exemple le vinaigre comme fongicide et bactéricide en traitement des semences ou désinfection du matériel. **Les substances naturelles à effet biostimulant** stimulent les processus naturels des plantes pour améliorer l'absorption des nutriments ou la tolérance aux stress abiotiques et la qualité des cultures. Le purin d'ortie fait par exemple partie de cette catégorie de produits.

Les produits de biocontrôle regroupent les agents ou les produits utilisant des mécanismes naturels dans le cadre de la lutte intégrée contre les ennemis des cultures. Dans cette catégorie on peut lister les insectes auxiliaires, les produits composés de micro-organismes (bactéries, virus ou champignons), des médiateurs chimiques (phéromones et kairomones), ou des substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale. Certains de ces produits sont utilisables en agriculture biologique.

Les produits phytopharmaceutiques (ou PPP de synthèse) sont, selon la commission européenne, des substances d'origine non naturelle qui protègent les cultures ou les plantes désirables ou utiles. Ces produits ne sont pas autorisés en agriculture biologique. Ils contiennent au moins une substance active de synthèse qui permet :

- de protéger les plantes ou les produits végétaux contre les ravageurs et maladies ;
- de détruire ou d'empêcher la croissance de plantes ou de parties de plantes indésirables ;
- de conserver les produits végétaux ;
- d'influencer les processus vitaux des plantes à l'exclusion des nutriments.

Adapté de https://draaf.bourgogne-franche-comte.agriculture.gouv.fr/les-differentes-categories-de-produits-de-protection-des-plantes-autorises-en-r364.html

L'évolution de résistance chez les bioagresseurs ciblés est donc l'une des conséquences de l'utilisation intensive des PPP qui conduit à la survie d'un bioagresseur à un traitement normalement létal. C'est un processus micro-évolutif, qui est observé pour tous les types d'antimicrobiens utilisés en santé humaine, animale ou végétale : les antifongiques, les antiparasitaires, les antiviraux ou les antibiotiques (Consortium REX, 2013). Ces phénomènes de résistance peuvent compromettre la prévention et le traitement efficace d'un nombre important d'infections dues à des bactéries, des parasites, des virus et des champignons que cela soit en santé humaine, animale ou végétale. Depuis 2018, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation mondiale de la santé animale

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

(OIE) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) se sont d'ailleurs unies dans le cadre d'une alliance tripartite afin de renforcer l'attention portée à la résistance aux antimicrobiens avec une approche plus globale.

Dans le domaine agricole, le premier cas de résistance à un pesticide documenté, remonte au début du 20ième siècle. Il concernait la résistance du pou de San José (*Diaspidiotus perniciosus*) à la chaux soufrée (Mellander, 1914). Pour les fongicides, les premiers constats de résistance remontent aux années 1960 avec des échecs de traitement à base de mercure pour lutter contre l'agent causal de la rayure de l'orge, *Pyrenophora graminea* (Noble et al, 1966). Chez les adventices, initialement contrôlées par un désherbage manuel et le travail du sol, les premiers cas de résistance documentés concernent une molécule de synthèse, la triazine, chez le séneçon commun (*Senecio vulgaris*) (Ryan, 1970).

Le développement de molécules de synthèse, avec des modes d'action plus spécifiques comparés aux composés organiques, s'est accompagné d'une augmentation de cas de résistance chez les différents règnes de bioagresseurs (Figure 2) et vis-à-vis des différentes familles de molécules. Par exemple, en pomiculture, deux espèces de bioagresseurs majeurs ont évolué des résistances à de nombreux PPP. Chez *Venturia inaequalis*, l'agent de la tavelure du pommier, et chez *Cydia pomonella*, le carpocapse des pommes, des résistances ont été reportées à sept familles de fongicides et onze familles d'insecticides, respectivement. Les délais de détection des résistances varient de quelques années à 50 ans après l'introduction de l'utilisation des modes d'action aux vergers (Tableau 1). Dans certains cas, la résistance était présente avant même l'introduction des nouvelles molécules car le mécanisme n'était pas spécifique d'un mode d'action donné. Ces deux exemples illustrent les capacités évolutives de certains bioagresseurs de cultures qui peuvent conduire à des difficultés drastiques de contrôle de maladies ou de ravageurs pour les professionnels.

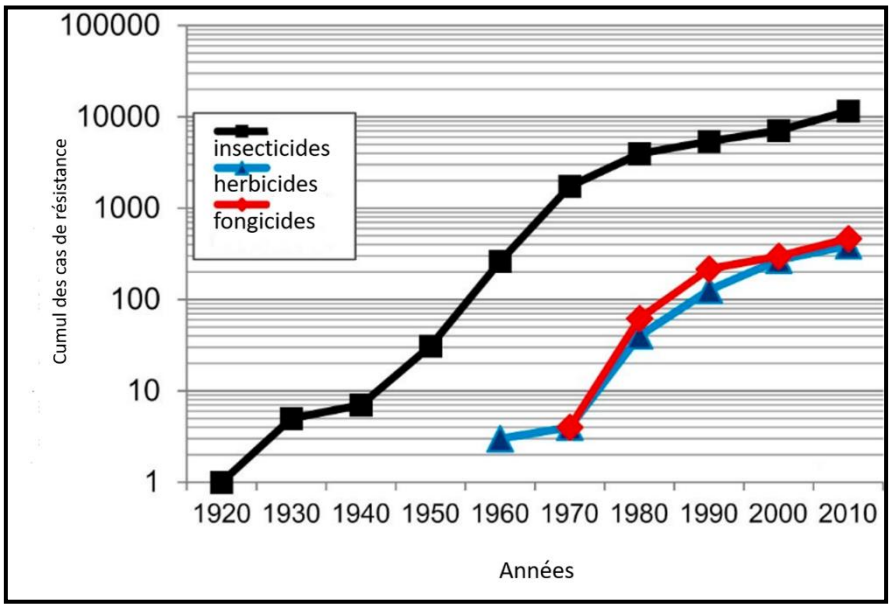


Figure 2 : Évolution du nombre de cas répertoriés de résistances aux insecticides (en noir), herbicides (en bleu) et fongicides (en rouge) de 1920 à 2010 (Figure adaptée de Sparks et Nauen, 2015).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Bioagresseur	Classe de PPP	Mode d'action	Signalement	Délai d'émergence	Référence
 ***Venturia inaequalis***	Guanidines	Perturbation de la membrane cellulaire (suspectée)	1969	≈ 10 ans	Szkolnik et Gilpatrick – 1973
	Benzimidazoles carbamates	Microtubules du fuseau achromatique *β*-tubuline	1976	≈ 6 ans	Jones et Walker, 1976
	IDM	Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols par inhibition de la 14α-déméthylase	1985	≈ 10 ans	Stanis et Jones 1985
	QoI-P	Inhibiteur du cytochrome bc1 – (fixation sur le site quinone externe)	2002	≈ 5 ans	Färber et al, 2002
	Anilinopyrimidines	Biosynthèse des acides aminés - protéine cible inconnue	2005	≈ 10 ans	Micoud et Remuson, 2006
	SDHI	Inhibiteurs du succinate deshydrogénase	2014	7-8 ans	FRAC
	Multisites	Multisites (dithianon et captane)	2022 (suspicion)	≈ 50 ans	Chatzidimopoulos et al, 2022
 ***Cydia pomonella***	Arséniate de plomb	Multisites	1928	≈ 25 ans	Hough, 1928
	DDT	Modulation ou ouverture du canal sodium	1951	≈ 10 ans	Glass et Fiori, 1955
	Benzoyl-urées	Biosynthèse de la chitine -cible inconnue	1988	≈ 10 ans	Moffit et al, 1988
	Pyréthrinoïdes	Ouverture du canal sodium	1990s	≈ 10 ans	Sauphanor et al, 1997
	Organophosphorés	Inhibition de l'acétylcholinestérase	1993	≈ 30 ans	Varela et al, 1993
	Diacylhydrazides	Interaction avec le récepteur de l'ecdysone	1994	Déjà présente*	Sauphanor et Bouvier 1995
	Lactones microbiennes ou semi-synthétiques (spinosynes et spinosoïdes)	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine -ouverture du canal ionique (activation allostérique)	2003/2004	Déjà présente*	Reyes et al, 2007
	Néonicotinoïdes	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine	2003/2004	Déjà présente*	Reyes et al, 2007
	Phénoxyphényléthers (Alkylcarbamates)	Mimétiques des hormones juvéniles - cible inconnues	2003	≈ 20 ans	Reye et al, 2007
	Bacilovirus Isolats M (puis R5)	membranes de l'intestin moyen	2005	≈15 ans	Sauphanor et al, 2006
	Lactones microbiennes ou semi-synthétiques (avermectines)	Activation du canal chlore glutamate-dépendant	2003/2004	Déjà présente*	Reyes et al, 2007

Tableau 1 : Cas et délais d'émergence des résistances vis-à-vis de différents PPP chez deux bioagresseurs majeurs en pomiculture, *Venturia inaequalis* et *Cydia pomonella*.

*Résistance croisée avec d'autres insecticides

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les difficultés de contrôle de bioagresseurs liées à l'évolution de résistances ont été, par le passé, assez facilement résolues par le développement et la mise sur le marché de nouvelles molécules de synthèse avec des modes d'action différents. Mais les innovations en termes de protection des plantes ont dû faire face à de nouvelles contraintes règlementaires rendant le développement et l'homologation de nouvelles molécules à la fois plus complexes et plus coûteuses. Le phénomène des résistances aux PPP est ainsi devenu une préoccupation majeure. D'une part, pour les professionnels de l'industrie phytopharmaceutique afin de préserver au maximum la durabilité de leurs produits et, d'autre part, pour les autorités et les utilisateurs afin d'assurer la rentabilité et la qualité des productions agricoles ainsi que la viabilité des filières. A titre d'exemple, en Europe, depuis 1991, le risque de résistance doit être pris en compte dans le processus d'homologation et lors de l'utilisation des PPP. Les directives européennes (n° 91/414/EEC puis 94/37/EC), qui établissent les règles pour la commercialisation des produits phytopharmaceutiques, exigent que les dossiers d'homologation fournissent des informations concernant l'évolution possible de résistance à la molécule. Ces dossiers doivent également fournir des éléments pour la mise en œuvre de mesures afin d'éviter l'évolution de résistances et d'éventuellement planifier des stratégies de leur gestion. Ces directives ont été par la suite complétées par la rédaction de lignes directrices publiées par l'OEPP (Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes) dès 1999 afin d'aider les demandeurs à construire et les régulateurs à interpréter un dossier d'homologation en tenant en compte des phénomènes de résistance (Russel, 2001).

En plus de la prise en compte du risque d'évolution des résistances dans les dossiers d'homologation, le suivi au terrain de ce phénomène s'avère indispensable pour appréhender l'évolution de la sensibilité des bioagresseurs au cours de la période d'homologation du PPP. A l'origine, les résistances ont été mises en évidence par des chercheurs. Aujourd'hui, les dispositifs de surveillance dans le monde reposent encore largement sur les universitaires mais également sur les firmes phytopharmaceutiques (R4P-network, 2021). En France, la surveillance des résistances s'est finalement traduite, dans les années 2000**,** par la mise en place d'un plan de surveillance national diligenté par la direction générale de l'alimentation (DGAL) du ministère de l'agriculture. Cette surveillance doit favoriser une détection précoce des individus résistants afin de limiter leur augmentation en fréquence, ce qui pourrait conduire à des échecs de traitements au champ. Face à ces échecs, les agriculteurs peuvent être amenés à accroître le nombre d'applications ou les doses avec de potentiels impacts néfastes au niveau environnemental. Faire un lien direct entre résistance et l'augmentation des traitements reste néanmoins très délicat à mettre en évidence. En effet, les traitements sont également réalisés en fonction de nombreux autres facteurs et sont notamment très dépendants des conditions climatiques favorables ou non au développement des bioagresseurs.

Bien qu'il soit complexe d'évaluer précisément les coûts économiques et environnementaux engendrés par les résistances, il est probable que ceux-ci soient non négligeables. En effet, la résistance aux pesticides peut se traduire par des pertes de rendement, une baisse de la qualité des productions et des applications de traitements supplémentaires inefficaces et coûteuses tant d'un point vue économique qu'environnemental. Aux Etats-Unis, les coûts de la résistance aux pesticides liés aux pertes de récoltes et à l'application des traitements supplémentaires étaient estimés de 3,2 à 9,2

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

milliards de dollars (Palumbi, 2001). Dans certaines situations, la résistance des bioagresseurs peut conduire à des impacts économiques très dommageables et fragiliser l'ensemble d'une filière de production comme ce fut le cas dans le nord du Texas, à la fin de des années 1960, pour la filière du coton (Adkisson et al, 1982).

Surveiller les phénomènes de résistance aux PPP est donc essentiel pour maintenir un contrôle efficace des bioagresseurs tout en rationnalisant leurs applications. Une détection précoce peut permettre la mise en place de moyens de gestion de la résistance par l'adaptation des pratiques au terrain afin de prolonger la durabilité des produits. Mais lier une baisse d'efficacité d'un produit au champ à l'évolution d'une résistance reste complexe. Une inefficacité observée au terrain peut-être la conséquence d'une mauvaise application (erreur de dose, conditions environnementales défavorables, mauvais positionnement du traitement…) et par conséquent l'échec d'un traitement au champ n'est pas forcément la conséquence d'une résistance. Les laboratoires, en travaillant dans des conditions normalisées et contrôlées, s'affranchissent des conditions d'applications ou des variations environnementales. Ils ont donc un rôle primordial dans la détection et le suivi des résistances aux produits de protection des plantes. Néanmoins, les analyses liées aux résistances aux PPP réalisées dans les laboratoires privés sont généralement effectuées à la demande de firmes qui commercialisent des PPP, et qui sont parfois peu enclines à communiquer leurs résultats. Une surveillance indépendante des phénomènes de résistance est essentielle. Elle repose majoritairement dans le monde sur des projets de recherche universitaires (R4P-network 2021). En France, une surveillance officielle diligentée par la DGAL est réalisée par des laboratoires publics Anses et INRAE. La DGAL définit annuellement les thématiques du plan de surveillance en fonction des situations remontées du terrain. Les laboratoires publics assurent les analyses et transmettent les résultats à la DGAL. Cette organisation assure une indépendance tant pour le choix des PPP étudiés que dans la communication des résultats. Cela permet également de maintenir une expertise publique dans ce domaine complexe aux enjeux multiples.

Initialement, les analyses réalisées au laboratoire reposaient sur des approches biologiques qui permettent de déterminer la sensibilité à une molécule létale d'un individu ou d'une population provenant du terrain, et de comparer cette sensibilité à celle connue pour des individus ou des populations de référence (Bloomquist et Miller, 1985). Des approches biochimiques ont commencé également à être utilisées afin de mesurer des modifications d'activité chez les enzymes ciblées par le pesticide ou chez des enzymes capables de dégrader la molécule létale (Brogdon, 1989). Avec le développement de la biologie moléculaire, des approches visant à rechercher des marqueurs génétiques de la résistance sont venues compléter les méthodes biologiques et biochimiques. Les techniques de biologie moléculaire ont offert de nouvelles opportunités dans la détection, la caractérisation et la surveillance des phénomènes de résistance aux PPP (Ma et Michailides, 2005). Chacune des approches biologiques, biochimiques et biomoléculaires présentent des atouts et des contraintes qui seront discutés dans le chapitre dédié aux différentes approches analytiques pour l'étude des résistances aux PPP au laboratoire.

Dans le cadre de mes travaux réalisés au sein de l'USC CASPER, les outils de biologie moléculaire ont souvent participé à une meilleure compréhension et connaissance des phénomènes de résistance observés au sein des agrosystèmes. Une partie des travaux que j'ai réalisés avec ce type d'approche sera présenté dans ce manuscrit. L'objectif est d'illustrer les

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

apports et opportunités offertes par les outils de biologie moléculaire dans la détection, la surveillance et la caractérisation des phénomènes de résistance aux produits de protection des plantes, que cela soit à l'aide d'outils de biologie moléculaire bas débit (PCR, séquençage Sanger, …) ou de nouvelle génération (séquençages à haut débit).

Après avoir introduit et exposé les connaissances actuelles sur les résistances aux PPP, je présenterai mes travaux qui s'articuleront autour des trois chapitres suivants :

I- Quelles contributions apportent les outils de biologie moléculaire à la détection et au suivi des résistances ?

Dans cette partie je présenterai deux publications portant sur la résistance aux fongicides inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire chez deux organismes phytopathogènes majeurs de cultures pérennes. La première publication concernera le champignon *Venturia inaequalis,* agent causal de la tavelure du pommier et la seconde, le pseudochampignon *Plasmopara viticola,* l'agent causal du mildiou de la vigne.

II- Quelles sont les contributions des connaissances issues de la caractérisation des mécanismes sous- jacents aux phénomènes de résistance aux PPP pour la mise en œuvre de mesures de gestion ?

Pour cela je présenterai deux publications caractérisant des mécanismes de résistance qui ont évolué chez un ravageur polyphage : le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*.

III- Quelles perspectives et opportunités sont offertes par les techniques de séquençage à haut débit dans le cadre de la surveillance des résistances aux PPP ?

Pour cette partie je m'appuierai sur deux publications dans lesquelles des approches de séquençage à haut débit ont été déployées à des fins de surveillance : la première concernera une plante adventice, l'ambroisie à feuilles d'armoise, *Ambrosia artemisiifolia*, et la seconde un champignon ascomycète *Cercospora beticola,* agent causal de la cercosporiose de la betterave.

Le manuscrit sera complété par une discussion sur les nouveaux enjeux et défis afférant à la surveillance des résistances aux PPP et par la présentation de mes perspectives de recherche.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

INTRODUCTION

La résistance à un PPP est un phénomène évolutif conséquence de l'application répétée d'une molécule généralement létale sur des populations de bioagresseurs. Ces applications répétées vont exercer une pression de sélection et éliminer préférentiellement les génotypes les plus sensibles (Comins, 1977). Initialement très rares, les génotypes les moins sensibles vont augmenter en fréquence dans les populations traitées au détriment des génotypes les plus sensibles (Figure 3). Le réseau R4P (Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides), qui est constitué de chercheurs INRAE et de l'Anses spécialisés dans l'étude des phénomènes de résistance aux PPP, définit la résistance biologique comme : « la capacité héritable d'un individu d'une espèce de bioagresseur à survivre à un traitement de produit de protection des plantes appliqué correctement**.** Lorsqu'un individu est résistant à un produit de protection des plantes, il ne sera pas (ou peu) affecté par le traitement, et sera capable de produire une descendance viable » (https://www.r4p-inra.fr/fr/quest-ce-que-la-resistance-aux-ppp/).

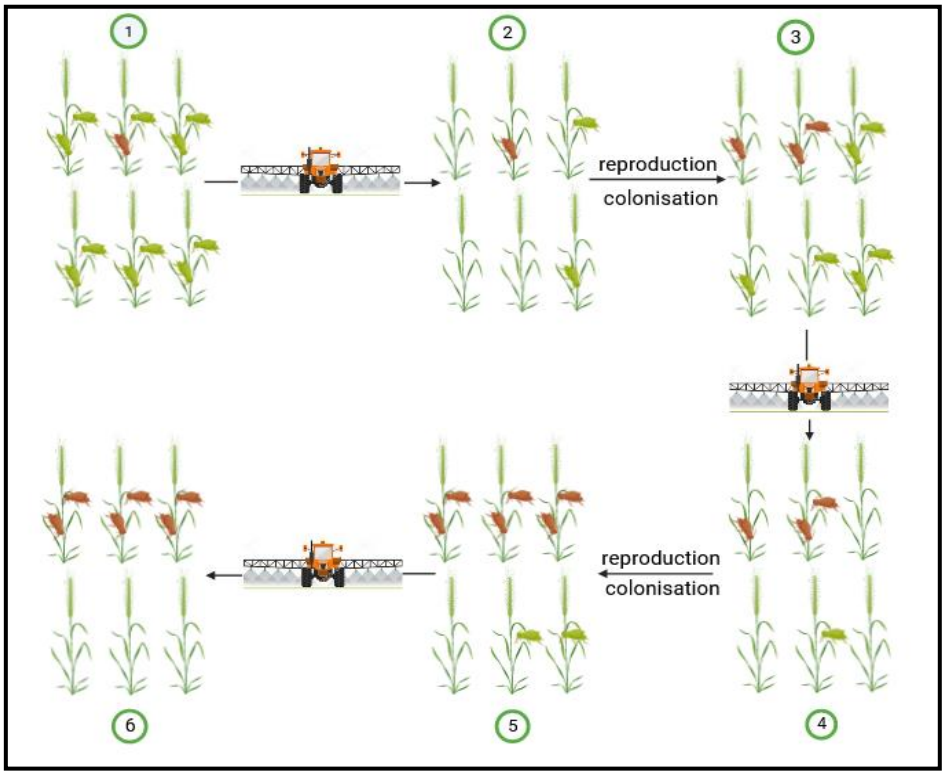


Figure 3 : Représentation schématique de l'évolution de la résistance à un produit de protection des plantes. Les pucerons verts et marron représentent les individus sensibles et résistants au traitement de PPP, respectivement. Après l'application de l'insecticide, la majorité des individus sensibles est éliminée, les individus résistants survivent (2) et vont pouvoir se reproduire en transmettant le caractère résistant à leur descendance. Après (re-)colonisation de la culture et reproduction des pucerons (3), une nouvelle application d'insecticide va de nouveau éliminer les individus sensibles et sélectionner les individus résistants qui vont de nouveau pouvoir se reproduire (4) et coloniser de nouvelles plantes (5). La proportion d'insectes résistants augmente peu à peu dans la population traitée jusqu'à aboutir à une inefficacité du traitement au champ (6). (Figure réalisée à l'aide de BioRender - https://app.biorender.com/).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette définition reste en partie très semblable à celles utilisées par les trois comités interprofessionnels internationaux d'action sur les résistances, appelés RAC (« *Resistance Action Committees* ») (Encadré 2), dont l'objectif est de gérer de manière proactive la problématique des résistances pour les trois grands groupes de pesticides. Ces RAC sont des groupes techniques de « CropLife International », une fédération internationale regroupant les entreprises du secteur de la protection des cultures et des biotechnologies. L'objectif de ces RAC est *in fine* de prolonger l'efficacité des PPP et de promouvoir les pratiques pour la gestion des résistances. Chacun de ces comités définie la résistance de façon spécifique. La définition de l'IRAC se distingue des autres du fait qu'elle englobe l'observation des pertes d'efficacité au champ. Or, la résistance biologique d'un bioagresseur n'est pas forcément accompagnée d'une perte d'efficacité au terrain (soit parce que la proportion d'individus résistants est trop faible pour impacter le contrôle de la population et/ou parce que le niveau de résistance qui a évolué est trop faible (Dennehy et al, 1987)). Le terme de résistance en pratique est généralement utilisé lorsque la caractérisation d'une résistance biologique à une substance active s'accompagne de pertes d'efficacité au champ.

Encadré 2 : La résistance aux PPP définie selon les différents RAC.

- l'HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) définit la résistance aux herbicides par « la capacité d'un biotype de mauvaise herbe à survivre à une application d'herbicide, alors que dans des circonstances normales, cet herbicide appliqué à la dose recommandée tuerait la mauvaise herbe ».
- Le FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) se réfère à : « une réduction acquise et héréditaire de la sensibilité d'un champignon à un agent antifongique spécifique ».
- l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), privilégie la notion de « changement héréditaire dans la sensibilité d'une population d'organismes nuisibles qui se traduit par l'incapacité répétée d'un produit à atteindre le niveau de contrôle escompté lorsqu'il est utilisé conformément aux recommandations de l'étiquette pour cette espèce d'organisme nuisible ».

Étudier et surveiller les résistances a donc pour visée de prévenir l'évolution de résistances en pratique. De ce fait, connaître quels sont les mécanismes évolutifs et moléculaires en jeu dans l'émergence et la propagation de la résistance apporte des éléments essentiels à l'évaluation des risques liés à la résistance et aux stratégies de gestion de ces résistances.

1. L'origine de la résistance

1.1. Les théories évolutives sur les résistances aux PPP

L'évolution des résistances est un exemple des conséquences directes des activités anthropiques sur l'environnement (Palumbi, 2001). Comme introduit plus haut, l'application répétée d'une substance létale sur des bioagresseurs des cultures conduit à la sélection, par

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

l'élimination préférentielle des génotypes sensibles, des individus les plus adaptés à ces conditions environnementales, c'est-à-dire les génotypes moins sensibles. Ces individus présentent au moins un changement dans leur génome qui leur confère la capacité de résister à une molécule normalement létale à la dose d'application. Cette modification génétique ou mutation est irréversible et peut être une substitution, une insertion ou une délétion nucléotidique, une duplication de gène ou le déplacement d'un transposon. De nombreux débats sur l'importance relative des changements génétiques (polygéniques et monogéniques) au cours du processus adaptatif ainsi qu'à leur origine ont eu lieu. Les processus de sélection peuvent s'exercer sur la variation génétique déjà présente au sein des populations. La présence de la ou des mutation(s) dans une population antérieurement à l'application du pesticide est la conséquence de mutations aléatoires (mutagénèse naturelle) qui peuvent affecter un génome, à tout moment et à n'importe quelle position (Hawkins et al, 2019). Le caractère aléatoire de ces mutations contribue à la diversité biologique. Elles ne sont pas nécessairement la conséquence de l'adaptation à un environnement mais consécutives d'anomalies dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN (Glickman et al, 1986). L'impact d'une mutation dépendra donc des conditions dans lesquelles vit l'individu. Souvent neutres, les fréquences de ces allèles mutés vont évoluer de manière aléatoire au cours du temps dans une population. Mais certains individus pourront être sélectionnés dans un environnement donné car porteurs, dans ces conditions, d'un avantage sélectif assurant un meilleur taux de survie et de reproduction des génotypes mutés (Grégory, 2009). La diversité engendrée par les mutations est donc essentielle à la survie d'une population, puisqu'en l'absence de toute mutation, la population pourrait plus difficilement s'adapter aux changements environnementaux. Un concept a d'ailleurs émergé considérant que la mutagénèse aurait été elle-même positivement sélectionnée au cours de l'évolution (Radman, 1999) car essentielle au maintien de la diversité génétique. L'hypothèse d'une préexistence de la mutation conférant une résistance vis-à-vis d'une substance avant l'application de celle-ci au champ est souvent privilégiée. Des analyses de biologie moléculaire réalisées sur des plantes conservées dans des herbiers ont d'ailleurs permis de détecter chez un plant de vulpin (*Alopecurus myosuroides*) collecté en 1888, une mutation bien connue pour être impliquée dans la résistance à une famille d'herbicides, les inhibiteurs de l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase), des décennies avant leur première utilisation au champ (Délye et al, 2013). De même, chez la mouche *Lucilia cuprina*, des spécimens collectés bien avant l'utilisation des organophosphorés présentaient des mutations affectant une estérase et responsables d'une résistance à un organophosphoré (Hartley et al, 2006). Ces faits démontrent que la résistance peut-être naturellement présente dans les populations avant même l'arrivée de la molécule pesticide (Figure 4A). Ces préadaptations peuvent contribuer à l'évolution rapide des résistances.

L'hypothèse de l'apparition, sous la pression de sélection exercée par la substance active, d'une nouvelle mutation génétique qui modifie substantiellement le phénotype a également été émise (McKenzie et Batterham, 1994). Dans le cas d'une émergence postérieure à l'utilisation du pesticide, la mutation dite *de novo* va apparaitre alors que la molécule est déjà appliquée au champ (Hawkins et al, 2019) (Figure 4B). L'apparition de ces mutations pourrait être aléatoire ou favorisée par le stress abiotique généré par l'application de pesticides. Quelques rares travaux ont étudié l'évolution du taux de mutation chez des bioagresseurs suivant l'application de pesticides. Des études menées *in vitro,* chez le champignon phytopatogène *Monilia fructicola,* agent causal d'une forme de moniliose des

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

arbres fruitiers, ont mis en évidence une évolution de la résistance à l'azoxystrobine plus rapide chez les isolats déjà résistants aux fongicides inhibiteurs de l'14α-déméthylase (IDM) (Luo et Schnabel, 2008) ainsi que le déplacement d'un transposon lié à la résistance aux IDM suite à une exposition continue à des doses sublétales de ce composé (Chen et al, 2015). Ceci suggère que le stress lié à l'exposition à un toxique pourrait induire une augmentation de la fréquence des mutations et donc rendre les populations et les individus exposés capables d'évoluer plus rapidement, comme cela a été observé pour certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* suite à une exposition aux quinolones, des antibiotiques (Kohler et al, 1997). Cependant, concernant *M. fructicola*, des essais réalisés au champ d'applications sublétales d'azoxystrobine et de propiconazole n'ont pas mis en évidence d'augmentation significative du taux de mutations (Dowling et al, 2016). Les changements génétiques induits par l'exposition à des doses sublétales de fongicides observés i*n vitro* pourraient donc ne pas se produire aussi facilement au terrain.

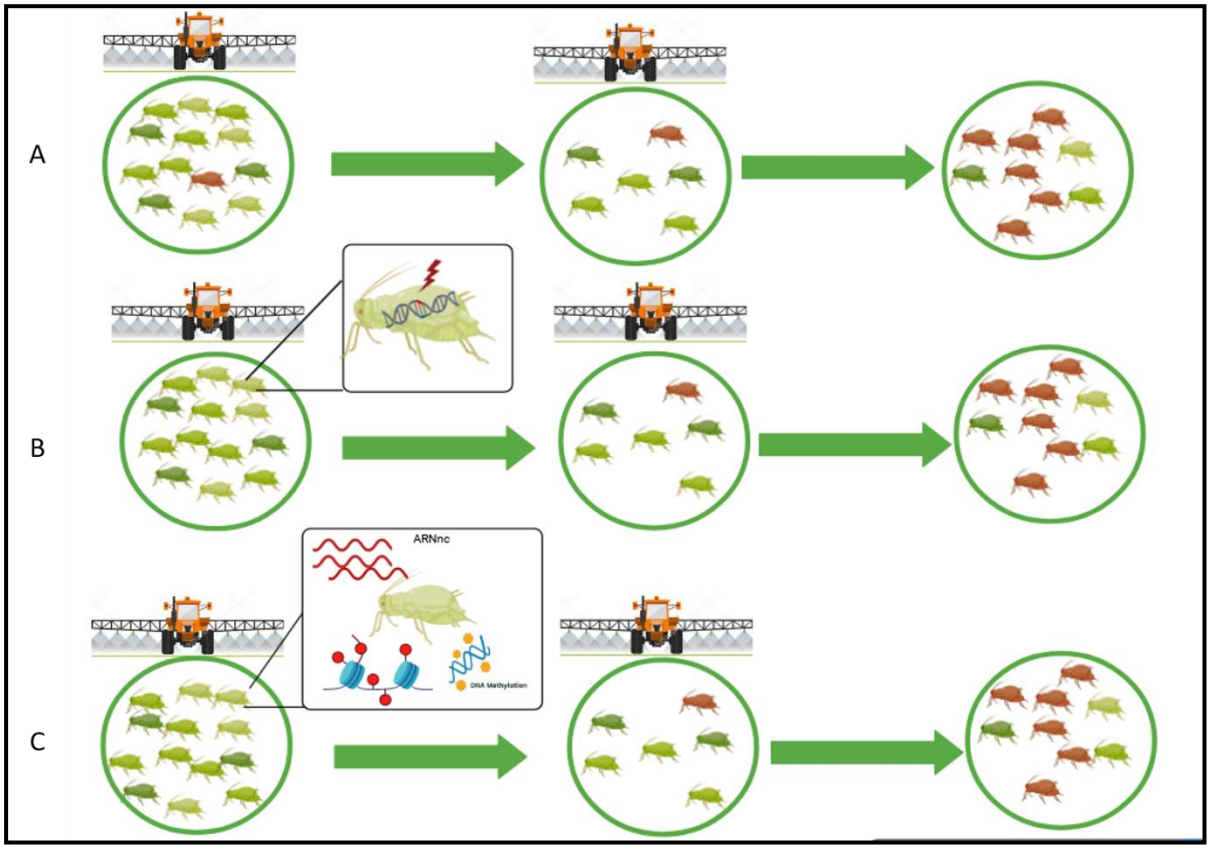


Figure 4 : Représentation de différentes théories sur l'évolution des résistances aux PPP. En vert les pucerons sensibles, en brun les pucerons résistants. A. La mutation est présente dans la population antérieurement à l'application du PPP, l'application répétée du PPP va sélectionner les ou l'individu(s) porteurs de la mutation au détriment des individus sensibles. B. L'apparition de la mutation dite *de novo* va apparaitre alors que la molécule est déjà appliquée au champ. Le stress abiotique généré par l'application de pesticides pourrait favoriser l'apparition de la mutation. C. L'application du PPP induirait des modifications épigénétiques qui pourraient être héritables et favoriser la survie. Les phénomènes épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones, ARN non codant) pourraient augmenter la plasticité phénotypique et ainsi accroître la vitesse d'adaptation. (Figure réalisée à l'aide de BioRender - https://app.biorender.com/).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Plus récemment, des travaux se sont également intéressés aux modifications épigénétiques consécutives à l'exposition à des pesticides et à leur implication dans l'évolution des résistances, plus particulièrement chez les arthropodes et les plantes. Le fait que l'évolution des résistances semble se produire plus rapidement qu'attendu laisse à penser que les pesticides eux-mêmes pourraient entrainer des changements épigénétiques chez les organismes nuisibles et ainsi contribuer à l'évolution de la résistance (Mogilicherla et Roy, 2023). Ces mécanismes épigénétiques sont capables de modifier l'expression des gènes sans aucun changement au niveau de l'ADN. Ils reposent sur des changements au niveau de la méthylation de l'ADN, des modifications au niveau des histones, des régulations par les ARN non codants et peuvent néanmoins être héritables (Collota et al, 2013) (Figure 4C). Ainsi, chez le doryphore de la pomme de terre *Leptinotarsa decemlineata* l'exposition à des doses sublétales d'imidaclopride entraînait une diminution de la méthylation globale de l'ADN pour la génération exposée et la deuxième génération. De plus, les séquences affectées par des changements de méthylation concernent notamment des gènes associés à la résistance aux insecticides, tels que les cytochromes P450 ainsi que des éléments transposables (Brevik et al, 2021).

1.2. Résistances dites naturelles

Des cas de résistances dites naturelles ou intrinsèques ont également été rapportés chez différentes espèces de bioagresseurs. Dans ces situations, la résistance à un PPP est déjà fixée au sein de l'espèce du bioagresseur avant même l'utilisation de la molécule létale. Ainsi, l'espèce *Botrytis pseudocinerea,* une espèce cryptique de *Botrytis cinerea*, est intrinsèquement résistante au fenhexamid, un inhibiteur de la biosynthèse des stérols, en raison de la détoxification de la molécule fongicide par un cytochrome P450 monooxygénase (Leroux et al, 2002). Les basidiomycètes (communément nommés champignons à chapeau), eux, présentent une insensibilité aux strobilurines (QoI), des fongicides inhibiteurs de la respiration cellulaire qui sont efficaces sur un très large spectre de champignons et oomycètes phytopathogènes. Des travaux ont montré que la structure du cytochrome *b* des basidiomycètes présente le remplacement de certains résidus clés, (Kraiczy et al, 1996) expliquant leur insensibilité aux strobilurines. Cette insensibilité résulte certainement du fait que certains basidiomycètes produisent naturellement les strobilurines (Nofiani et al, 2018). Pour les herbicides, le terme de plante tolérante est utilisé pour décrire la capacité inhérente d'une espèce à survivre et à se reproduire après un traitement herbicide.

Au sein d'une espèce, des adaptations à des xénobiotiques naturels peuvent également conduire à des résistances aux PPP. Ainsi, des populations de puceron vert du pêcher, *M. persicae,* adaptées au tabac, sont résistantes à la nicotine, un insecticide naturel, présent dans ces plantes. Cette résistance implique la surexpression d'enzymes de détoxication et confère également une résistance aux néonicotinoïdes. Ces populations étaient donc résistantes à cette famille d'insecticides avant même le début de leur utilisation au champ (Singh et al, 2021). L'adaptation à la plante hôte a ainsi été cooptée comme mécanisme de résistance aux néonicotinoïdes.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1.3. Transferts inter-espèces

La résistance peut enfin être acquise grâce à des transferts interspécifiques de gènes impliqués dans la résistance. Les transferts inter-espèces de gènes de résistance à des toxiques sont connus et décrits depuis longtemps chez les bactéries et favorisés par la présence, dans ces groupes de microorganismes, de plasmides aisément transférables entre les bactéries d'espèces distinctes via des mécanismes de transduction ou de conjugaison (Courvalin, 1994). L'absence de ce type de mécanismes chez les plantes, champignons ou ravageurs des cultures rend les évènements de transfert inter-espèces de matériel génétique plus exceptionnels. Néanmoins, des cas de transfert horizontaux (ou latéraux) existent entre procaryotes et eucaryotes (Sieber et al, 2017) ou au sein des eucaryotes dont les plantes (Gao et al, 2014), les champignons (Friesen et al, 2006) et les insectes (Gilbert et al, 2021). Par exemple, chez l'aleurode du tabac, *Bemisia tabaci*, l'analyse du génome a montré la présence de gènes d'origine bactérienne ou fongique, dont des gènes de peroxygénase aromatique qui, de par leur capacité de détoxification des xénobiotiques, pourraient contribuer à la résistance aux insecticides (Chen et al, 2016). Les transferts de matériel génétique peuvent également intervenir dans le cas d'évènement d'hybridation inter-espèces. On peut citer l'exemple de travaux menés en Australie chez deux champignons du genre *Pyrenophora, P. teres* f. sp. *maculata* et *P. teres* f. sp. *teres,* responsables de deux formes distinctes d'helminthosporiose chez l'orge. Ces études ont montré l'existence d'une recombinaison naturelle entre les deux espèces*,* avec l'acquisition par recombinaison intragénique d'une résistance aux triazoles (Turo et al, 2021). Il n'existe pas à ce jour d'exemple connu chez les insectes ennemis des cultures, mais ce type de recombinaison a été observé chez des moustiques vecteurs du paludisme. Ainsi, chez *Anopheles coluzzii,* l'acquisition de la résistance aux pyréthrinoïdes a été acquise par hybridation avec une espèce proche, *Anophele gambiae* (Norris et al, 2015). Ces cas d'introgression adaptative restent néanmoins exceptionnels.

A l'exception des cas de résistance intrinsèque, la résistance, quelle que soit son origine (mutation antérieure ou postérieure à l'application du PPP, conséquence de phénomènes épigénétiques, transfert inter-espèces), ne peut être sélectionnée et se répandre qu'à la suite d'applications répétées de la substance active et, *in fine,* avoir un impact sur l'efficacité de la substance active au champ.

2. Evolution de la résistance aux produits de protection des plantes

L'évolution de la résistance aux produits de protection des plantes est un exemple de micro-évolution en lien avec les pratiques agricoles tout comme l'est le contournement des résistances variétales par les champignons et oomycètes phytopathogènes (Milgroom et al, 2015). Ces changements micro-évolutifs sont régis par les mêmes mécanismes que ceux à l'origine de l'évolution des espèces (macro-évolution). Ils sont décrits, dans les travaux de Milgroom et al. (2015), comme la résultante des cinq grandes forces évolutives : la mutation, la sélection naturelle, la dérive génétique, la migration et la recombinaison. Il reste difficile de considérer une de ces forces évolutives sans prendre en compte les autres car elles se produisent au même moment avec potentiellement des effets complémentaires ou contraires. Ainsi, la mutation, en créant de nouveaux allèles, est source de diversité génétique (Ellegren et Galtier, 2016). La sélection naturelle, qui implique que les individus les mieux

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

adaptés d'une espèce survivent et se reproduisent, conduit à l'augmentation de la fréquence des allèles associés aux phénotypes les plus adaptés. *In fine*, cela conduit à une réduction de la diversité génétique. La dérive génétique, qui correspond à l'évolution aléatoire au fil du temps des fréquences alléliques, conduit à la perte d'allèles dans une population et est à l'origine de la divergence génétique entre des populations. Alors que la migration, qui se définit comme le déplacement d'individus (ou d'allèles) d'une population à une autre, induit un flux génétique qui augmente la diversité génétique d'une population et diminue les divergences entre les populations. Enfin, la recombinaison génétique permet la réorganisation et l'échange de matériel génétique entre différents génomes. Chez les eucaryotes, la reproduction sexuelle permet la recombinaison au sein d'un même génome de matériel génétique provenant de deux gamètes génétiquement uniques, elle est donc source de diversité génétique.

Dans les agrosystèmes, la pression de sélection exercée par l'application d'un PPP joue un rôle essentiel dans l'évolution des résistances. Néanmoins la dynamique d'évolution va être dépendante de très nombreux éléments liés au bioagresseur lui-même, aux bases génétiques de la résistance, aux caractéristiques de la molécule létale et à son application dans un environnement donné. Connaître ces facteurs est essentiel pour promouvoir des pratiques qui permettent de ralentir l'évolution des résistances et pour espérer mettre en œuvre une gestion efficace de celles-ci.

2.1. Facteurs liés aux caractéristiques biologiques du bioagresseur

Les caractéristiques biologiques d'un bioagresseur font parties des facteurs connus qui peuvent influer sur la dynamique d'évolution d'une résistance. Le mode de reproduction va, par exemple, déterminer la manière dont les gènes sont transmis d'une génération à l'autre. C'est un facteur majeur de l'évolution qui influence la diversité génétique et joue donc un rôle essentiel dans l'évolution des génomes (Charlesworth & Wright, 2001). La reproduction sexuée, qui permet un brassage génétique et l'élimination des mutations délétères, est généralement considéré comme un avantage sur le plan évolutif (Crow, 1994). Ce mode de reproduction va par exemple permettre la combinaison rapide, chez un individu, de plusieurs allèles de résistance à différentes substances actives qui auront au préalable évolué chez différents individus. Chez les espèces avec un mode de reproduction uniquement asexuée, il n'y a pas de recombinaison génétique. L'absence de recombinaison conférerait une capacité d'évolution réduite par rapport aux espèces capables de se reproduire de façon sexuée (Charlesworth et Wright, 2001). L'accumulation de plusieurs allèles de résistance est plus complexe chez ces espèces car cela nécessite l'accumulation de plusieurs mutations dans une même lignée clonale. En revanche, ce mode de reproduction pourrait faciliter la propagation rapide des génotypes les plus adaptés à des conditions environnementales données.

Chez les différents règnes de bioagresseurs des cultures, les modes de reproduction sont très variés allant de la reproduction sexuée (les lépidoptères ou le coquelicot, *Papaver rhoeas*) ou asexuée exclusive (*Myzus ascalonicus,* le puceron de l'échalote ou *Taraxacum officinale,* le pissenlit) à la coexistence des deux modes de reproduction

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

(*M. persicae* ou *P. viticola*). Les bioagresseurs où coexistent les deux modes de reproduction présenteraient l'avantage de générer des recombinaisons génétiques dont les plus adaptées à des conditions données se propageraient rapidement de façon clonale grâce à la reproduction asexuée. Pour exemple, il a été montré chez *Podosphaera plantaginis* que la reproduction sexuée à l'automne, qui succède à de nombreux cycles de reproduction asexuée, favorisait une diversité génotypique plus importante et augmentait la probabilité de survie à l'hiver (Laine et al, 2019).

Le nombre de générations par an, qui va dépendre à la fois de la durée d'une génération et de la durée de la période pendant laquelle le bioagresseur est actif pour se reproduire, est un autre facteur capable d'influencer la dynamique d'évolution de la résistance. Il est communément admis que plus le nombre de générations par an est important plus la dynamique d'évolution de la résistance risque d'être rapide. Ainsi, sur une année, une espèce produisant une génération par an sera potentiellement soumise à un nombre de traitements moindre qu'une espèce avec plusieurs générations. La sélection des individus les moins sensibles devrait se faire d'autant plus rapidement que l'application du pesticide est répétée sur des générations consécutives dans un laps de temps court. Une étude menée en Australie a montré que, chez *Halotydeus destructor*, une espèce d'acarien ravageur des végétaux, les régions où le climat favorisait un plus grand nombre de générations par an étaient positivement corrélées à la résistance aux pyréthrinoïdes. Cette observation est conforme aux attentes selon lesquelles un voltinisme accru devrait accélérer les réponses évolutives aux pressions de sélection (Maino et al, 2018).

La capacité de dispersion des bioagresseurs influence les flux génétiques entre populations et va donc impacter la dynamique d'évolution de la résistance. Dans une population où des individus résistants ont évolué, l'immigration d'individus sensibles diminuera la fréquence du ou des allèles de résistance et, à l'inverse, l'immigration d'individus résistants l'augmentera. L'émigration des génotypes résistants dans d'autres populations contribuera à la dispersion spatiale des allèles de résistance (Miller et Sappington, 2017). A noter que le rôle de l'homme dans la dispersion des bioagresseurs avec leur résistance n'est pas à négliger (Denholm et al, 2002). Les pratiques agricoles peuvent conduire au déplacement d'individus d'une parcelle à une autre et ainsi être à l'origine de flux génétique entre différentes populations. Pour les adventices, par exemple, le transport des semences par l'intermédiaire des engins agricoles peut contribuer à ces flux de gènes (Bagavathiannan et al, 2016).

2.2. Facteurs liés aux bases génétiques de la résistance

La dynamique d'évolution de la résistance va également être dépendante de facteurs génétiques tels que, par exemple, le nombre de gènes impliqués dans la résistance. En théorie, une résistance déterminée par un seul gène présenterait une évolution plus rapide en comparaison à une résistance reposant sur l'accumulation de plusieurs mutations. Les différences génétiques entre les individus d'une distribution phénotypique continue sont généralement polygéniques de sorte que, lorsque la sélection s'exerce au sein de la distribution phénotypique d'une population sensible (comme une dose qui tuerait 90% des individus), la résistance pourra résulter de la combinaison d'allèles de différents gènes préexistants qui individuellement ont un effet mineur. Dans le temps, une diminution progressive de la sensibilité pourra être observée et celle-ci se traduira par une gamme de

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

sensibilité au sein de la population en raison d'une accumulation progressive d'allèles de résistance (Figure 5A et B - McKenzie et Batterham, 1994 ; Ffrench-Constant et al, 2004 ; Lucas et al, 2015). Le terme de résistance quantitative est communément utilisé pour décrire ces résistances qui résultent généralement de l'accumulation d'allèles à faible effet sur différents loci (ou l'accumulation de mutations sur un même gène). *A contrario,* le terme de résistance qualitative sera employé lorsque la sélection, s'exerçant sur un individu rare et en dehors de la distribution phénotypique originale, conduit à la sélection d'une mutation rare ayant un effet majeur. Ces mutants présentent une tolérance en dehors de la distribution originale. Cette résistance qualitative conduit à deux populations distinctes avec une distribution bimodale de la sensibilité (Figure 5A et C - McKenzie et Batterham, 1994 ; Ffrench-Constant et al, 2004 ; Lucas et al, 2015).

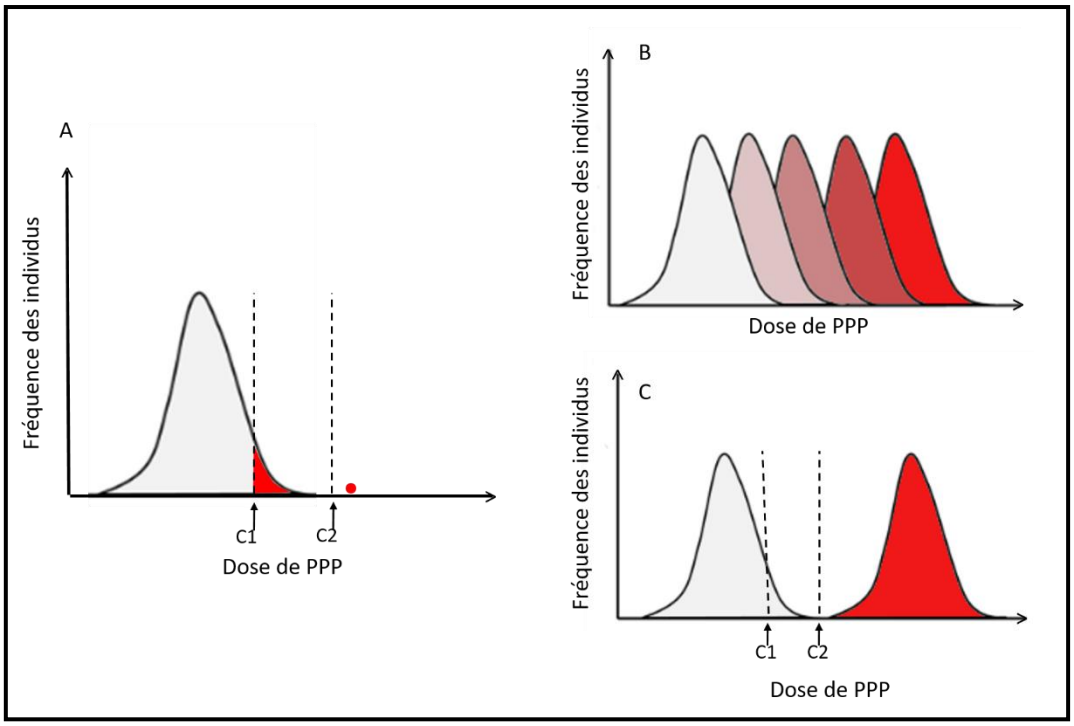


Figure 5 : Évolution de la distribution de la sensibilité A. Distribution de la sensibilité initiale d'une population vis-à-vis d'un PPP. B. Évolution de la distribution de la sensibilité en raison de l'accumulation de modifications génétiques avec des effets mineurs. C. Évolution en deux sous-populations (l'une sensible et l'autre résistante), due à la sélection d'une mutation ayant un effet majeur (figure adaptée de Ffrench-Constant et al, 2004 ; Lucas et al, 2015).

Le niveau de dominance d'un allèle impliqué dans la résistance est un des autres facteurs génétiques qui peut influer sur la dynamique d'évolution de la résistance chez les bioagresseurs diploïdes. Barbosa et al (2011) ont modélisé l'évolution de la fréquence d'un allèle de résistance chez un vecteur de la dengue, *Aedes aegypti*, en fonction de son niveau de récessivité ou de dominance. La fréquence de l'allèle augmente rapidement en fonction du nombre de générations lorsque celui-ci est semi-dominant, et est maintenu à une fréquence faible pendant de nombreuses générations lorsqu'il est semi-récessif (Figure 6).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

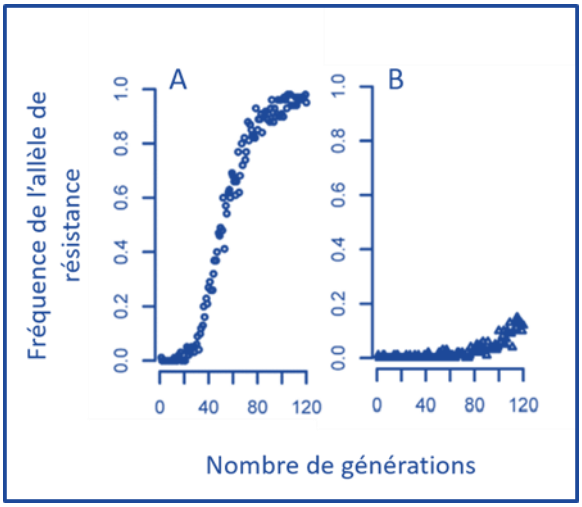


Figure 6 : Simulation de l'évolution de la fréquence d'un allèle de résistance en fonction du nombre de générations et selon deux scénarii de dominance chez l'agent vectoriel de la dengue, *Aedes aegypti*. A. évolution dans le cas d'un allèle semi-dominant, coefficient de dominance = 0.8. B. évolution dans le cas d'un allèle semi-récessif, coefficient de dominance = 0.2. Le coefficient est de 0 lorsque l'allèle est totalement récessif et de 1 lorsque la dominance est totale (Figure adaptée de Barbosa et al, 2011).

L'influence du niveau de dominance d'un allèle de résistance sur la dynamique d'évolution de la résistance sera également dépendante de la ploïdie de l'espèce. Une grande partie des espèces de champignons phytopathogènes sont haploïdes la majeure partie de leur cycle biologique. Chez ces espèces, une mutation conférant une résistance sera forcément exprimée et pourra donc être sélectionnée. Chez les espèces diploïdes (pucerons) ou polyploïdes (nombreuses espèces d'adventices) seuls les allèles dominants sont soumis directement à la pression de sélection. Les allèles récessifs ne pourront être sélectionnés qu'après avoir atteint l'homozygotie sans avoir, au préalable, été éliminés par dérive génétique (Orr et al, 2001 ; Hawkins et al, 2019). De nombreuses espèces d'arthropodes ravageurs de cultures (aleurodes, les thrips, les cochenilles, …) sont haplodiploïdes. Chez ces espèces, les mâles, généralement issus d'œufs non fécondés, sont haploïdes et les femelles, issues d'œufs fécondés, sont diploïdes. Comparé à des espèces diploïdes, la dynamique d'évolution de la résistance pourrait être accélérée ou ralentie selon que les mâles haploïdes sont autant ou moins tolérants que les femelles à l'insecticide (Carrière, 2003).

L'effet pléiotrope qui peut être associé à une résistance est un autre facteur génétique qui peut influer sur la dynamique d'évolution de la résistance. Certains gènes ont des effets pléiotropes, en d'autres termes ils contribuent à plusieurs caractères phénotypiques (Rose, 1982 ; Lobo et al, 2008). Ces effets peuvent se traduire par un coût biologique associé à une résistance. En l'absence de traitement, les individus résistants présenteraient une diminution des performances en comparaison des individus sensibles (croissance plus lente, fertilité plus faible, taux de survie diminué, moins bonne résistance à des stress biotiques, ...). *In fine*, ce coût biologique réduit la contribution de ces individus à la génération suivante. Par exemple, chez le champignon *B. cinerea*, des souches résistantes aux benzimidazoles présentent une croissance mycélienne et une sporulation réduite (Pollastro et al, 1996). Chez le carpocapse des pommes, *C. pomonella,* une diminution de la fécondité, de la fertilité, de la durée de vie, du poids, ainsi qu'un développement plus lent ont été rapportés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

chez des populations avec une résistance métabolique aux insecticides (Boivin et al, 2001). Les conséquences au champ d'un coût biologique restent néanmoins difficiles à déterminer. Les études généralement conduites en conditions de laboratoire sur quelques souches ou populations sont loin des conditions du terrain. De plus, pour s'assurer que l'effet mesuré est bien lié à la résistance, ces études devraient être conduites sur des souches ou des populations avec des fonds génétiques proches, ce qui n'est pas toujours le cas (Bergelson & Purrington, 1996 ; Bass, 2017).

2.3. Facteurs liés aux PPP et à leur application

La dynamique d'évolution de la résistance va être influencée par le PPP lui-même ainsi que par les modalités de son application (fréquence, dose, …). Concernant l'impact de la substance active sur la dynamique d'évolution de la résistance, il est communément admis que les substances actives dites à action multisite (ayant une action sur plusieurs cibles / fonctions moléculaires ou métaboliques) sont moins à risque d'évolution de résistance en comparaison à des substances actives unisite (Jutsum et al, 1998). Le bioagresseur devra en effet, évoluer des mécanismes de résistance pour les différentes cibles moléculaires impliquées dans l'action de la substance active multisite. Pour comparaison, les résistances variétales basées sur un gène unique sont plus facilement contournées par un agent phytopathogène que des résistances construites sur plusieurs gènes (Milgroom et al, 2015). Il est également reconnu que la dynamique d'évolution de la résistance risque d'être accélérée pour une substance active dont le mode d'action est similaire à d'autres molécules déjà appliquées puisque ces dernières auront déjà exercé une pression de sélection dans les populations.

Concernant l'application du pesticide lui-même, plus l'application est réalisée sur une population importante plus la probabilité de sélectionner des individus résistants augmente (Hawkins et al, 2018). De même, plus l'application d'un PPP est réalisée fréquemment, plus la pression de sélection sera forte et plus l'évolution de la résistance risque d'être rapide. Enfin, l'influence de la dose du PPP sur la dynamique d'évolution de la résistance reste un élément source de nombreuses controverses (Van Den Bosch et al, 2011 ; Neve at al, 2014). La réduction de la dose, initialement motivée par des considérations environnementales, diminue la pression de sélection mais pourrait conduire à une évolution accélérée de résistances dites quantitatives (Neve et Powles, 2005 ; Renton et al, 2011). *A contrario*, une dose forte, du fait de son efficacité, réduirait le risque d'apparition de résistances quantitatives mais accélérerait l'émergence de résistances dites qualitatives (Van Den Bosch et al, 2011 ; Mikaberidze et al, 2017).

En conclusion, prédire le risque d'émergence de résistances au champ et présager de sa dynamique d'évolution restent un exercice très complexe du fait de la diversité des facteurs qui peuvent accélérer ou ralentir cette dynamique (Figure 7). La nécessité de bien connaître la biologie du bioagresseur et la molécule pesticide, ainsi que de caractériser le plus précocement possible le mécanisme de résistance et d'en identifier les bases génétiques est indispensable pour une gestion adaptée des phénomènes de résistance.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

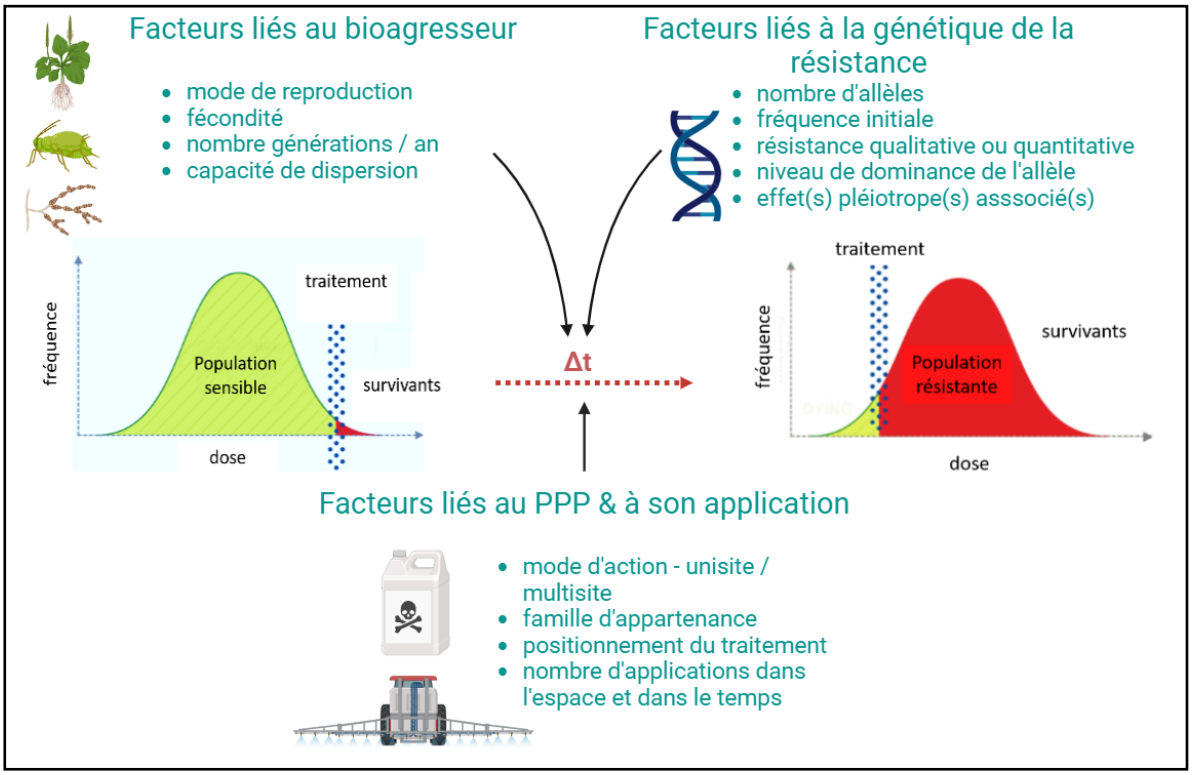


Figure 7 : Principaux facteurs pouvant influencer la dynamique d'évolution de la résistance à un PPP dans les populations de bioagresseurs des cultures. (Figure réalisée à l'aide de BioRender - https://app.biorender.com/).

3. Les mécanismes de résistance aux produits de protection des plantes

Les mécanismes de résistance aux PPP peuvent résulter de modifications affectant directement la protéine ciblée par le PPP ou impliquer des mécanismes permettant de diminuer la quantité de molécule toxique atteignant la cible indépendamment du processus cellulaire ciblé par la molécule toxique (R4P-network, 2016).

3.1. Résistances liées à une modification de la cible

Les résistances liées à une modification de la cible (RLC) peuvent résulter de deux mécanismes. Elles sont soit la conséquence d'une modification structurale de la protéine ciblée par le PPP, soit liées à une augmentation de la quantité de cette protéine (Figure 8).

Dans le cas où la RLC implique un changement structural de la protéine, cette modification est la conséquence d'une (voire plusieurs) mutations affectant la protéine (Figure 8B). Ce changement de structure conduit à une baisse d'affinité entre la molécule chimique et la protéine, ou à une moindre accessibilité des sites de fixation. Concrètement, cela se traduit par une augmentation de la constante d'inhibition (*ki)* de la molécule toxique (*i.e*. la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques est occupée). Lonhienne et al (2022) ont ainsi montré l'impact de différentes mutations affectant l'acétohydroxyacide synthase A (AHAS) sur la constante d'inhibition de différentes substances

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

actives herbicides inhibitrices de cette enzyme (Tableau 2). Ces données illustrent que, même si les molécules interagissent avec la même cible protéique, une mutation impactera la *ki*, et donc l'inhibition de la protéine, de façon variable selon la molécule chimique inhibitrice.

HERBICIDE	SAUVAGE			W574L			P197L			P197T			S653T		
	ki		ecart type	ki		ecart type	ki		ecart type	ki		ecart type	ki		ecart type
Clorimuron	7,5E+01	±	6,0E+00	5,2E+03	±	3,0E+02	4,4E+03	±	5,0E+02	2,2E+03	±	2,0E+02	5,3E+01	±	4,6E+00
Amidosilfuron	4,2E+03	±	6,0E+02	8,7E+05	±	6,0E+04	9,4E+04	±	1,7E+04	6,1E+04	±	8,9E+03	4,9E+02	±	2,5E+01
Penoxsulam	1,9E+00	±	9,0E-01	6,7E+04	±	3,0E+03	8,2E+01	±	7,0E+00	8,5E+01	±	6,3E+00	5,0E+00	±	2,2E+00
Metosulam	2,9E+01	±	1,1E+01	3,9E+04	±	3,9E+03	1,3E+03	±	1,3E+02	1,1E+03	±	1,3E+02	6,6E+01	±	5,6E+00
Bispyribac	4,1E+01	±	6,0E+00	6,1E+03	±	6,1E+03	1,2E+02	±	1,3E+01	1,1E+02	±	4,8E+00	9,0E+01	±	1,3E+01
Pyrithiobac	1,8E+02	±	1,2E+01	9,1E+04	±	9,1E+04	2,0E+03	±	2,0E+02	1,5E+03	±	3,0E+02	2,2E+02	±	1,6E+01
Imazaquin	1,9E+04	±	2,0E+03	7,0E+04	±	7,0E+05	1,4E+04	±	1,1E+03	1,2E+04	±	1,8E+03	2,4E+05	±	2,6E+04

Tableau 2 : Constantes inhibitrices (*ki*) obtenues pour différentes molécules herbicides inhibitrices de l'acétohydroxyacide synthase A (AHAS) chez différentes souches d'*Arabidopsis thaliana* mutées pour le gène de l'acétohydroxyacide synthase (adapté de Lonhienne et al, 2002).

La modification structurale de la protéine est le plus souvent due au remplacement d'un acide aminé par un autre (Gisi et al, 2002, Murphy et Tranel, 2019) consécutif de la substitution non synonyme d'un acide nucléique par un autre. Plus rarement, la mutation peut être consécutive à plusieurs substitutions d'acides nucléiques. Ainsi, chez *M. persicae*, la mutation d'une sérine en une phénylalanine en position 431 de l'acétylcholinestérase est responsable de la résistance aux carbamates. Cette mutation est causée par la substitution de deux acides nucléiques (tca->ttt) dans le gène codant la protéine cible (Nabeshima et al, 2003). Des cas de modifications structurales liées à des délétions ou insertions ont également été observés. Pour exemple, chez la teigne des crucifères, *Plutella xylostella*, la délétion de neuf acides nucléiques, conduit à la délétion de trois acides aminés dans le récepteur nicotinique de l'acétylcholine et est responsable d'une résistance au spinosad (Wang et al, 2016). Chez l'agent du mildiou de la vigne, *P. viticola*, l'insertion de six nucléotides conduit à l'insertion de deux acides aminés entre les positions 203 et 204 du cytochrome *b* et est responsable de la résistance à la cyazofamide (Cherrad et al, 2023). Ce type de résistance lié à la modification de la cible est un mécanisme de résistance couramment rencontré au sein des trois règnes de bioagresseurs.

Le second mécanisme impliquant une RLC résulte de la surexpression de la protéine ciblée par la molécule chimique (Figure 8C). Cette surexpression peut résulter de la duplication d'un gène comme chez le tétranyque tisserand (*Tetranychus urticae*). Chez cette espèce, la résistance vis-à-vis du monocrotophos, un organophosphoré, est due à la surexpression de l'acétylcholinestérase. Cette surexpression est proportionnelle au nombre de copies du gène codant l'acétylcholinestérase (Kwon et al, 2010). Chez divers champignons phytopathogènes la résistance aux triazoles, implique une surexpression de l'14α-déméthylase liée à des modifications affectant la région promotrice du gène codant cette protéine (*Cyp51*). Ainsi, des souches de *Monilinia fructicola* résistantes au triazoles présentent une synthèse accrue de la 14-α-déméthylase induite par la surexpression du gène *Cyp51*. Cette surexpression est présente chez des souches présentant l'insertion d'un élément transposable de 65 pb dans la région promotrice du gène *Cyp51* (Luo et Schnabel, 2008). Chez *Venturia inaequalis,* des souches résistantes au myclobutanil présentent une surexpression du gène *Cyp51* corrélée avec un insert de 553 pb situé en amont de la séquence codante (Schnabel et Jones, 2000).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

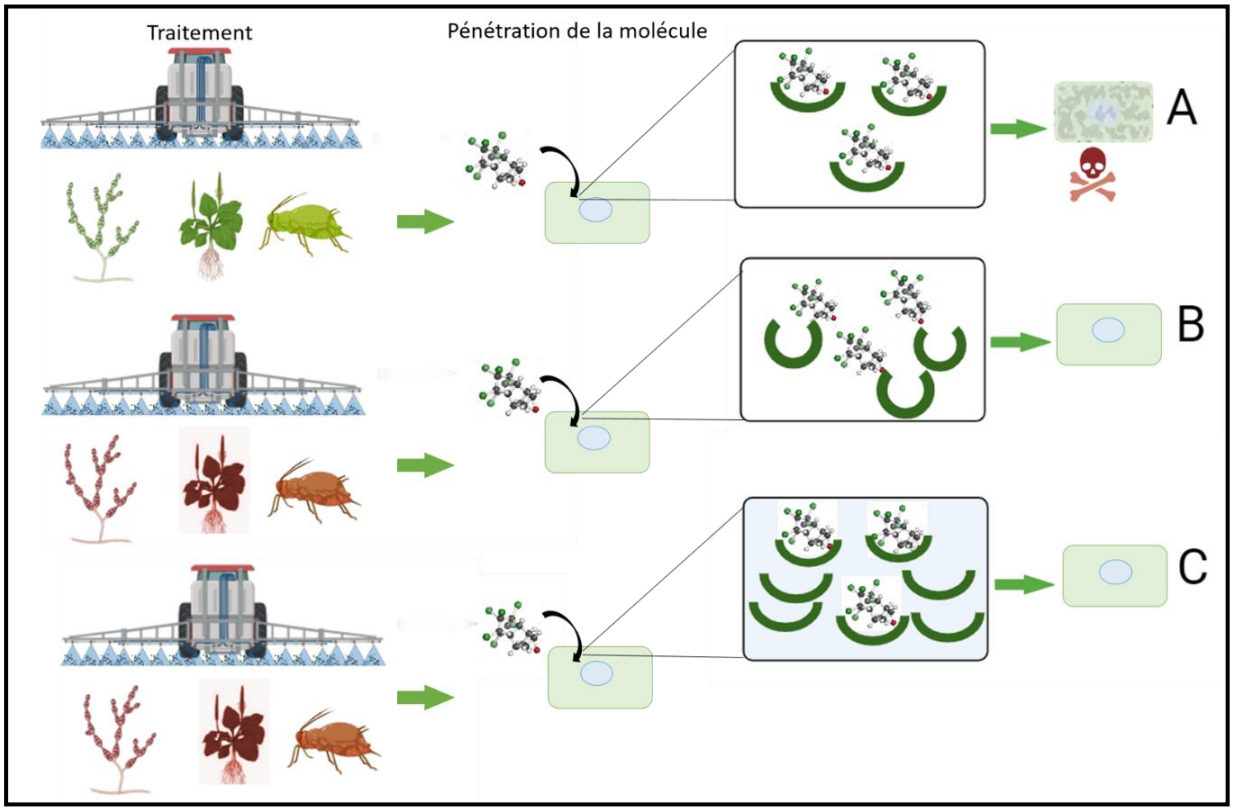


Figure 8 : Représentation schématique des mécanismes de résistance liés à une modification de la cible. En vert les bioagresseurs sensibles, en brun les bioagresseurs résistants. Après pulvérisation du PPP, la molécule pénètre dans l'organisme visé. A. La molécule chimique va se fixer à sa cible cellulaire et ainsi inhiber un processus biologique vital. Cela conduit à des effets cytotoxiques et à la mort des individus. B. Dans le cas d'une résistance impliquant une modification de la cible, la molécule chimique ne se fixe pas à la cible et elle n'inhibe pas le processus cellulaire, les individus survivent. C. Dans le cas d'une résistance impliquant une surexpression de la cible, la molécule PPP n'inhibe pas toutes les cibles cellulaires, le processus cellulaire est maintenu et les individus survivent. (Figure réalisée à l'aide de BioRender - https://app.biorender.com/).

3.2. Résistances non liées à une modification de la cible

Les mécanismes de résistances non liés à une modification de la cible (RNLC) regroupent l'ensemble des mécanismes qui ont pour conséquence de diminuer la quantité de molécule létale qui peut interagir avec la protéine ciblée ainsi que ceux qui permettent au bioagresseur de compenser l'inhibition de la cible. Ces mécanismes comprennent les processus d'évitement de la molécule pesticide, la réduction de sa pénétration ou de sa translocation, l'augmentation de sa métabolisation, la diminution de son taux d'activation et de sa séquestration ainsi que les mécanismes métaboliques compensant l'inhibition du processus cellulaire.

a) Processus d'évitement de la substance active

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Ce type de mécanisme comprend la résistance comportementale observée chez des insectes ainsi que les évolutions phénologiques présentes chez certaines espèces appartenant aux différents règnes de bioagresseurs. Ces mécanismes permettent aux bioagresseurs de limiter ou d'éviter l'exposition à la molécule létale.

La résistance comportementale a été initialement définie par Sparks (1989) comme l'ensemble des comportements qui visent à réduire l'exposition d'un insecte à des composés toxiques ou qui permettent à un insecte de survivre dans un environnement qui serait autrement toxique et fatal. Ce type de mécanisme de résistance reste complexe à mettre en évidence. D'une part, il est délicat d'interpréter un changement de comportement comme une résistance à un insecticide, sans preuve que la résistance soit réelle (Zalucki et Furlong, 2017). D'autre part, le mécanisme est d'autant plus difficile à mettre en évidence que d'autres mécanismes plus faciles à caractériser (comme de la résistance de cible) peuvent être présents (Spark et al, 1989). Dans le domaine agricole, ce type de résistance a néanmoins été mis en évidence chez la noctuelle de la tomate, *Helicoverpa armigera,* vis-à-vis de la toxine *Bt* synthétisée par *Bacillus thuringiensis*. Ici il a été décrit un processus de répulsion chez les larves sensibles. Bien que ces dernières ne soient pas capables de détecter initialement la toxine *Bt*, elles sont plus susceptibles de quitter le milieu artificiel traité au *Bt* pour aller vers celui non traité, et ainsi de survivre. Cette réaction d'aversion n'a pas été observée chez les larves résistantes au *Bt* (Luong et al, 2018). Des modifications de la mobilité de l'insecte ont été également observées chez la noctuelle des bourgeons du tabac, *Heliothis virescens.* Chez cette espèce, les larves résistantes aux pyréthrinoïdes présentent une diminution de leur mobilité lorsqu'elles sont en contact avec des surfaces traitées aux pyréthrinoïdes. Cette moindre mobilité permettrait de réduire la quantité de substance active absorbée (0,5% de la quantité déposée est absorbé chez les larves résistantes *vs* 5% pour les sensibles 8 heures après le traitement). Ces réductions de mobilité n'ont pas été observées en l'absence de pyréthrinoïdes. La réduction des mouvements de ces larves résistantes semble donc être une réponse comportementale provoquée par la présence de pyréthrinoïdes et non pas une diminution de leur mobilité (Spark et al, 1989).

Chez les adventices, des évolutions phénologiques, telles qu'une levée retardée, pourraient permettre aux individus se développant le plus tardivement de contourner des traitements herbicides et certaines pratiques culturales comme le labour (Darmency et al, 2017).

b) Réduction de la pénétration de la substance active dans l'organisme

A ma connaissance, ce mécanisme de protection a été décrit chez les plantes et les insectes. Il permet de réduire la quantité de molécule létale qui va pénétrer dans le bioagresseur, c'est-à-dire outrepassant la première barrière de protection de l'organisme : la cuticule chez les insectes, la cuticule puis l'épiderme chez les plantes et la paroi chez les champignons. Par exemple chez *H. armigera,* Ahmad et al (2006) ont montré que la pénétration d'un insecticide, la deltaméthrine, était significativement plus lente chez les individus résistants en comparaison aux sensibles. Chez le ray-grass d'Italie,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Lolium multiflorum, il a été montré qu'une diminution de l'absorption du glyphosate par les feuilles participait à une baisse de sensibilité vis-à-vis de cet herbicide (Michitte et al, 2007 ; Nandula et al, 2008).

c) L'excrétion de la substance active

L'excrétion accrue de la substance active est un mécanisme qui met en jeu des transporteurs membranaires dont les transporteurs ABC (ou ATP-Binding Cassette). Les transporteurs ABC assurent le transport actif dépendant de l'ATP d'un large éventail de substrats (acides aminés, sucres, ions et conjugués de métaux lourds, peptides, lipides, polysaccharides et xénobiotiques) à travers la membrane cellulaire (Wu et al, 2019a). Ils se composent au minimum de quatre domaines : deux domaines ABC avec des motifs de séquence hautement conservés (NBD1 et 2) et deux domaines transmembranaires (TMD1 et 2) (Figure 9 - Rees et al, 2009). Des cas de résistance aux PPP impliquant des transporteurs ABC ont été décrits chez les trois grands règnes de bioagresseurs (Wu et al, 2019a ; Yuan et al, 2007 ; Hu et Chen, 2021). Chez les insectes et les plantes, l'expression accrue des transporteurs ABC est souvent décrite en association avec d'autres modifications métaboliques (cf. ci-dessous $ « augmentation de la métabolisation de la substance active »). L'implication de ce type de transporteurs a été également décrite comme mécanisme de résistance chez *H. virescens,* où la surexpression d'un transporteur ABC d'efflux (une glycoprotéine P) a été mise en évidence chez des individus présentant une perte de sensibilité au thiodicarbe, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. L'implication dans la résistance aux toxines *Bt* de la surexpression de transporteurs ABC ou de mutations affectant ces protéines a également été mise en évidence chez plusieurs espèces de lépidoptères (Wu et al, 2019a).

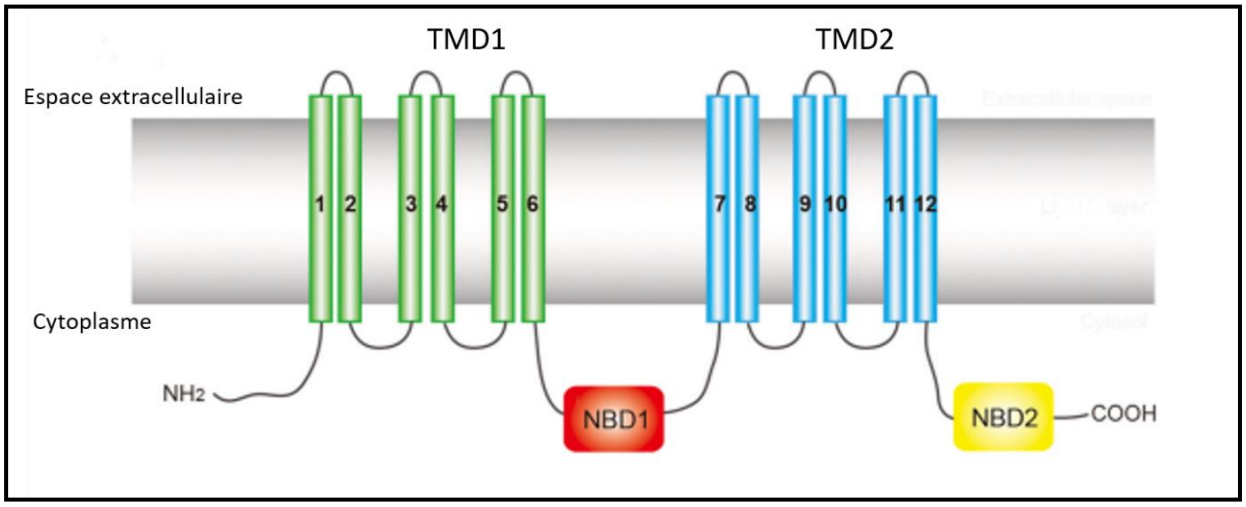


Figure 9 : Structure générale des transporteurs ABC avec deux domaines transmembranaires (TMD1 et 2) et deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD), *i.e.* domaines de liaison à l'ATP. (figure adaptée de Wu et al, 2009).

D'autres transporteurs transmembranaires ont été décrits comme étant impliqués dans ces phénomènes d'efflux comme les 'major facilitator superfamily' (MFS). Ces transporteurs catalysent l'efflux de molécules à l'extérieur de la cellule à l'aide de gradient de protons. Ils

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

sont composés de 12 hélices transmembranaires organisées en deux domaines qui contiennent le même nombre d'hélices. Ces deux domaines adoptent différentes conformations afin d'assurer le transport à travers la membrane.

Ces phénomènes d'excrétion accrue ont été également étudiés chez les champignons phytopathogènes (De Waard et al, 2006 ; Hu et Chen, 2021). L'efflux lié la surexpression de transporteurs ABC et/ou MFS a été décrit comme étant impliqué dans la résistance notamment aux IDMs chez *Z. tritici* (Stergiopoulos et al, 2003 ; Leroux et Walker, 2011 ; Omrane et al, 2015), *Fusarium culmorum* (Hellin et al, 2018), *F. graminearum* (Qi et al, 2018) ou *B. cinerea* (Kretschmer *et al*, 2009). Le mécanisme d'efflux, peut être responsable de profils dits MDR pour « Multiple Drug Resistance ». Les souches au profil MDR présentent une baisse de sensibilité à des fongicides de familles distinctes rendant plus complexe la gestion de la résistance.

d) Réduction de la translocation de la substance active

La translocation correspond au déplacement d'une substance active d'un site à un autre. Ce mécanisme est notamment impliqué dans la résistance au glyphosate chez plusieurs espèces végétales telles que chez l'ivraie raide, *Lolium rigidum,* (Lorraine-Colwill et al, 2002) et le ray-grass d'Italie (*L. multiflorum*). Chez *L. rigidum*, une modification de la translocation chez les plantes résistantes conduit à l'accumulation de la substance active dans les extrémités des feuilles traitées alors que, chez les plantes sensibles, le glyphosate se répartit dans la plante (Lorraine-Colwill et al, 2002 ; Preston et Wakelin, 2008).

e) L'augmentation de la métabolisation de la substance active

Ce type de mécanisme correspond à une activité accrue des processus capables de dégrader des substances actives des PPP. Les enzymes en jeu sont celles qui sont impliquées dans des réactions biochimiques pour la synthèse de métabolites et/ou dans la métabolisation des toxines naturellement présentes dans l'environnement (Encadré 3). Ainsi, chez les insectes, ces enzymes sont notamment impliquées dans la métabolisation de toxines végétales naturelles telles que les alcaloïdes, les terpènes, les phénols et les tannins qui sont potentiellement présents dans les plantes dont ils se nourrissent (Després et al, 2007 ; Panini et al, 2016). De même, chez les plantes, ces enzymes sont impliquées dans des réactions biochimiques de détoxification des composés xénobiotiques pouvant être présents dans le sol (Kreuz et al, 1996 ; Gaines et al, 2020). Le processus de métabolisation de la molécule chimique se divise généralement en plusieurs étapes (Panini et al, 2016 ; Yuan et al, 2007). Les réactions d'hydrolyse et/ou d'oxydation lors de la phase I vont permettre l'activation et/ou la conversion des molécules exogènes en un composé plus polaire. Cette phase permet d'augmenter la solubilité dans l'eau et de stocker la molécule toxique loin des tissus les plus sensibles ou de les excréter. Les métabolites ainsi obtenus peuvent également subir des réactions de conjugaison lors de la phase II. Ces réactions permettent le groupement des métabolites produits avec des métabolites endogènes fortement hydrophiles (glycosides,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

glutathion ou acides aminés) afin de favoriser leur excrétion. Selon la substance active, il est possible que seule l'une des deux étapes soit nécessaire avant leur excrétion (Panini et al, 2016 ; Gaines et al, 2020 ; Haubruge et Amichot, 1982). Plusieurs familles d'enzymes sont impliquées dans ces réactions et sont spécifiques de l'une des deux phases de métabolisation. Les principales sont : les cytochromes P450, les carboxylestérases, les glutathion S-transférases et les glycosyltransférases (Encadré 3 – Figure 10). La métabolisation se fait plus rapidement chez les individus résistants du fait d'une surexpression d'une (ou des) enzyme(s). Celle-ci peut être due à la duplication des gènes ou liée à des changements dans l'expression du gène consécutifs de modifications dans les éléments trans et/ou en cis-régulateurs (Li et al, 2007 ; Hu et Chen, 2021). Le (ou les) métabolite(s) secondaire(s) issu(s) de la métabolisation du PPP sera (seront) stocké(s) dans des vacuoles ou/et excrété(s) (Gaines et al, 2020 ; Panini et al, 2016).

Des cas de résistance par métabolisation accrue du PPP sont courants et très documentés chez les insectes (Li et al, 2007 ; Panini et al, 2016) et les plantes (Zhang et Yang, 2021). Par exemple chez *M. persicae*, l'implication de la surexpression accrue de carboxylestérases (E4 ou FE4), qui hydrolysent et séquestrent les molécules insecticides de trois familles distinctes (les organophosphorés, les carbamates et dans une moindre mesure les pyréthrinoïdes) a été mise en évidence il y a plus de 40 ans (Devonshire et Moore, 1982). Cette expression accrue est consécutive à la duplication de gènes codants ces carboxylestérases (Field et al, 1999). Plus récemment, chez cette même espèce, il a été démontré que la surexpression constitutive de cytochromes P450 est impliquée dans la résistance aux néonicotinoïdes (Puinean et al, 2010 ; Kirkland et al, 2023). Cette surexpression est la conséquence de la duplication de gènes. Chez l'adventice *L. rigidum*, Han et al (2021) ont montré l'implication de la surexpression d'un cytochrome P450 dans la résistance à des herbicides appartenant à cinq modes d'action différents. Ce mécanisme de résistance existe chez les champignons même si peu de travaux le mentionnent à ce jour. On peut par exemple citer le cas de la résistance naturelle par métabolisation (via un cytochrome P450) d'un fongicide, le fenhexamid, chez *Botrytis pseudocinerea*, une espèce cryptique de *B. cinerea*, l'agent de la pourriture grise (Leroux et al, 2002 ; Azeddine et al, 2014).

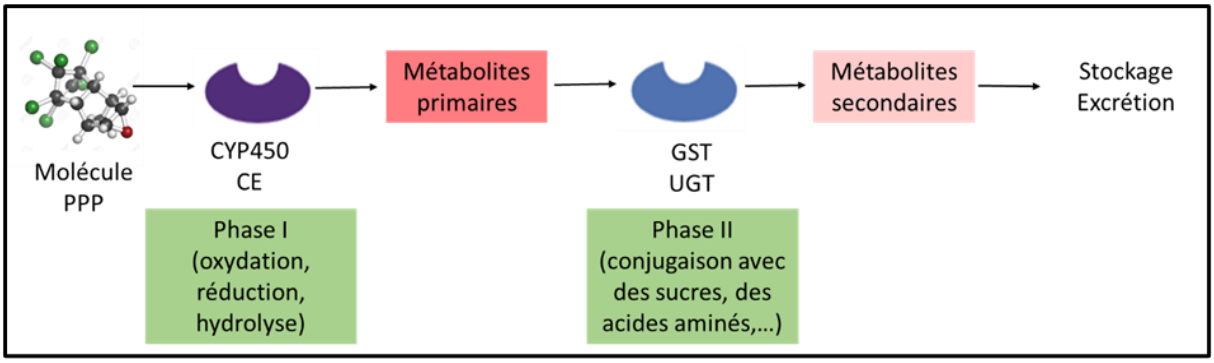


Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes de la résistance liée à une métabolisation accrue du PPP. Toutes les étapes ne sont pas systématiquement impliquées dans le processus de métabolisation. La phase I met en jeu des cytochromes P450 (P450) ou des Carboxylestérases (CE) et permet l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse de la substance active. La phase II met en jeu glutathion S-transférases (GST) ou les uridines diphosphates glycosyltransferases (UGT). Cette étape permet la conjugaison

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

avec des sucres ou des acides aminés. Les métabolites de ces réactions seront ensuite stockés dans des vacuoles ou/et excrétés à l'extérieur de la cellule. Le PPP est ainsi dégradé avant d'avoir pu atteindre sa cible cellulaire

Encadré 3 : Principales familles d'enzymes impliquées dans une métabolisation accrue des substances actives des PPP

- **Les cytochromes P450 :** ces enzymes de la phase I de la métabolisation sont des mono-oxygénases. Elles catalysent le transfert d'un atome d'oxygène moléculaire à un substrat pour former un groupe hydroxyle et la réduction du second atome d'oxygène pour former de l'eau. Ce sont des molécules membranaires situées au niveau du réticulum endoplasmique ou de la membrane interne des mitochondries. Des gènes codant des cytochromes P450 sont présents dans le génome de pratiquement tous les organismes, mais leur nombre est le plus important chez les plantes (Haubruge et Amichot, 1998 ; Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

- **Les carboxylestérases :** les enzymes de cette famille de la phase I de la métabolisation sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse (l'ajout d'une molécule d'eau) à leur substrat. Cela permet d'augmenter la polarité de ce dernier et favoriserait son excrétion. Les estérases peuvent également séquestrer les molécules de sorte que les toxiques ne sont plus disponibles pour interagir avec les protéines cibles (Panini et al, 2016).

- **Les glutathion S-transférases (GST) :** Ces enzymes interviennent dans la phase II de la métabolisation. Très diverses, certaines catalysent la conjugaison du substrat au gluthation, d'autres possèdent des fonctions non catalytiques et agissent comme ligands pour le transport et/ou le stockage des composés toxiques. D'autres enzymes ont une activité peroxydase et réduisent les peroxydes toxiques produits par le stress. Enfin, certaines enzymes participent directement à la métabolisation de l'insecticide (phase I). Ces enzymes peuvent être également impliquées dans la séquestration de la molécule toxique (cf. ci-dessous) (Pavlidi et al, 2018 ; Yuan et al, 2007).

- **Les glycosyltransférases :** Ces enzymes interviennent plutôt dans la phase II de la métabolisation, elles catalysent le transfert d'un groupement « -ose » au substrat. Le donneur du groupement « -ose » est généralement un sucre nucléotidique (tels que l'uridine diphosphate (UDP), la guanosine diphosphate (GDP) et le cytidine monophosphate (CMP)). Les cas de détoxification de pesticides concernent généralement des uridines diphosphates glycosyltransférases (UGT) (Bock et al, 2016).

f) La séquestration de la substance active

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

La séquestration peut se définir comme la capture et le stockage de la molécule toxique par le bioagresseur. Ce mécanisme a été décrit chez *Erigeron canadensis,* la vergerette du Canada, qui est une adventice problématique dans de nombreuses cultures telles que les vignobles et les vergers. La séquestration du glyphosate au sein de vacuoles dans les plantes résistantes a été démontrée chez cette espèce. Cette séquestration rend le glyphosate moins disponible pour sa translocation vers les autres tissus et réduit la quantité de substance active présente dans le cytoplasme, qui est donc en moindre quantité pour entrer dans le chloroplaste et inhiber l'enzyme ciblée, l'EPSPS (Ge et al, 2010). Chez les insectes, des cas de séquestration moléculaire ont été rapportés. Ces mécanismes mettent en jeu des enzymes impliquées dans la résistance métabolique telle que les GST ou les carboxylestérases (Encadré 3 – Figure 10). L'implication des GST dans la séquestration d'un insecticide de la famille de pyréthrinoïdes a par exemple été mise en évidence chez *Tenebrio molitor*, le ténébrion meunier (Kostaropoulos et al, 2001).

g) Mécanisme compensatoire ou de contournement de l'effet d'inhibition du PPP

Ce type de mécanisme repose sur la mise en place d'une voie métabolique permettant de compenser l'inhibition de la molécule ciblée par le PPP. L'exemple le plus connu et étudié concerne la mise en place d'une voie alternative à la respiration cellulaire observée chez plusieurs espèces de phytopathogènes telles que *V. inaequalis* (Steinfeld et al, 2001), *Z. tritici* (Ziogas et al, 1997, Miguez et al, 2003) ou *P. viticola* (Fontaine et al, 2019). Cette voie repose sur l'induction de l'expression d'une oxydase alternative qui permet de contourner le complexe inhibé. Ce mécanisme est responsable d'une résistance à tous les inhibiteurs du complexe III de la chaine respiratoire.

3.3. Résistances croisées, Résistances multiples

Dans le cas complexe des résistances dites croisées, le bioagresseur présente une perte de sensibilité à plusieurs substances actives qui n'appartiennent pas forcément à la même famille chimique et/ou ne ciblent pas nécessairement la même cible moléculaire. Dans le cas où ces résistances croisées concernent des résistances de cible, la résistance affectera toutes (ou une partie des substances actives) de la famille chimique visant la même cible cellulaire. Pour exemple, la mutation *kdr* (L1014F) du canal sodium est répandue chez de nombreuses espèces de ravageurs. Elle est responsable d'une diminution de sensibilité vis-à-vis des insecticides de la famille de pyréthrinoïdes ainsi qu'au DDT, un organochloré (Martinez-Torres et al, 1999 ; Davies et al, 2008). Les résistances croisées peuvent également être la conséquence de mécanismes de RNLC, par exemple via la détoxication. Ils sont souvent plus problématiques car ils induisent un spectre de PPP imprévisible. Ils peuvent par exemple entrainer une baisse de sensibilité vis-à-vis de PPP qui ont des cibles cellulaires très diverses, complexifiant ainsi grandement la lutte contre le bioagresseur et la gestion de la résistance (Yu et Powles, 2014). De plus, les résistances croisées peuvent concerner des produits qui ne

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

sont pas encore homologués. Chez l'espèce *C. pomonella,* des populations résistantes aux néonicotinoïdes et au spinosad étaient rapportées en France dès 2007 alors qu'il n'y avait pas encore eu d'application de ces insecticides (Reyes et al, 2007).

En plus des résistances croisées, un bioagresseur peut aussi cumuler plusieurs mécanismes de résistances au sein d'un même individu, phénomène qui est désigné par le terme de résistance multiple. Par exemple, chez l'espèce *M. persicae,* ont été retrouvés des individus cumulant des RLC impliquant des mutations affectant deux protéines différentes du système nerveux : l'acétylcholinestérase, la cible des carbamates, et le canal sodium, la cible des pyréthrinoïdes (Fontaine et al, 2011 ; Mingeot et al, 2021, Hlaoui et al, 2022).

4. L'étude des résistances au laboratoire

Les laboratoires impliqués dans l'analyse des résistances aux PPP ont une fonction essentielle dans l'étude, la détection et le suivi des phénomènes de résistance aux PPP. Ils jouent un rôle dans la détection précoce des résistances avant que des pertes d'efficacité au terrain (*i.e.* résistance pratique ou résistance au champ) soient perceptibles. Les expérimentations menées en laboratoire sont également essentielles pour caractériser les mécanismes qui ont évolué, étudier les potentiels coûts biologiques associés à la résistance et les répartitions spatio-temporelles des résistances. Initialement, les études au laboratoire étaient réalisées à l'aide des approches biologiques, elles se sont ensuite enrichies des approches biochimiques (Brogdon et al, 1989) puis de biologie moléculaire (Capote et al, 2012).

4.1. Les tests biologiques

Ces tests reposent sur la mesure de la sensibilité d'un bioagresseur vis-à-vis d'une substance active pesticide dans des conditions contrôlées (laboratoire, enceintes climatiques ou serres). Ils consistent à mesurer un trait phénotypique tel que :

- la croissance mycélienne, le taux de germination (Secor et al, 2012), le taux de sporulation (Genet et al, 1997) ou les dégâts sur feuilles (Petsikos-Panayotarou et al, 2003) pour les champignons et oomycètes phytopathogènes ;
- la mortalité (Nauen et al, 2003) pour les ravageurs ;
- un taux de germination, de survie, de croissance chez les adventices (Burgos et al, 2013).

La mesure du trait phénotypique peut être réalisée en gamme de doses de pesticide ou en utilisant une unique dose dite discriminante. Les tests en gamme de doses sont généralement utilisés pour initier l'étude de la résistance à une substance active donnée chez une espèce de bioagresseur. Ce type de test consiste à mesurer le trait phénotypique dans une condition contrôle et suite à l'exposition à une dose croissante de PPP (ou de la substance active du PPP). Cela permet de déterminer la dose qui a un effet à 50% de l'effet maximum observé (l'inhibition totale). Les termes de dose létale à 50% (DL50) ou de concentration

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

inhibitrice à 50% (CI50) sont généralement utilisés pour la mesure de mortalité (chez les ravageurs) ou de l'inhibition d'un trait phénotypique, respectivement. Ces DL50 ou CI50 sont déterminées par modélisation via les modèles de régression logistique (Sebaugh, 2011). Le terme plus générique de concentration ou dose efficace à 50% (CE50 ou DE50) est également couramment utilisé à la place de la DL50 ou CI50 (Neubig et al, 2003). En plus de permettre une évaluation quantitative de la sensibilité/résistance d'un individu, le calcul de l'effet inhibiteur à 50% est nécessaire pour la détermination du facteur de résistance (FR). Celui-ci correspond au rapport entre les doses ayant un effet inhibiteur de 50% pour l'individu étudié et pour un individu sensible (Figure 11). Ce FR permet d'évaluer le niveau de la résistance et de comparer les individus entre eux. Les tests en gamme de dose de pesticide permettent également de définir la dose la plus faible qui a un effet de 100% (CMI, pour Concentration Minimale Inhibitrice ou DL100, pour Dose Létale pour 100% des individus testés). Cette donnée permet de fixer une dose pour réaliser des tests en dose discriminante. Ces tests sont conduits avec une seule dose fixée sur un individu ou une population de telle façon qu'elle discrimine les individus (populations) sensibles des individus (populations) résistants.

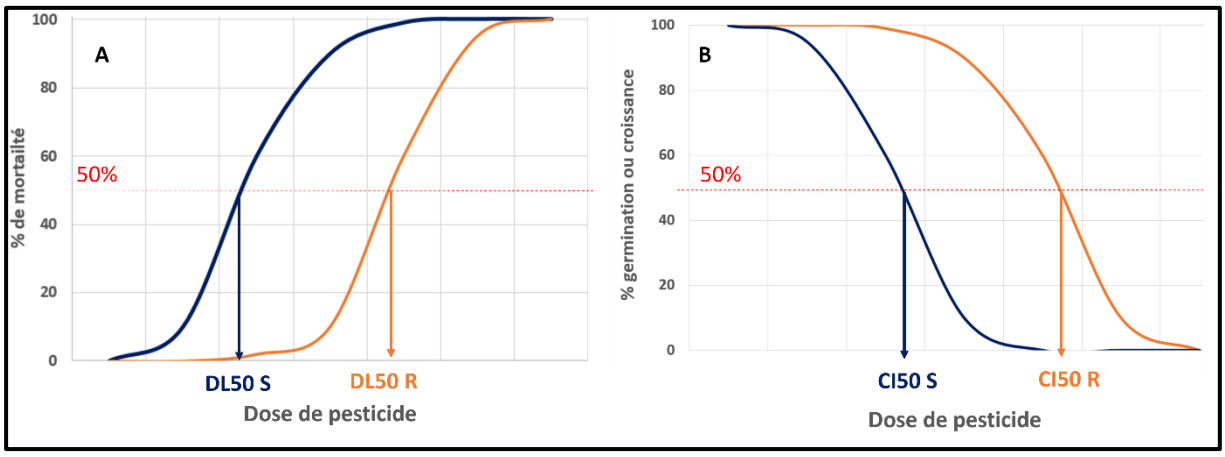


Figure 11 : Exemple de courbe dose réponse en fonction d'une dose de pesticide. A. Mesure de la mortalité. B. Inhibition d'un trait phénotypique (germination, croissance, …)**.** En bleu et orange les courbes dans le cas d'une population sensible et résistante, respectivement. DL50 : Dose létale pour 50% des individus ; CI50 : Dose pour laquelle 50% d'inhibition est observée.

Ces approches phénotypiques ont l'avantage de mettre en évidence la résistance quel(s) que soit le(s) mécanisme(s) en jeu. L'ajout d'une modalité avec un synergiste inhibiteur de certaines enzymes peut également permettre de mettre en évidence l'implication d'un mécanisme de résistance métabolique. Ces tests sont peu automatisables et donc coûteux en main d'œuvre et en temps. Leur mise en œuvre peut nécessiter parfois beaucoup d'espace (serres, enceintes climatiques, …) (R4P-network, 2016). De plus, pour la réalisation de ce type de tests il est préférable d'être en mesure de cultiver ou d'élever les bioagresseurs dans des conditions de laboratoire et de maintenir des lignées ou des populations de bioagresseurs sensibles afin d'inclure des témoins dans les analyses et d'évaluer les niveaux des résistances. Enfin, la mesure des traits phénotypiques est généralement réalisée visuellement, ce qui peut être source de variabilité (R4P-network, 2016). Des dispositions doivent être mises en œuvre afin de limiter cette variabilité que cela soit entre opérateurs ou entre répétitions dans le

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

temps. Si le principe général des tests biologiques est semblable pour tous les bioagresseurs, les tests réalisés pour chaque type de bioagresseurs présentent certaines spécificités.

a) Les tests biologiques de résistance aux fongicides pour les champignons et oomycètes phytopathogènes

Ces tests biologiques sont réalisés à partir des spores issues de lésions cryptogamiques sur différents organes (feuilles, fruits, fleurs) selon l'agent phytopathogène analysé. À l'exception des biotrophes obligatoires, ils sont réalisés le plus souvent en boites de Petri sur des milieux artificiels. Dans ces cas, les tests biologiques peuvent être effectués à partir de cultures obtenues par isolement de monospores pour les tests de croissance mycélienne ou sur des populations de spores pour les tests en germination de spores (Figure 12A et B) (Tymon et al, 2014). Le choix entre les deux méthodes dépendra des objectifs des analyses, des caractéristiques du phytopathogène et du fongicide étudié. Les tests en germination de spores ont l'avantage de permettre d'étudier en quelques jours la sensibilité d'une population de spores à un fongicide (Staub et Sozzi, 1984). Cependant ces tests ne sont pas toujours réalisables, certains champignons sporulant très lentement voire difficilement, et certains fongicides n'ayant pas d'effet inhibiteur sur la germination des spores (Staub et Sozzi, 1984). Les tests en croissance mycélienne sont souvent plus lourds à mettre en œuvre. Ils nécessitent d'isoler individuellement des spores qui proviennent de lésions où se sont parfois développés d'autres champignons saprophytes. Des cycles de repiquages sont par conséquent souvent nécessaires pour purifier un isolat. Ces tests sont réalisés en amendant en fongicide le milieu de culture et la mesure de la croissance est généralement réalisée après plusieurs semaines. De plus, cette méthode nécessite de réaliser un nombre significatif d'isolements pour être représentative d'une population (Staub et Sozzi, 1984). Des méthodes permettant de miniaturiser les protocoles et de réaliser des lectures avec un automate sont parfois développées. Ces tests sont généralement réalisés en microplaque avec une mesure de la densité optique qui reflète le taux de croissance mycélienne ou de germination (Frąc et al, 2016, Matsuzaki et al, 2021).

Pour les biotrophes obligatoires (les Oomycètes, les Erysiphales), les sporulations issues du terrain doivent être mises en culture sur des feuilles en survie (Figure 12C) ou sur plantes entières à un stade physiologique adapté à l'agent phytopathogène (Massi et al, 2021 ; Lebeda et al, 2010). La réalisation des tests biologiques avec ces agents phytopathogènes en est donc complexifiée. L'exposition du bioagresseur à la substance active peut se faire soit par le traitement avec le fongicide des plantes ou feuilles en survie (par trempage ou pulvérisation), soit par un mélange des solutions de spores servant à l'inoculation avec le fongicide.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

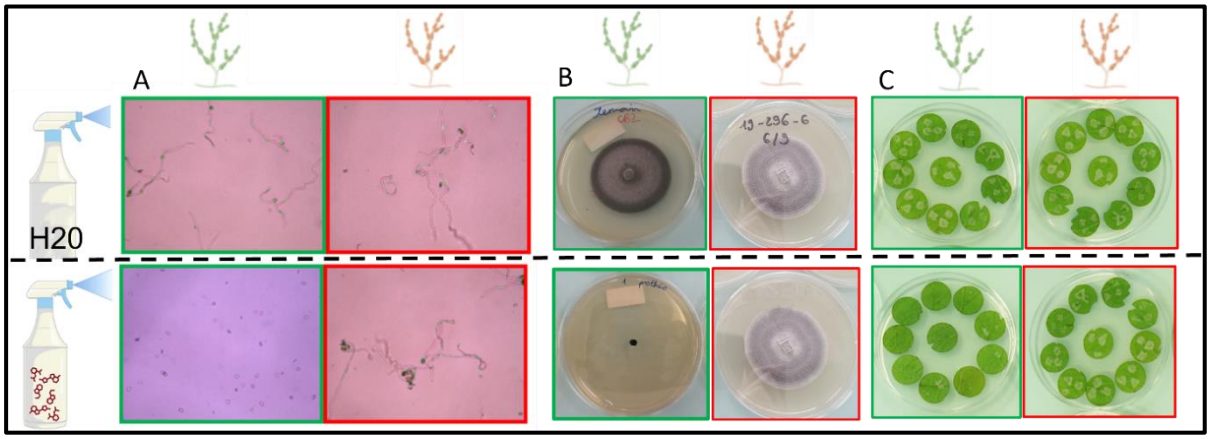


Figure 12 : Principes des tests de résistance aux fongicides les plus courants pour les champignons et oomycètes phytopathogènes. En vert et en rouge, les phénotypes observés pour les individus ou populations sensibles et résistants, respectivement, en condition non traitée (en haut) *et* traitée (en bas). A. test en germination de spores ; B. test en croissance mycélienne ; C. test sur disques foliaires pour un biotrophe obligatoire.

b) Les tests biologiques de résistance aux insecticides

Ces tests biologiques sont réalisés à partir d'individus collectés au champ. Ils peuvent être effectués directement sur les individus récoltés, mais le plus souvent des étapes d'élevage et de cycles de reproduction au laboratoire sont nécessaires afin d'obtenir un nombre d'individus suffisant au stade physiologique désiré. En effet, il est possible que la sensibilité d'une espèce d'insecte aux insecticides varie selon le stade de développement. Par exemple, certains insecticides, tels que les produits à base de toxine *Bt*, n'ont qu'un effet larvicide et, d'une manière générale, les stades larvaires sont souvent plus sensibles que les stades adultes (Prabhaker et al, 1989 ; Leonova et Slynko, 2004). Les tests doivent donc être conduits sur des individus au même stade de leur cycle de vie. Le mode d'application sera également différent selon les caractéristiques du bioagresseur et celles de l'insecticide. Ainsi, les modes d'application les plus courants sont :

- l'application topique qui correspond au dépôt sur le thorax ou l'abdomen de l'insecte d'une gouttelette calibrée de l'insecticide (Armes et al, 1992) (Figure 13A);
- la pulvérisation direct de l'insecticide (Suckling et al, 1984) (Figure 13B);
- le trempage de feuilles dans l'insecticide, ce type de tests est généralement utilisé pour les insectes dits piqueurs-suceurs tels que les pucerons, aleurodes, thrips (…) (Herron et James, 2005) (Figure 13C) ;
- le contact tarsal qui consiste à placer les insectes dans un contenant imprégné d'insecticide (Blouquy et al, 2021) (Figure 13D) ;
- l'ingestion en plaçant de l'insecticide directement dans un milieu nutritif (Tibola et al, 2021) (Figure 13E).

-

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

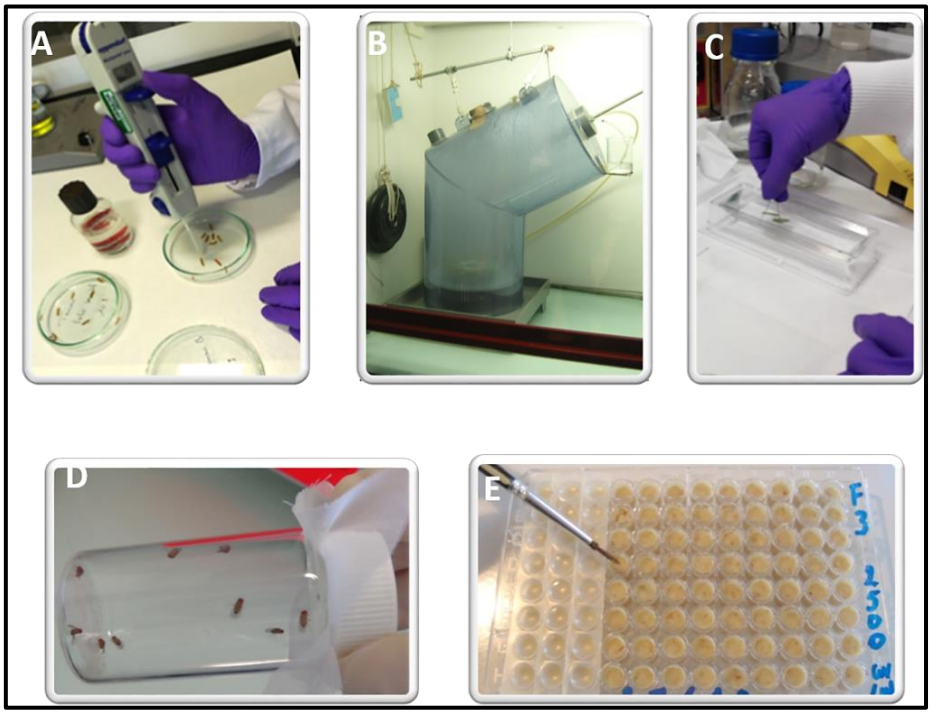


Figure 13 : Exemples des principaux modes d'application pour les tests de résistance aux insecticides. A. Application topique de l'insecticide sur des larves ; B. Pulvérisation de l'insecticide avec une tour de Potter-Burgerjon ; C. Trempage de feuilles dans une solution insecticide pour les tests avec des insectes piqueurs-suceurs ; D. Flacon dont les parois sont imprégnées d'insecticide pour un test par contact tarsal ; E. milieu nutritif amendé en insecticide pour tests sur stade larvaire.

Après une période définie d'exposition à l'insecticide, la mortalité est mesurée par dénombrement des individus morts et vivants. La mortalité est généralement corrigée à l'aide de la formule d'Abbott (Abbott, 1925) qui permet de prendre en compte la mortalité naturelle (car au cours d'une expérience quelques insectes meurent pour des causes naturelles et non à cause de l'insecticide) :

$$\textbf{mortalité corrigée} = \frac{(\%\text{ de vivants modalité non traité} - \%\text{ de vivants modalité traitée})}{\%\text{ de vivants modalité non traité}} \text{x}100$$

c) Les tests biologiques pour les adventices

Ces tests biologiques nécessitent de collecter au champ des graines matures des adventices à étudier ou plus rarement en réalisant des boutures (Boutsalis, 2001). Les graines doivent être placées dans des conditions propices à la levée de la dormance puis être mises à germer (Beckie et al, 2000). Les tests sont ordinairement conduits en serre. Le traitement est réalisé généralement par pulvérisation (Figure 14A) à un stade de développement des plantes qui correspond au stade de traitement au champ. Le substrat de culture pourra être différent selon le mode d'application de l'herbicide, en pré- ou post-levée (Beckie et al, 2000). L'effet

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

de l'herbicide (mortalité, inhibition de la croissance, dégâts foliaires…) est généralement mesuré ou évalué quelques semaines après traitement. Des tests « miniatures » adaptés au laboratoire existent également. Ils ont l'avantage de fournir des résultats plus rapidement (quelques jours en général). Ils sont réalisés sur les semences (Figure 14B) ou sur des disques de feuilles traités. Dans le premier cas, les graines sont placées sur un milieu gélosé traité (Perez et al., 2021) ou placées en contact avec l'herbicide après avoir été mises à pré-germer (Delye et al, 2002). Les tests en disque de feuilles ont l'avantage d'être non destructifs pour les plantes étudiées (Wu et al, 2021).

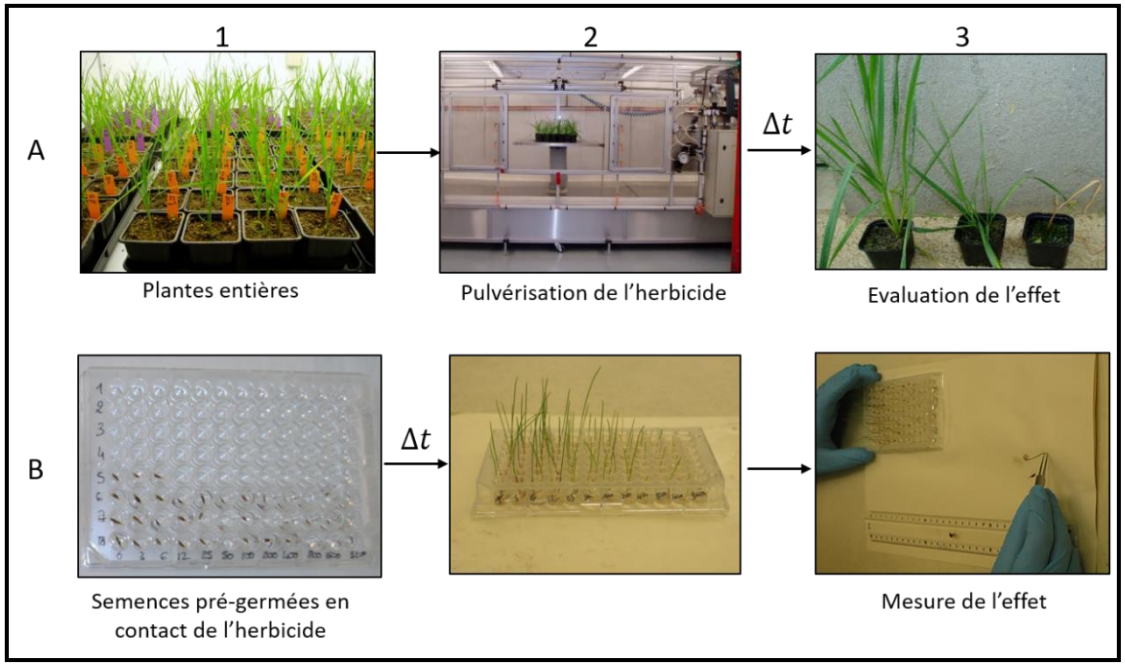


Figure 14 : Principe général d'un test de résistance à un herbicide sur plantes entières et sur semences pré-germées. A. Les plantes cultivées en pot sont issues des graines ou de boutures provenant du champ (1). Traitement par pulvérisation à l'aide d'un banc de traitement (2). Évaluation visuelle de l'effet sur la croissance et les dégâts foliaires (3). B. Les semences pré-germées sont placées directement dans une solution d'herbicide à dose croissance (1). Les semences sont placées dans les conditions favorables à leur germination (2). La longueur des coléoptiles est mesurée après quelques jours (3).

4.2. Les approches biochimiques

Les tests biochimiques les plus couramment utilisés ont pour objectif de quantifier l'activité d'une enzyme en présence et en absence d'un PPP. Ils sont essentiellement appliqués pour la recherche et la caractérisation des résistances aux insecticides et aux herbicides. Ces approches biochimiques ont l'avantage d'être peu coûteuses, assez rapides et de permettre une lecture normalisée des résultats (Brogdon, 1989 ; R4P-network, 2020). La quantification de l'activité enzymatique est généralement réalisée à partir d'extraits protéiques provenant du broyat d'un seul ou de plusieurs individus (Rodríguez et al, 2011) voire d'un organe spécifique (Rose et al, 1995). Les activités enzymatiques entre individus sensibles et résistants peuvent être ainsi facilement comparées. Les tests biochimiques reposent souvent sur des approches spectrophotométriques impliquant l'utilisation d'un substrat dont la coloration évoluera lorsqu'il sera dégradé ou transformé par l'enzyme. La mesure de l'absorbance de la

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

lumière en présence et en absence de PPP sera révélatrice de l'activité enzymatique et de son inhibition (Rodríguez et al, 2011). Par l'utilisation de substrats spécifiques, ces tests permettent de mesurer l'activité des enzymes impliquées dans le processus de détoxication de la molécule toxique (cytochromes P450, glutathione-S-transférases, glycosyltransférases, estérases) (Rose et al, 1995). Des approches immunochimiques de type ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") ont également été développées (Devonshire et al, 1986 ; Reade et Cobb, 2002) avec une mesure de la fluorescence qui sera proportionnelle au niveau de l'activité de l'enzyme étudiée. Ces approches sont également applicables pour l'analyse des mécanismes de résistance liés à une modification de la cible. Dans ce cas, la mesure de l'activité de l'enzyme ciblée par le PPP mettra en évidence soit une surproduction de l'enzyme soit une modification de l'affinité de liaison entre l'enzyme et la substance pesticide (Stumpf et al, 2001). Il s'agit de tests complémentaires aux tests biologiques et plus rarement utilisés seuls dans un objectif de surveillance des résistances aux PPP (Denholm et al, 1990).

De manière plus anecdotique, d'autres approches biochimiques peuvent être utilisées dans l'études des résistances à des fins de recherches. Elles sont plus lourdes à mettre en œuvre et nécessitent des équipements plus coûteux. Certaines de ces approches reposent sur des méthodes de caractérisation et d'études des protéines. Par exemple, chez *H. armigera*, Bai et al (2019) ont isolé puis caractérisé le rôle d'une carboxylésterase dans la métabolisation de pyréthrinoïdes à l'aide de techniques de spectrométrie de masse et de chromatographie. Enfin, des techniques utilisant un ligand marqué par un radio-isotope sont également utilisées afin d'étudier l'impact de mutations dans l'affinité avec une substance active (Roditakis et al, 2017) ou pour suivre l'évolution de la substance active au sein d'un bioagresseur (Yu et al, 2009).

4.3. Les principales approches de biologie moléculaire

Ces approches reposent sur l'étude des acides nucléiques (ADN ou ARN). Leur principe général se base sur l'identification et l'utilisation de marqueurs génétiques associés aux phénotypes résistants. Ces marqueurs peuvent être des variations de séquences ou d'expression de gènes. L'impact de ces variations peut être exploré par divers outils de biologie moléculaire (interférence par l'ARN, édition de génomes par CRISPR/Cas9, expression hétérologue) (Fisher et Meunier, 2008 ; Homem et Davies, 2018), de biochimie (Rauch et Nauen, 2003) ou par modélisation de la structure 3D des protéines ciblées (Sindhu et al, 2017).

Les approches biologie moléculaire ont l'avantage de pouvoir être réalisées à tous les stades de développement d'un bioagresseur, sur un tissu, un individu ou un mélange d'individus. De plus, elles peuvent être appliquées sur des organismes vivants ou morts à condition de préserver les acides nucléiques de toute dégradation. ADN ou ARN doivent généralement être purifiés avec des procédures qui seront spécifiques du type d'échantillon étudié et de la méthode d'analyse qui sera mise en œuvre.

Initialement les approches de biologie moléculaire apportaient une information qualitative généralement au niveau d'un locus ou d'un nombre très restreint de loci. Les évolutions technologiques ont permis ensuite de développer des approches quantitatives qui permettent d'évaluer la fréquence d'un marqueur de résistance au sein de populations ou d'étudier l'expression d'un gène chez un individu. Les techniques de séquençage ont facilité

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

le génotypage multiloci sur un même gène et donné accès à l'information haplotypique, elles peuvent être qualitatives dans le cas du séquençage Sanger ou quantitatives avec les techniques de séquençage à haut débit plus récemment développées.

a) Les approches qualitatives pour un seul locus

➢ ***Les diverses approches de PCR diagnostique***

La technique de PCR ("Polymerase Chain Reaction") a été publiée pour la première fois par Saiki et al (1985) en vue du diagnostic prénatal de l'anémie falciforme. Dans le cadre de l'étude des résistances aux PPP, les approches basées sur la PCR ont commencé à être utilisées au début des années 1990 (Broomfield et al, 1992). Ces méthodes ont été développées essentiellement pour rechercher des mutations connues pour être impliquées dans des mécanismes de résistance (généralement liés à la modification de la cible). Il existe de nombreuses variantes de la PCR, dont les principales sont présentées dans l'Encadré 4.

Encadré 4 : Les principales variantes des approches PCR « classiques »

- **PCR-RFLP ou PCR-CAPS** ("Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism ou - Cleaved Amplified Polymorphic Sequences") : basée sur le fait que la mutation impliquée dans la résistance va créer ou éliminer un site de restriction (coupure) d'une enzyme. Ainsi, la zone d'intérêt du génome amplifiée par PCR sera mise à digérer en présence d'une enzyme de restriction. L'électrophorèse des produits de la digestion permettra de discriminer facilement les échantillons ayant été digérés des autres (Rosenzweig et al, 2015).
- **PCR-dCAPS** ("Polymerase Chain Reaction - derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences") : c'est une variante de la PCR-RFLP. Dans cette variante, c'est un mésappariement d'une base dans l'une des amorces qui est à l'origine de la création d'un site de restriction dans l'une des deux séquences (mutée ou non mutée) (Mottet et al, 2016). Comme précédemment la migration des produits digérés permettra de discriminer les allèles.
- **PCR-AS** ("Polymerase Chain Reaction - Allele Specific") : Cette variante permet l'amplification d'un allèle spécifique et est utile pour rechercher une mutation particulière. Cette technique nécessite la conception d'une amorce spécifique à un allèle. Cette amorce comporte à son extrémité 3' la base correspondant à une mutation associée à la résistance. Elle sera donc mal appariée à cette position pour les autres allèles. L'avantage de cette approche est qu'elle ne nécessite pas de digestion en revanche elle est souvent fastidieuse à mettre au point car les conditions d'amplification de l'allèle spécifique sans amplifier les autres allèles doivent être définies avec grande précision. De plus elles sont souvent multiplexées, c'est-à-dire qu'un second jeu d'amorces est utilisé pour amplifier dans la même réaction de PCR une autre cible d'ADN présent chez tous les individus. Ce second couple permet la validation de la réaction de PCR dans le cas où l'allèle de l'amorce spécifique n'est pas présent dans l'extrait (Grabke et al, 2013). Le terme de PCR-ARMS (Polymerase Chain Reaction - Amplification-Refractory Mutation System) est également utilisé.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les diverses approches de PCR diagnostique sont généralement utilisées pour le génotypage individuel des bioagresseurs. La visualisation des amplifications se fait le plus souvent par électrophorèse des amplicons grâce à des molécules fluorescentes qui ont la capacité soit de s'intercaler entre les deux brins d'une molécule d'ADN, ou entre les bases de molécules d'ADN ou d'ARN simple brin (comme le bromure d'éthidium anciennement utilisé), soit de se fixer chimiquement aux acides nucléiques (comme le SYBR green). Les techniques basées sur l'utilisation de la PCR ont l'avantage d'être facilement applicables dans les laboratoires et sont devenues très abordables (quelques euros par réaction). Cependant, les coûts en main d'œuvre et en consommables s'accroissent rapidement lorsque l'on souhaite étudier un grand nombre d'individus ou de multiple loci. Le développement de systèmes de PCR sur plaque multi-puits (voire multi-plaques), couplés à des systèmes de migration par électrophorèse capillaire ont néanmoins permis d'améliorer les capacités d'analyses.

- ***L'approche de LAMP ("Loop-Mediated Isothermal Amplification")***

La technique de LAMP, développée en 2000 (Notomi et al, 2000), est une alternative aux approches de PCR classique. Contrairement aux différents cycles d'une PCR (dénaturation, hybridation des amorces, synthèse), qui sont réalisés à des températures différentes, la réaction est réalisée à température constante comprise entre 60-65°C. Elle a l'avantage de ne pas comporter d'étape de purification des acides nucléiques. La détection peut se faire à l'œil nu par l'apparition d'une turbidité (Mori et al, 2001) ou via l'apparition d'une coloration liée au changement de pH (Duan et al, 2016) ou avec des réactifs qui produisent un signal fluorescent lorsqu'ils se lient à l'ADN (Tomita et al, 2008). Rapide et simple de mise en œuvre, c'est un outil de diagnostic utilisable pour rechercher une mutation ponctuelle au laboratoire mais également au terrain (Duan et al, 2016). Sa mise au point reste néanmoins complexe car l'amplification en boucle nécessite le design de deux amorces internes et de deux amorces externes qui, ensemble, ont six séquences complémentaires des séquences ciblées (Figure 15). La conception des amorces est faite de façon à ce que l'ADN amplifié génère des boucles qui seront-elles mêmes amplifiées parfois à l'aide d'amorces supplémentaires pour plus de rapidité (Figure 15).

Cette méthode est considérée comme plus sensible que la PCR pour la détection de mutations impliquées dans la résistance aux PPP que cela soit pour des résistances aux fongicides (Wu et al, 2019b ; Duan et al, 2014), aux insecticides (Sial et al, 2020 ; Uchibori-Asano et al, 2022) ou aux herbicides (Panozzo et al, 2023). L'intérêt de cette technique réside dans son application facile au champ. Néanmoins les kits commercialisés actuellement sont principalement destinés au diagnostic de maladies (virus, champignons…) et non pour identifier des marqueurs de résistance aux PPP (Mohamadi et al, 2022).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

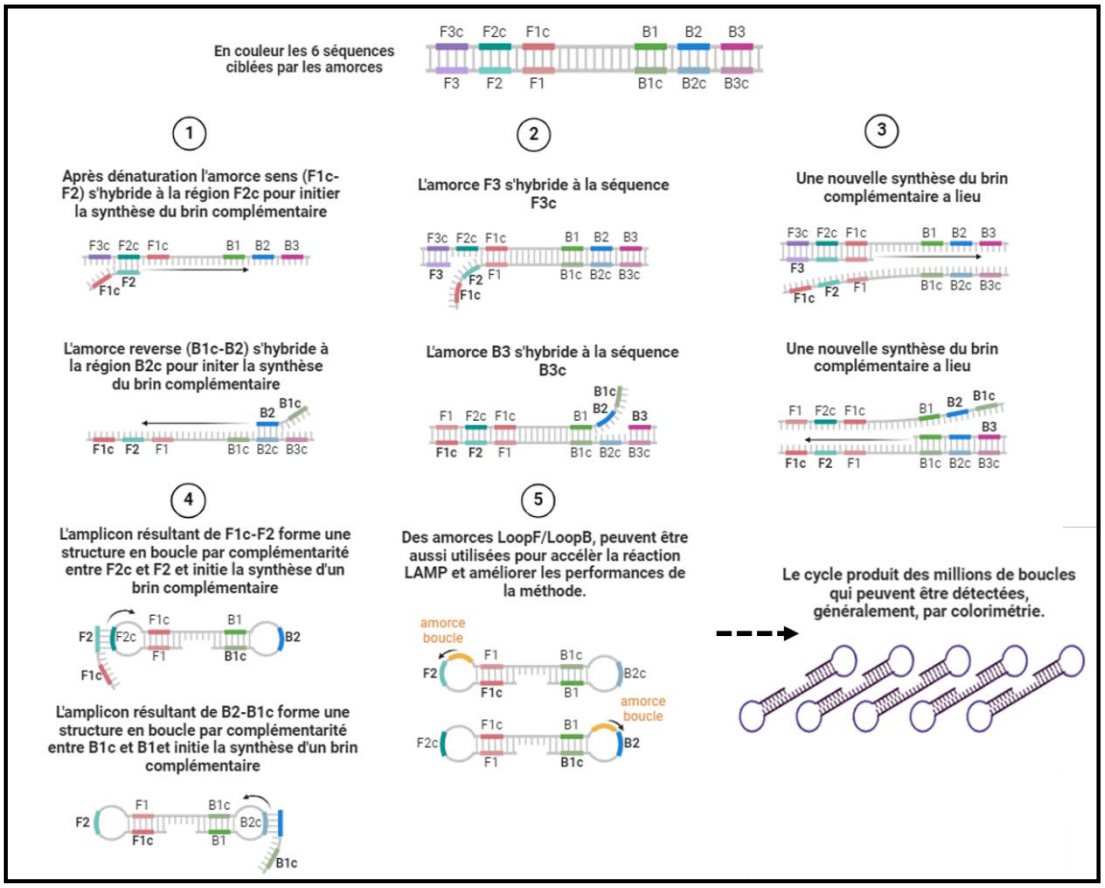


Figure 15 : Principe de la méthode LAMP basée sur la synthèse d'ADN en condition isotherme à l'aide d'une polymérase Bst (*Bacillus stearothermophilus*). Les amorces internes contiennent deux séquences qui correspondent chacune au brin sens (F1c-F2) et antisens (B1c-B2) de l'ADN cible. Les amorces internes initient une synthèse complémentaire de l'ADN cible (1) tandis que les amorces externes (F3 et B3) en s'hybridant (2) initient une synthèse par déplacement de brin qui provoque la libération de l'ADN simple brin synthétisé à partir des amorces internes (3). L'ADN simple brin forme des boucles par auto-hybridation des séquences correspondantes (4) et agit comme matrice pour la suite de l'amplification exponentielle. L'ajout d'amorces s'hybridant au niveau des régions en boucles peut être réalisé pour augmenter les performances de la LAMP (5). (Figure adaptée de Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) - https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-602d7f65de479700a8be7e7a-loop-mediated-isothermal-amplification-lamp%20-%20BioRender%202011)

b) Les approches quantitatives et monolocus

- ***<u>La PCR quantitative (qPCR)</u>***

La PCR quantitative, développée dans les années 1990 (Higuchi et al, 1993), permet le suivi en temps réel des réactions d'amplification par PCR. Les technologies utilisées reposent sur la détection et la quantification des amplicons générés pendant la réaction de PCR *via* une mesure de fluorescence. L'émission de fluorescence mesurée au cours de la PCR est dépendante de la quantité de la séquence cible de départ. Il existe deux types de technologie de détection qui permettent de suivre le signal d'amplification. La première utilise

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

le SYBR® green, un agent capable de se fixer sur les acides nucléiques double brin. La deuxième utilise des sondes oligonucléotidiques marquées avec un fluorochrome. Ces sondes se lient directement à des séquences complémentaires et vont donc accroître la spécificité de détection comparativement au SYBR green. Il existe une grande diversité de fluorochromes et différents types de sondes : sondes Taqman, hybridation de deux sondes, balises moléculaires (Molecular Beacon's) et les amorces scorpions (Poitras et Houde, 2002).

Les approches de PCR quantitative sont surtout plébiscitées dans l'étude des résistances en vue de quantifier :

- un allèle particulier au sein d'une population d'individus (Fraaije et al, 2005 ; Dufour et al, 2011)
- l'expression d'un gène à partir de l'ARN (retrotranscrit en ADNc préalablement à la qPCR) dans le cas de mécanismes de résistance impliquant la surexpression d'une protéine cible (Cools et al, 2012), d'une protéine impliquée dans des voies métaboliques de détoxication (Puinean et al, 2010) ou d'excrétion (Wang et al, 2021a).

Bien que privilégiée pour la quantification d'un allèle dans une population ou pour étudier l'expression d'un gène, la qPCR peut être également utilisée dans le cadre du génotypage à l'aide de sondes (Anstead et al, 2004) ou *via* des méthodes basées sur l'analyse des courbes de fusion à haute résolution (*i.e*. HRM pour "High Resolution Melting") (Chatzidimopoulos et al., 2014 ; Samara et al, 2016). Cette dernière approche consiste à analyser, à la fin de la qPCR, le profil de dénaturation des amplicons obtenus. Celui-ci est directement dépendant de la séquence d'acides nucléiques (Figure 16).

Ces approches offrent l'avantage d'être plus sensibles que la PCR classique. De plus, elles ne nécessitent pas de manipulation après amplification, limitant ainsi les problèmes de contamination. Enfin, la lecture et l'analyse des résultats sont totalement automatisées. Ce sont des approches qui nécessitent néanmoins un investissement plus important dans la mise au point afin de valider la spécificité, la sensibilité et de déterminer l'efficacité de la méthode.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

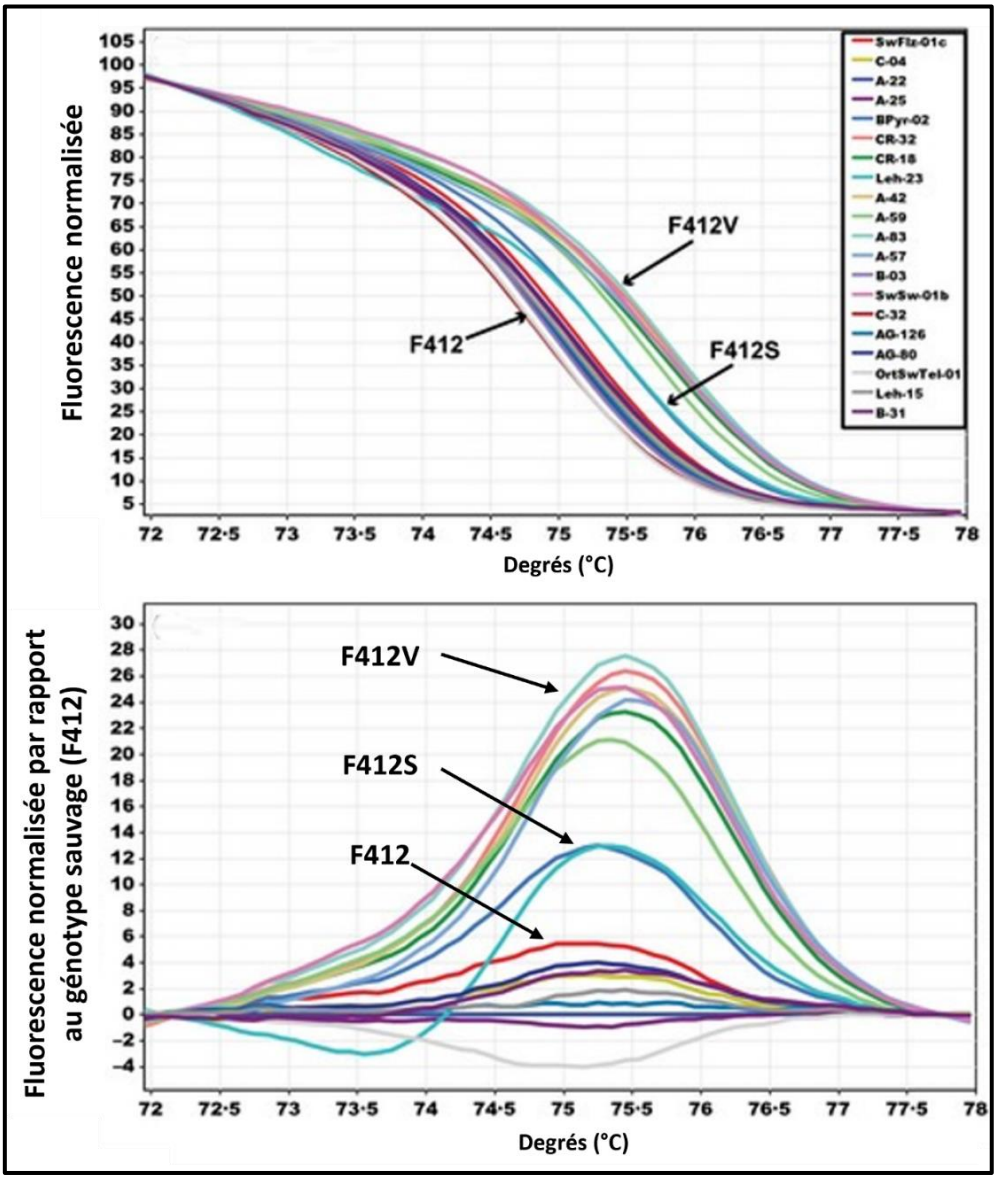


Figure 16 : Exemple de résultats d'analyse HRM en vue de détecter des polymorphismes en position 412 dans le gène de la protéine Erg27 impliqué dans la résistance au fenhexamid chez l'agent de la pourriture grise, *B. cinerea*. L'analyse de l'évolution de la fluorescence émise au cours de la dissociation avec des données normalisées par rapport au bruit de fond (A) et par rapport génotype sauvage. (B). Les courbes de fusion sont regroupées selon trois groupes distincts, chacun correspondant à un polymorphisme en position 412 du gène de la protéine Erg27 : F412 pour l'allèle sauvage, F412V ou F412S pour les deux mutations impliquées dans la résistance au fenhexamid (Figure adaptée de Chatzidimopoulos et al, 2014).

- ***La PCR digitale***

La PCR digitale permet, de manière similaire à la qPCR, la quantification absolue d'un échantillon sans la nécessité de déterminer l'efficacité de la qPCR à l'aide de courbe d'étalonnage. Dans la PCR digitale, l'échantillon est fractionné de façon à avoir des milliers de réactions individuelles avant amplification. Il existe différentes méthodes de fractionnement à l'origine de différentes variantes de la PCR digitale (dPCR). La partition de l'échantillon peut

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

se faire par compartimentation dans des micro-chambres ou par division en plusieurs milliers voire plusieurs millions de gouttelettes pour la Droplet dPCR. La mesure de fluorescence de chaque micro-chambre ou gouttelette permettra, à l'aide de la loi de Poisson, de déterminer le nombre initial de copie de l'ADN recherché (Vogelstein et Kinzler, 1999). Cette approche permet de rechercher un allèle impliqué dans une résistance dans un groupe d'individus avec une limite de détection très basse (Mavridis et al, 2022b).

En répartissant aléatoirement les molécules dans les fractions, contrairement à l'analyse globale en qPCR, la dPCR limite les effets des cibles concurrentes, améliore la précision et la sensibilité de détection des événements rares (Pekin et al, 2011). De plus, elle est moins sensible à l'effet de certains inhibiteurs (Huggett et al, 2015). C'est donc une technique très performante pour détecter précocement dans des populations un allèle impliqué dans une résistance. Par exemple, Mavridis et al (2022a) ont développé un outil de dPCR capable de détecter des mutations impliquées dans des résistances de cible à des insecticides chez *B. tabaci,* l'aleurode du tabac, avec une limite de détection de 0,2%, soit un individu hétérozygote mélangé à 249 individus homozygotes sauvages.

c) Les approches multilocus

- ***Le séquençage Sanger ou bas débit***

Le séquençage de l'ADN permet de déterminer la succession des bases A, C, G et T d'un fragment d'ADN donné et de pouvoir étudier l'information contenue dans cette séquence. Le séquençage à bas débit le plus connu repose sur la technologie Sanger décrite pour la première fois en 1977 (Sanger et al, 1977). Elle s'est largement diffusée et reste encore très utilisée. La commercialisation d'automates et le développement de la PCR dans les laboratoires ont grandement participé au succès de cette méthode (Lamoril et al, 2008). Le principe repose sur la dénaturation d'un fragment ADN, amplifié au préalable par PCR, afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide de deux amorces spécifiques et complémentaires du brin étudié (sens ou antisens), une Taq polymérase va synthétiser l'ADN complémentaire. Au cours de la synthèse, l'enzyme va ajouter par complémentarité un désoxyribonucléotide-triphosphates (dNTP) ou une version chimiquement modifiée du nucléotide, un didéoxyribonucléotide-triphosphates (ddNTP). Ces ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont à une plus faible concentration que le dNTP et ils sont marqués, dans les applications les plus récentes, à l'aide de fluorochromes différents pour chaque ddNTP (fluorochromes « quatre couleurs »). Ponctuellement et aléatoirement, un ddNTP va être incorporé à la place d'un dNTP et entrainer l'arrêt de la synthèse d'ADN par la Taq polymérase. À la fin du séquençage, des fragments de tailles variables ont donc été synthétisés. L'analyse des fragments marqués est réalisée par électrophorèse capillaire à l'aide d'un séquenceur qui détecte les signaux émis par leur fluorochrome. Les signaux lumineux analysés par un logiciel permettent de traduire l'électrophérogramme en une séquence nucléotidique.

La technique de Sanger permet l'obtention de séquences de 1000 pb au maximum. Elle a l'avantage de pouvoir détecter une ou des mutations sur une séquence ciblée sans *a priori* quant à la position de la base mutée. Non quantitative, elle est réalisée individu par individu et elle n'est raisonnablement utilisable que pour une surveillance sur un nombre

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

limité d'individus (R4P-network, 2016). Dans le cadre de la surveillance des résistances, cela reste une méthode très utile pour identifier du polymorphisme dans un gène donné permettant ainsi de discriminer les individus sensibles des résistants (Ingles et al, 1996 ; Ma et al, 2003). Cette méthode est souvent utilisée en première intention en attendant le développement d'une méthode de biologie moléculaire spécifique du marqueur génétique identifié, plus adaptée à des monitorings à plus large échelle.

- ***Les méthodes de séquençage à haut débit***

Les méthodes de séquençage à haut débit, également appelées séquençage de nouvelle génération, regroupent un ensemble de techniques dont le point commun est le séquençage rapide de millions, voire de milliards de séquences (Hu et al, 2021). Les termes séquenceurs de seconde et troisième génération sont également employés pour décrire l'ensemble des techniques regroupées sous le terme de séquençage à haut débit ("next-generation sequencing") (Hu et al, 2021). La distinction entre ces deux applications réside dans la technique de séquençage ainsi que la longueur des séquences obtenues : la deuxième génération concerne les plateformes qui réalisent le séquençage de fragments de quelques centaines de paires de bases. La troisième génération concerne les plateformes qui séquencent des molécules d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases (Glenn, 2011).

Les capacités de séquençage offertes par les approches à haut débit permettent le multiplexage de plusieurs échantillons. Ceci est possible grâce à l'identification de chaque échantillon par une séquence d'oligonucléotides spécifique. Cette dernière a le rôle de « code barre génétique » unique (ou index), permettant ainsi l'identification *a posteriori* de chacun des échantillons (Hu et al, 2021). L'augmentation des capacités de séquençage offertes par les développements technologiques a conduit à une diminution drastique des coûts de séquençage (Figure 17).

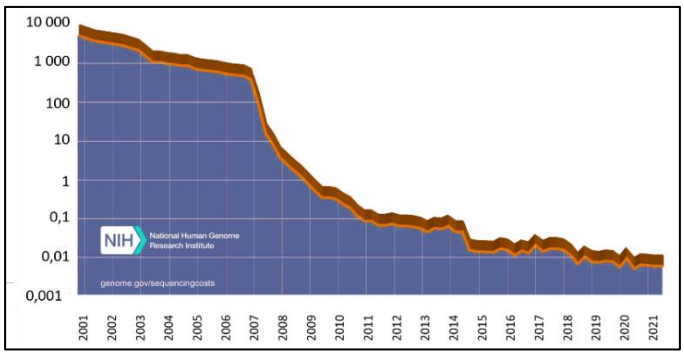


Figure 17 : Evolution du coût en dollars du séquençage d'une mégabase depuis 2001. (Figure adaptée de "National Human Genome Research Institut" ou NHGRI, consulté le 31/10/2024).

La quantité massive de données générée par ces technologies nécessite d'avoir recours à des traitements informatiques complexes afin de corriger, d'assembler et d'analyser les séquences obtenues. Elle est à l'origine de nouvelles problématiques comme le transfert et le stockage des données. Dans les paragraphes suivants, je présenterai succinctement le principe des principales technologies des séquençages dites à haut débit qui sont utilisées dans le cadre de l'étude des résistances aux PPP. Le séquençage à haut débit nécessitant

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

l'utilisation d'un vocabulaire spécifique, les définitions des principaux termes sont présentées dans l'Encadré 5 afin de faciliter la lecture des paragraphes suivants.

Encadré 5 : définitions des termes couramment utilisés pour les techniques de séquençage à haut débit

Librairie (ou banque ou bibliothèque) : correspond à l'ensemble des fragments d'ADN à séquencer. Il existe deux approches pour créer une librairie selon que l'objectif du séquençage soit de séquencer l'ensemble d'un génome ou des régions d'intérêt. Pour le séquençage du génome, les fragments d'ADN peuvent être obtenus par sonication ou par digestion enzymatique. Pour le séquençage de régions d'intérêt ou ciblées un enrichissement est réalisé soit par capture à l'aide de séquences complémentaires aux séquences d'intérêt ou soit par amplification à l'aide d'une PCR.

Read : succession de bases lues par un séquenceur dans chaque groupe de séquences (cluster), ou puits, selon la technologie utilisée. Un séquenceur génère autant de "reads" qu'il y a de clusters ou puits fonctionnels. Chaque "read" pourra être aligné à une séquence ou génome de référence. Le terme français équivalent est « lecture », même si dans la littérature spécialisée le terme "read" lui sera préféré.

Profondeur de séquençage : pour une base donnée, la profondeur de séquençage correspond au nombre de fois où cette base est séquencée. La profondeur de séquençage est fonction du nombre de "reads" à chaque position. Une profondeur minimale à atteindre est généralement fixée comme un seuil de qualité pour valider le résultat sur une base nucléotidique donnée.

Taux de couverture ou recouvrement : représente la longueur séquencée par rapport à la taille de la séquence ou du génome de référence.

Run : correspond à l'ensemble des échantillons séquencés en même temps dans un séquenceur**.**

Code-barre, index : c'est une séquence courte et unique ajoutée à chaque fragment d'ADN qui est utilisée pour pouvoir regrouper, puis séquencer les échantillons dans un même run. Cette courte séquence joue le rôle d'une étiquette ou d'un identifiant. A l'issue du séquençage cette étiquette permet de réattribuer les données obtenues à l'échantillon d'origine.

Pipeline : définit une suite des analyses bio-informatiques des données générées par le séquençage à haut débit. Cette analyse nécessite le recours à un ensemble d'outils de bio-informatique complémentaires. Cela comprend notamment des outils pour l'alignement des séquences, la détection et l'annotation des variants. L'ensemble des analyses séquentielles réalisées à partir des différents outils bio-informatiques constitue un pipeline d'analyse.

- ***Le pyroséquençage***

Cette technique est basée sur le principe du séquençage par synthèse d'ADN. Elle repose sur une cascade de réactions qui ont lieu à chaque incorporation de nucléotide et qui met en jeux quatre enzymes différentes : une ADN polymérase, une ATP sulfurylase, une

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

luciférase et une apyrase (Ahmadian et al, 2006). Au préalable d'un cycle de pyroséquençage, l'ADN à séquencer est dénaturé et ligué à des billes qui sont individuellement réparties dans des puits d'une plaque. La matrice d'ADN à séquencer est donc immobile et des solutions de désoxyribonucléotide-triphosphates dATP, dTTp, dGTP et dCTP sont ajoutées et retirées l'une après l'autre. De la lumière est produite seulement lorsque la solution de nucléotides complémente la première base non appariée de la matrice à séquencer. L'ajout d'un nucléotide par la polymérase à une matrice relâche un pyrophosphate (PPi) qui sera utilisé par l'enzyme ATP sulfurylase pour transformer l'adénosine phosphosulfate en ATP. Cet ATP est ensuite utilisé par l'enzyme luciférase pour oxyder la luciférine (Figure 18). C'est au cours de cette réaction qu'il y a émission de lumière. L'intensité du signal lumineux mesuré est proportionnelle au nombre de bases ajoutées au fragment. Les nucléotides qui n'ont pas été incorporés dans la chaîne nucléotidique sont dégradés par l'enzyme apyrase ou éliminés par lavage avant l'ajout d'une nouvelle solution (Ahmadian et al, 2006 ; Fakruddin et al, 2013).

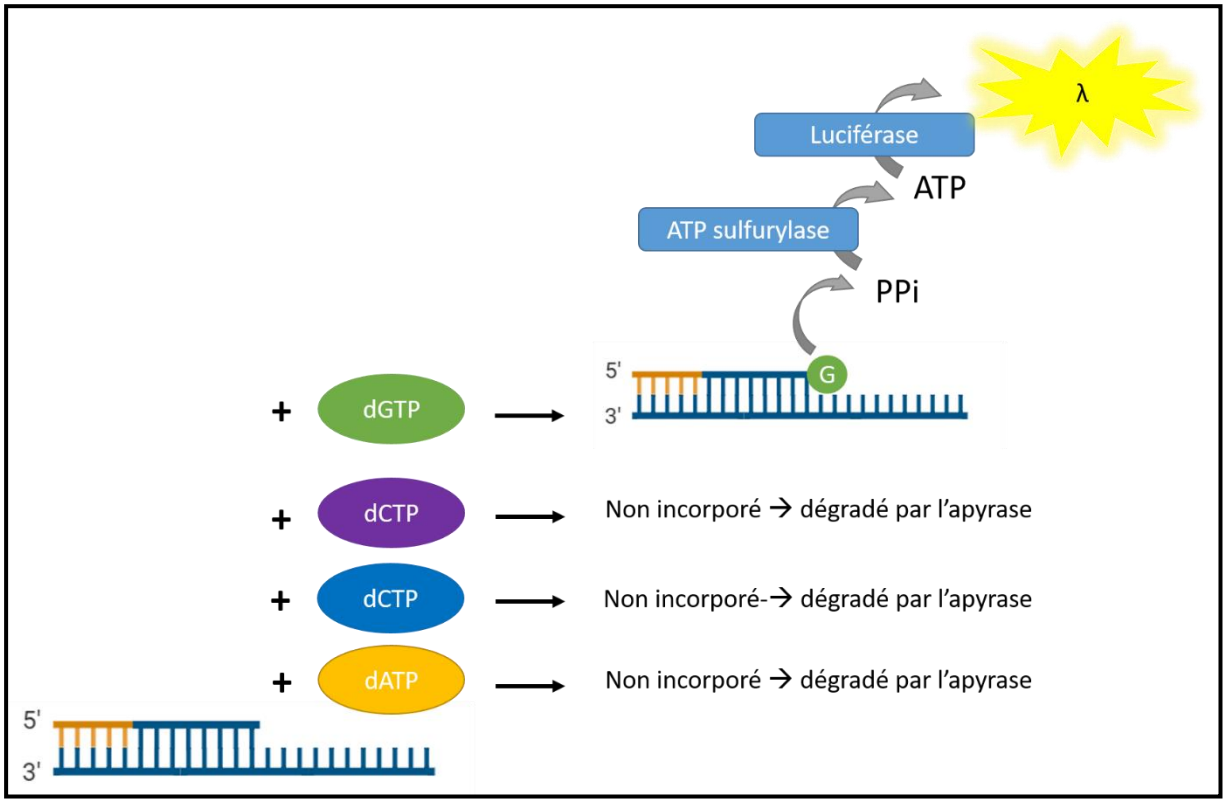


Figure 18 : Représentation de la réaction lors d'un pyroséquençage. L'ajout des différents dNTPS se fait de façon séquentielle. Lorsque le dNTP est complémentaire de la première base non appareillée du brin à séquencer, un pyrophosphate (PPi) est relâché et une cascade de réaction aboutit à l'émission d'un signal lumineux qui permet ainsi de déterminer la base présente.

Cette technologie, qui repose sur la PCR en émulsion (en gouttelettes), le séquençage par synthèse, la technologie des plaques en fibre optique picotitrée et des techniques informatiques pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des données de séquençage a été le point de départ de la première technique de séquençage à haut débit (Margulies et al, 2005).

Le pyroséquençage ne permet de séquencer que des fragments de quelques centaines de paires de bases. C'est une technique qui reste intéressante pour la quantification

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

de polymorphismes sur de courts fragments. En effet, lorsqu'il y a un mélange de nucléotides à une même position, la taille des pics sur le pyrogramme permet de déterminer la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides. Cette technique est donc adaptée pour détecter et quantifier des variants dans une population (Lamoril *et al.*, 2008). Elle a par exemple été utilisée pour rechercher et quantifier, dans des populations de spores de *B. cinerea,* cinq substitutions affectant la sous unité B du succinate déshydrogénase (SDH) connues pour être impliquées dans une perte de sensibilité aux inhibiteurs de succinate déshydrogénase (SDHI) (Gobeil-Richard et al, 2016).

- ***Séquençage par synthèse avec la technologie Illumina™***

La technologie Illumina™, commercialisée pour la première fois en 2006, s'appuie sur différentes techniques dont la synthèse en pont de fragments d'ADN, l'utilisation d'une "flowcell", qui est une lame de verre recouverte de deux sortes de séquences d'oligonucléotides et le séquençage par synthèse (Voelkerding et al, 2009). Pour réaliser le séquençage, les molécules d'ADN à séquencer sont, au préalable, fragmentées en des longueurs de 100 à 500 pb. Elles sont ensuite liées à leurs extrémités à des séquences composées de trois parties : l'une permettant la liaison aux fragments d'ADN, une seconde partie qui sert de code-barre et une dernière qui est complémentaire à l'une des deux séquences d'oligonucléotides présentes sur la "flowcell". Les fragments d'ADN sont amplifiés en PCR grâce aux oligonucléotides qui servent de support pour initier la synthèse du brin complémentaire. Les fragments originaux d'ADN sont ensuite dénaturés puis éliminés, le brin restant se replie et s'hybride au second type d'oligonucléotides présent sur la plaque et forme un pont. La synthèse du brin complémentaire permet la formation d'un pont double brin. Le pont est dénaturé et un brin linéaire sens et un brin linéaire antisens identiques au brin d'origine restent fixés sur la lame de verre. Ils servent de nouveau de matrice pour l'amplification et il se crée ainsi des "clusters" d'amplification sur la "flowcell" (*i.e.* des groupes de séquences autour de la séquence initiale). Avant l'étape de séquençage, les brins complémentaires au fragment d'origine sont éliminés puis le séquençage par synthèse est réalisé à l'aide de nucléotides marqués avec une sonde fluorescente spécifique de chacun des dNTPs. Les clusters sont excités à une longueur d'onde donnée entrainant ainsi l'émission d'un signal lumineux dont la longueur d'onde dépendra du nucléotide incorporé. A l'issu de la réaction, les barre-codes permettent de réattribuer les séquences obtenues aux échantillons d'origine et l'analyse bio-informatique permet l'alignement des séquences à des séquences de référence (Figure 19). Cette technique a l'avantage d'être rapide et de permettre d'obtenir des séquençages d'une très bonne exactitude. Cependant, les séquences obtenues sont assez courtes du fait de la fragmentation de l'ADN et complexifie donc les analyses bio-informatiques d'assemblages.

La technologie illumina™ a été utilisée pour la première fois dans le cadre de la détection de résistance aux PPP pour rechercher une mutation impliquée dans la résistance aux fongicides QoI dans un mélange artificiel d'ADN de souches de *Z. tritici*, l'agent de la septoriose du blé (Pieczul et Wąsowska, 2017). Elle a été ensuite appliquée en vue d'un monitoring à large échelle pour détecter et quantifier des allèles de résistances impliqués dans la résistance de cible à la phosphine chez une cinquantaine de populations d'une vingtaine

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

d'individus de capucin des grains, *Rhyzopertha dominica* (Schlipalius et al, 2019). Cette technique a également été appliquée avec succès chez des adventices pour quantifier plusieurs mutations affectant la protéine cible des herbicides inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS) dans des populations de séneçon commun (*Senecio vulgaris*) et d'ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*) (Delye et al., 2020). En outre de ces applications populationnelles pour identifier des polymorphismes nucléotidiques ("*single nucleotide polymorphism"* = SNP) marqueurs de résistance à des PPP, la technique illumina™ a été appliquée pour des approches transcriptomiques en vue par exemple d'identifier des gènes surexprimés et potentiellement impliqués dans la tolérance à un PPP (Wei et al, 2019 ; Zheng et al, 2022).

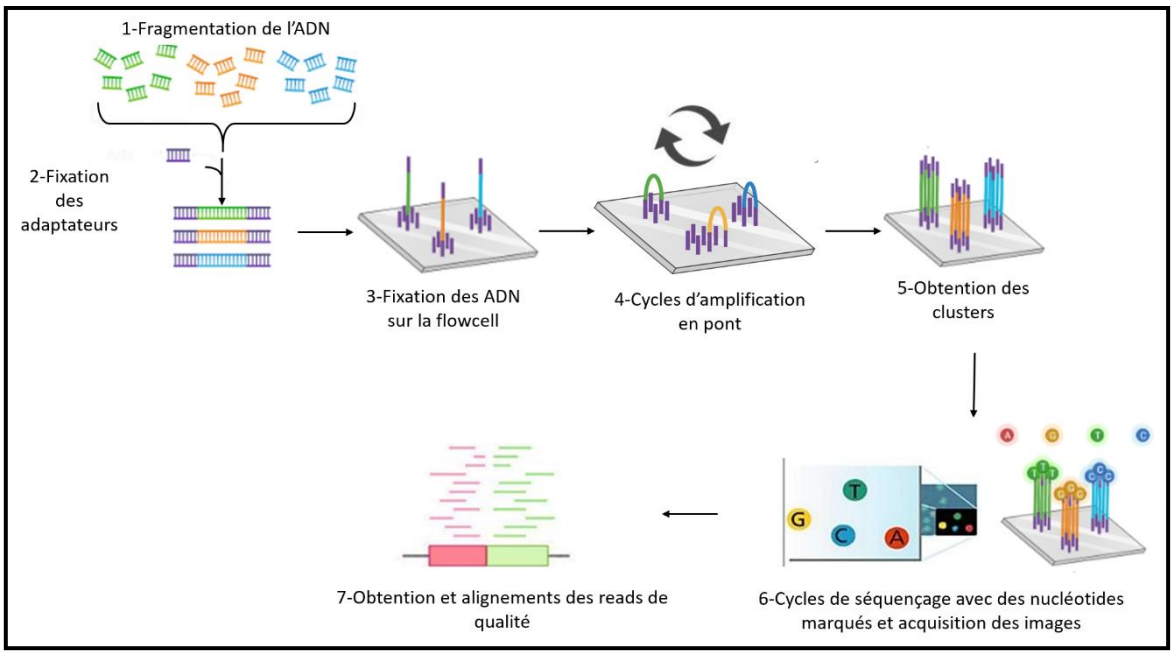


Figure 19 : Principales étapes du séquençage avec la technologie Illumina™. Après fragmentation des molécules d'ADN (1), les adaptateurs (en violet) sont ajoutés aux séquences d'ADN (2) afin de se fixer sur les oligonucléotides de la flowcell (3). Les cycles d'amplification en pont (4) permettent l'obtention de groupes (clusters) de séquences synthétisées autour de la séquence initiale (5). Lors de la réaction de séquençage, une polymérase synthétise des brins complémentaires aux brins fixés sur la flowcell en incorporant des nucléotides qui émettent un signal lumineux dont la longueur d'onde est spécifique du nucléotide (6). Une étape d'imagerie permet d'identifier le nucléotide incorporé à chaque cycle sur l'ensemble de la flowcell. La plateforme de séquençage réalise une première analyse qui permet l'obtention des reads (séquences) ayant passé les critères minimaux de qualité qui seront utilisés pour les analyses bio-informatiques adaptées à l'objectif du séquençage (7). (Figure réalisée à l'aide de BioRender - https://app.biorender.com/).

- ***Séquençage par synthèse avec la technologie Ion Torrent***

Cette méthode de séquençage utilise une stratégie de séquençage par synthèse avec une détection qui repose sur la libération d'ions hydrogènes responsables d'une variation de pH et non suite à la cascade de réaction liée à la libération d'un pyrophosphate (Merriman et Rothberg, 2012). Comme pour le séquençage avec la technique Illumina™, après fragmentation de l'ADN, des adaptateurs sont ajoutés aux séquences. L'amplification des

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

fragments est réalisée à l'aide d'une PCR en émulsion (dans des gouttelettes d'huile), avec des adaptateurs couplés à la biotine. Cette biotine permet la capture des fragments grâce à des billes liées à la streptavidine. Les billes sont ensuite réparties individuellement dans les puits d'une puce semi-conductrice où a lieu la réaction de séquençage. Les nucléotides complémentaires sont incorporés par l'ADN polymérase. Lorsqu'un dNTP est incorporé dans un brin d'ADN, un ion hydrogène est libéré. La libération de l'ion hydrogène entraîne des changements dans le pH de chacune des solutions des puits. Ce changement de pH est converti en changement de tension spécifique de chacun des nucléotides (Figure 20). Cette technique requiert peu d'échantillon de départ mais elle a l'inconvénient d'avoir des taux d'erreur plus élevés pour certaines régions spécifiques (en particulier pour les zones avec des répétitions de courtes séquences) (Shetty et al, 2019).

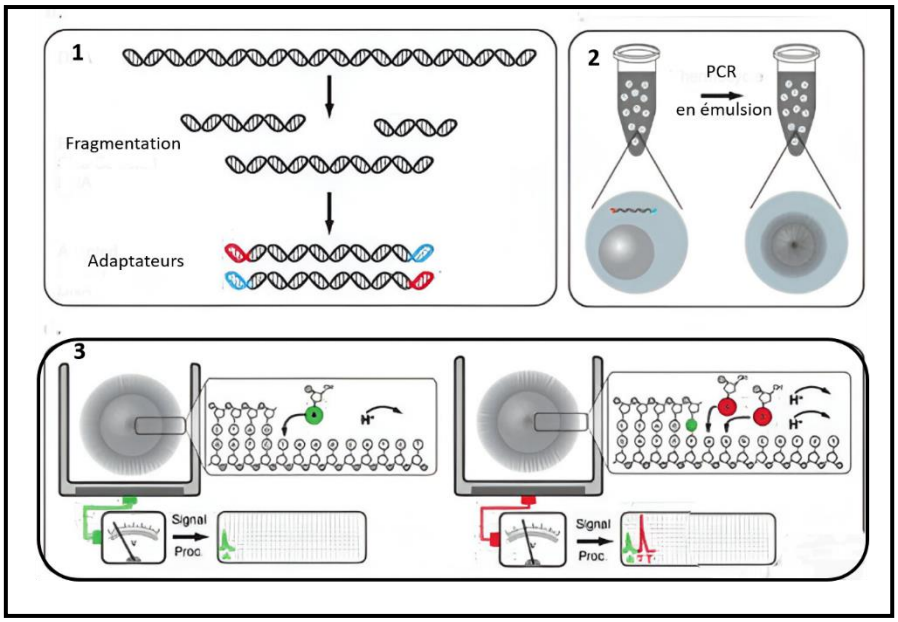


Figure 20 : Principales étapes du séquençage avec la technologie Ion Torrent : Fragmentation des molécules d'ADN et l'ajout des adaptateurs (1) ; réalisation d'une PCR en émulsion avec des amorces couplées à la biotine et capture des fragments amplifiés grâce à des billes liées à la streptavidine pour l'enrichissement (2). Réaction de séquençage dans les puits de la puce semi-conductrice qui permet la détection d'un changement de pH qui sera spécifique du nucléotide incorporé (3) (Figure adaptée de Golan et Medvedev, 2013).

Cette approche a été appliquée pour quantifier, chez *P. viticola*, différents inserts ou mutations, présents dans le gène du cytochrome *b*, impliqués dans la résistance aux fongicides inhibiteurs de la respiration cellulaire (Cherrad et al, 2023). La détection des divers variants a été validée avec l'approche Ion Torrent sous la condition que ces variants soient à une fréquence supérieure à 5%. Elle a également été appliquée afin d'identifier des transcrits différentiellement exprimés en présence ou en absence de l'application d'un PPP (Cui et al, 2017).

- ***Le séquençage Nanopore***

La technique de séquençage Nanopore a été publiée pour la première fois en 1996 (Kasianowicz et al). Cette approche fait partie des techniques de séquençage de troisième

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

génération qui permet le séquençage individuel, sans au préalable d'étape d'amplification (ou enrichissement), d'une longue molécule (plusieurs dizaines de milliers de bases) d'ADN ou d'ARN (cette dernière n'ayant plus besoin d'être rétrotranscrite en ADN complémentaire) (Hu et al, 2021). Le principe de cette technique repose sur le séquençage d'ADN ou d'ARN à travers un nanopore ancré dans une membrane qui est traversée par un courant. Le nanopore ne peut contenir qu'un unique brin d'oligonucléotides. Le séquençage est basé sur la détection d'un courant différentiel lors du passage de la molécule unique à travers le nanopore. En effet, le passage du brin d'oligonucléotides entraine une variation de courant qui est dépendant de l'encombrement stérique du composé qui le traverse. Cela permet ainsi d'identifier les différents nucléotides de la séquence du brin d'ADN sur une grande longueur (jusqu'à plusieurs Mb) quelle que soit sa composition. La présence de méthylation est également directement détectée par cette technique.

Le principal séquenceur reposant sur cette technologie est le MinION (d'Oxford Nanopore Technologies). C'est un dispositif « miniature » à peine plus encombrant qu'une clé USB et dont la commercialisation a commencé en 2014 (Mikheyev et Tin, 2014). Le séquençage est réalisé grâce à une "flowcell" dans laquelle sont introduits les réactifs et les librairies à séquencer. Cette "flowcell" comprend une membrane synthétique en polymère avec des nanopores posés sur un circuit intégré. Une enzyme sépare les brins d'ADN et fait passer l'un des deux brins dans le nanopore où les bases introduites sont détectées et identifiées une à une *via* la variation du courant électrique qu'elles induisent (Figure 21).

Le séquenceur MinION a l'avantage d'être peu coûteux, par comparaison avec les autres séquenceurs, et facilite les analyses d'assemblage grâce à l'obtention rapide de très longues séquences. Cependant, la technique de séquençage par nanopores présente des taux d'erreur relativement élevés (Wang et al., 2021b), qui s'expliquent par le fait que les bases ne sont pas lues une à une. La dimension des nanopores est telle que la longueur de l'ADN à l'intérieur du pore correspond à cinq ou six bases. Le signal détecté correspond donc à celui d'une série de bases et non à une seule d'entre elles. Le processus de lecture de signal nécessite de comparer informatiquement le courant observé à des courants de référence établis pour tous les hexamères envisageables (Jordan et al, 2017). Le taux d'erreur est donc variable selon la composition de la séquence et concernent plus particulièrement les régions homopolymériques ou contenant de courtes répétitions de bases (Delahaye et Nicolas, 2021). Néanmoins l'utilisation d'identificateurs moléculaires uniques (UMI pour "*Unique Molecular Identifers"*) (Kivioja et al, 2011) et le développement continu de nouveaux pipelines d'analyse et des "flowcell" tendent à diminuer progressivement ce taux d'erreur et à accroître ainsi la précision du séquençage.

Cette approche a été appliquée dans le cadre de l'étude des résistances chez *P. teres* pour détecter des mutations affectant le gène *Cyp51* et impliquées dans une baisse de sensibilité aux triazoles. Les auteurs présentent un pipeline d'analyse avec l'utilisation d'UMI qui permet de détecter à la fois les différentes formes de *P. teres* présentes et le statut de résistance vis-à-vis des triazoles (Zulak et al, 2024). Cependant, malgré l'utilisation d'UMI, des biais subsistent, car les proportions des différents haplotypes quantifiées par le séquençage ne sont pas toujours totalement en adéquation avec les proportions attendues du mélange préparé artificiellement.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

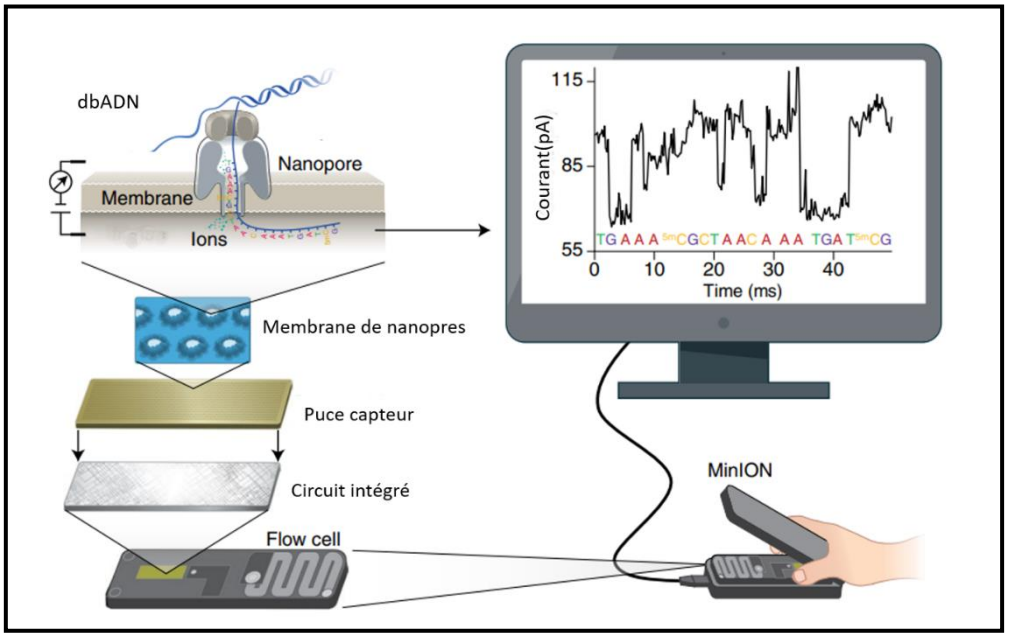


Figure 21 : Principe du séquençage par nanopore avec un MinION : la flowcell du MinION contient un total de 2 048 nanopores utilisés pour séquencer directement de l'ADN (ou de l'ARN). Ces pores sont insérés dans une membrane résistante à l'électricité et reliés à une puce capteur. Sous le contrôle d'une protéine motrice, une molécule d'ADN double brin (ADNdb) est d'abord déroulée, puis l'ADN simple brin chargé négativement est acheminé dans le nanopore, sous l'effet de la tension. Au fur et à mesure que les nucléotides traversent le nanopore, une variation du courant caractéristique du type de nucléotide présent est mesurée (Figure adaptée de Wang et al, 2021b).

Ce chapitre, bien que non exhaustif, visait à présenter la diversité des approches et des outils disponibles en laboratoire pour étudier les résistances aux PPP. Les tests biologiques qui sont les approches les plus anciennes, restent des méthodes incontournables pour évaluer la sensibilité d'un bioagresseur à une substance active (ou PPP) et identifier l'évolution d'une résistance. Les approches moléculaires ont apporté de nouveaux outils de diagnostic des résistances et ont contribué à l'amélioration de la surveillance des résistances. Ces outils, mis en œuvre en complémentarité des tests biologiques, permettent d'acquérir des connaissances sur le mécanisme de résistance et ses bases génétiques. Ces connaissances offrent des informations essentielles pour mieux appréhender le risque d'évolution d'une résistance et mettre en œuvre des mesures de gestion adaptées. Les travaux présentés dans les prochaines sections du manuscrit visent à illustrer sur des cas concrets les apports des approches de biologie moléculaire dans la surveillance et la caractérisation des résistances aux PPP. Ils permettront également de présenter les opportunités offertes par les méthodes de séquençage à haut débit.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

PRESENTATION DES TRAVAUX

1. Quelles contributions apportent les outils de biologie moléculaire à la détection et au suivi des résistances ?

Les publications présentées dans ce chapitre illustrent l'intérêt de l'utilisation des approches de biologie moléculaire en complément des approches biologiques, qui peuvent être délicates à mettre en œuvre pour certaines espèces phytopathogènes. Ces travaux ont en commun de porter sur deux agents phytopathogènes majeurs pour leur filière respective et considérés comme des bioagresseurs à risque important d'évolution des résistances selon le FRAC ("Fungicide Resistance Action Committee"). En effet, du fait de leur cycle biologique, qui comprend de très nombreux cycles de reproduction asexuée au cours de la période végétative, ces deux agents peuvent être particulièrement difficiles à contrôler. Ils sont généralement soumis à une forte pression phytosanitaire. De plus, le caractère pérenne de ces cultures accroit le risque d'évolution de résistances puisque les mêmes traitements peuvent être répétés année après année sur les mêmes parcelles, augmentant ainsi les probabilités de sélectionner des individus résistants.

Le premier exemple est celui du champignon *V. inaequalis*, responsable de la tavelure du pommier. Chez cette espèce, la réalisation de tests biologiques est complexifiée par le faible taux de germination des spores issues du terrain (10 à 30%). Ceci implique de multiplier les isolements pour obtenir un nombre des souches monospores représentatif de la population pour les tests en croissance mycélienne. Pour les tests en germination, l'interprétation des résultats peut être laborieuse, voire impossible, du fait de cette faible capacité germinative observée même en l'absence de traitement fongicide. Le deuxième exemple est celui du pseudochampignon *P. viticola*, agent du mildiou de la vigne. Pour ce biotrophe obligatoire, il est nécessaire de disposer de feuilles de vignes prélevées à un stade physiologique adapté et maintenues en survie au laboratoire. Il faut donc être en mesure produire le matériel végétal en quantité et qualité adaptées à la réalisation des tests, ce qui implique de ne pouvoir réaliser les études sur cette espèce qu'à une certaine période de l'année (juin à octobre). En outre, ces analyses nécessitent une étape de repiquage au laboratoire des sporulations issues du terrain afin d'obtenir un inoculum suffisant aux tests et adapté au laboratoire. Les approches de biologie moléculaire présentées, dans ces travaux, ont été en partie réalisées à partir des lésions foliaires en provenance du terrain. Cela permet de limiter les biais que peuvent induire les étapes de repiquage ou d'isolement au laboratoire, et de représenter de manière plus fidèle la composition des populations au champ.

La lutte antifongique contre ces deux agents phytopathogènes repose, en agriculture conventionnelle, entre autres, sur l'application de substances actives de synthèse dont des inhibiteurs du complexe III de la chaîne respiratoire. Ce complexe, nommé également coenzyme Q-cytochrome *c* oxydoréductase ou cytochrome *bc1*, assure le transfert des électrons du coenzyme Q au cytochrome *c* et la génération d'un gradient de protons dans la chaine respiratoire (Figure 22). Il est composé de trois sous-unités catalytiques : le

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

cytochrome *c1*, la protéine Rieske, contenant un cluster [2Fe-2S], et le cytochrome *b* (Hunte et al, 2000). Les fongicides inhibiteurs du complexe III de la chaîne respiratoire commercialisés se fixent au niveau de ce cytochrome *b* et bloquent ainsi le transfert d'électron du cytochrome *b* vers le cytochrome *c,* inhibant ainsi la chaîne respiratoire et *in fine* la production d'ATP (adénosine triphosphate), essentielle au fonctionnement cellulaire. Le cytochrome *b* est codé par un gène mitochondrial et est composé de 8 segments transmembranaires. Il possède deux sites catalytiques de part et d'autre de la membrane mitochondriale : le site catalytique Qo, situé du côté externe, correspondant au site d'oxydation de l'hydroquinone et le site de réduction de la quinone Qi, situé du côté interne (o et i correspondant à "outside" et "inside", respectivement) (Figure 22). Les fongicides inhibiteurs du complexe III commercialisés se différencient selon trois groupes en fonction de leur site de fixation sur le cytochrome *b* :

- les QiI pour "quinone inside inhibitor" pour les inhibiteurs du site Qi qui se fixent sur la face interne du cytochrome *b,*
- les QoI pour "quinone outside inhibitor" pour les inhibiteurs du site Qo qui se fixent sur la face externe,
- les QioSI (ou QioI) pour "quinone inside and outside inhibitor, stigmatellin binding mode" pour les inhibiteurs se fixant sur les deux faces.

Différentes substances actives appartenant à l'un de ces trois groupes sont commercialisées en France. Les premiers inhibiteurs du cytochrome *b* utilisés en France ont été des QoI appartenant majoritairement à la classe des strobilurines de synthèses (cf. classification unifiée R4P - https://doi.org/10.17605/OSF.IO/UBHR5). Ces fongicides à large spectre d'activité (ascomycètes, deutéromycètes, oomycètes), présentent l'avantage d'avoir une bonne persistance et de pouvoir être appliqués à faibles doses. Ils sont donc rapidement devenus des substances essentielles dans les programmes de lutte contre de nombreux agents phytopathogènes pour un large panel de cultures annuelles ou pérennes (grandes cultures, viticulture, arboriculture, cultures légumières et ornementales) (Bartlett et al, 2002).

Les fongicides inhibiteurs du cytochrome *b* au site Qi ont été commercialisés à partir de 2008 en France (cf. classification unifiée R4P[1]). Actuellement, trois substances actives ciblant le site Qi sont commercialisées. Deux d'entre elles, la cyazofamide et l'amisulbrom, ont une action fongicide uniquement sur les oomycètes (Hugues et Hasunuma, 2006 ; Mitani et al, 2001), tandis qu'une troisième, le fenpicoxamide a été commercialisée récemment (Owen et al, 2017) pour lutter contre diverses maladies des céréales (rouilles, oïdiums, fusarioses… en culture blé ou seigle).

[1] https://www.r4p-inra.fr/fr/classification-des-ppp/

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

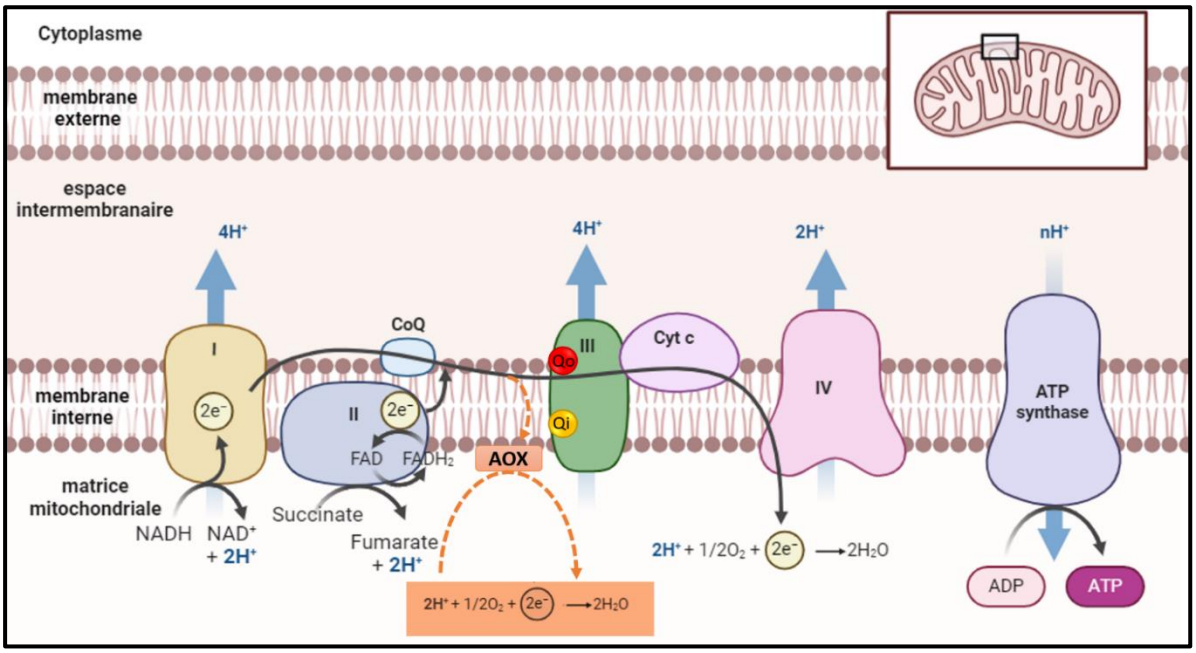


Figure 22 : Représentation de la chaine respiratoire avec les différents complexes. Au cours de la chaîne respiratoire, les électrons provenant des coenzymes NADH et FADH2 perdent de leur atome d'hydrogène qui se scinde en électrons et ions hydrogène. Les électrons récupérés seront transportés successivement via les quatre complexes protéiques de la chaîne mitochondriale dont le complexe III (coenzyme Q-cytochrome *c* oxydoréductase). Celui-ci est composé du cytochrome *b* avec les sites catalytiques Qi en jaune et Qo en rouge, le cytochrome *c1* et la protéine Rieske. Les ions hydrogène seront utilisés pour créer un gradient électrochimique de proton entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Le gradient électrochimique de protons créé par la chaîne respiratoire fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) à partir d'ADP (adénosine diphosphate) et d'un phosphate inorganique. En orange, la voie alternative, faisant intervenir une alternative oxydase (AOX), qui peut être induite lors de l'inhibition du cytochrome *b*. (Figure adaptée de 'Electron Transport Chain' - BioRender 2020, https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5edadc578a691400acf3c4ec-electron-transport-chain).

Enfin, une dernière substance inhibitrice du complexe III de la chaîne respiratoire, l'amétoctradine, est commercialisée en France depuis 2010 pour lutter contre divers mildious. Initialement classée parmi les inhibiteurs du site Qo avec une interaction différente des QoI déjà commercialisés, il était admis que l'amétoctradine se fixait au site Qo avec un mode de fixation proche de celui de la stigmatelline, un antibiotique (Meyer et al, 2018). Plusieurs études ont ensuite montré par diverses approches (spectroscopie, étude des résistances croisées, modélisation moléculaire, validation avec un modèle levure) que l'amétoctradine se liait bien au site Qo, avec un mode de fixation proche de celui de la stigmatelline, mais également au site Qi avec des sites de liaison distincts des autres QiI commercialisés (l'amisulbrom et la cyazofamide ; Fehr et al, 2016 ; Dreinert et al, 2018).

Des mécanismes de résistance ont évolué vis-à-vis de certains inhibiteurs du complexe III que cela soit chez *V. inaequalis* ou *P. viticola*. L'un de ces mécanismes repose sur une modification de la cible. Diverses mutations pouvant affecter différents loci ont été identifiées. Selon que ces mutations affectent des zones à proximité des sites Qo ou Qi, elles seront impliquées dans une perte de sensibilité vis-à-vis de substances actives appartenant à l'un des trois groupes inhibiteurs du complexe III (Tableau 3). Bien que ces mutations puissent

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

aisément être détectées avec des approches de biologie moléculaire, la diversité des loci concernés par les mutations nécessite, notamment pour *P. viticola*, de développer des outils capables de rechercher des polymorphismes sur l'ensemble du cytochrome *b*.

Le second type de mécanisme impliqué dans la perte de sensibilité aux inhibiteurs du complexe III repose sur la mise en place d'une respiration alternative. Ce mécanisme inductible met en œuvre une oxydase alternative (AOX) qui permet le contournement de l'inhibition du cytochrome *b* (Figure 22). Elle est considérée comme moins efficace en termes de production d'énergie (Wood et Hollomon, 2003). La contribution de ce mécanisme dans un phénotype résistant peut-être aisément déterminée à l'aide de tests biologiques en comparant la sensibilité en présence du fongicide seul avec une modalité comprenant l'ajout d'un inhibiteur de cette voie alternative. Sa détection par des techniques de biologie moléculaire, bien que possible, est plus lourde et ne permet pas de déterminer l'apport directe de la voie AOX dans la perte de sensibilité. D'autres mécanismes concernant les QoI ont été plus rarement décrits, comme l'intervention de transporteurs à efflux chez *P. tritici repentis* (Reimann et Deising, 2005), ainsi qu'une métabolisation spécifique du krésoxim-méthyl chez *V. inaequalis,* sans conséquence pour l'efficacité au champ (Jabs et al, 2001).

Types de mécanisme	Mutations	QoI	QiI		QiI
		Strobilurines	cyazofamide	amisulbrom	Amétoctradine
Modifcation de la cible	S34L	S	S	S	R
	F129L	r	S	S	S
	G143A	R	S	S	S
	L201S	S	R	r	S
	E203-DE-V204	S	R	r	S
	E203-VE-V204	S	R	r	S
Métabolique (surexpression oxydase alternative)	?	r/R	r/R	r/R	r/R

Tableau 3 : Mécanismes de résistance et mutations affectant le cytochrome *b* connues en 2024 chez *P. viticola* et *V. inaequalis* ainsi que leur impact sur la sensibilité aux différents fongicides inhibiteurs du complexe III commercialisés. En vert clair, les mutations identifiées uniquement chez *P. viticola*, en bleu celles présentes chez les deux espèces. Les « r » et « R » indiquent respectivement qu'une diminution de sensibilité faible et élevée vis-à-vis des substances actives concernées. Les « r/R » indiquent diminution de la sensibilité variable de faible à forte selon les souches. Les « S » indiquent que la mutation n'a pas d'impact sur le niveau de sensibilité vis-à-vis de la substance active. (Tableau réalisé avec les données issues Cherrad et al. (2018 et 2023), de la note technique commune maladies de la vigne (2025) et des données du Plan de Surveillance de la DGAL)

Il existe donc une diversité de substances actives antifongiques ciblant le cytochrome *b*, avec des modes de fixation distincts au niveau des différents sites actifs de la protéine ainsi que divers mécanismes de résistance (Tableau 3). Cette diversité rend d'autant plus complexe l'étude des résistances vis-à-vis de ces inhibiteurs (diversité des mutations pouvant affecter la protéine cible, résistance croisée à plusieurs substances ou spécifique d'une seule substance, présence de mécanisme lié et non lié à la cible). La combinaison des approches biologiques et de biologie moléculaire est donc essentielle pour assurer une détection, une surveillance et une compréhension les plus complètes possibles de ces phénomènes de résistance.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les publications présentées ci-après présentent des suivis pluriannuels d'évolution de résistances à des inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire par des approches phénotypiques couplées à des approches de biologie moléculaire.

Le premier article, publié dans le journal "Pest management Science" (Fontaine et al, 2009), présente un suivi spatio-temporel de la résistance aux QoI chez *V. inaequalis* dans la majeure partie des bassins de production de pommes en France. Ces travaux réalisés de 2004 à 2007 ont mis en évidence :

- une augmentation de l'occurrence de la mutation G143A dans les vergers des régions du sud et de l'est de la France ;
- une distorsion entre les résultats de génotypage et de phénotypage laissant suspecter l'existence probable d'un mécanisme de résistance autre que la respiration alternative ou que la résistance de cible liée à la mutation G143A.

Le second article, publié également dans le journal "Pest management Science" (Fontaine et al, 2019), présente un suivi spatio-temporel des résistances à l'amisulbrom (QiI) et à l'amétoctradine (QioI), chez *P. viticola* dans la majeure partie des bassins viticoles français. Ces travaux conduits de 2012 à 2017 ont permis de mettre en évidence :

- une augmentation de l'occurrence de la résistance liée à l'alternative oxydase dans les vignobles au cours des saisons végétatives et entre les années de suivi ;
- la première détection d'une résistance à l'amétoctradine liée à la modification de la cible, ainsi que l'identification du marqueur génétique associé à cette résistance et le développement de méthode de criblage par biologie moléculaire pour rechercher ce marqueur ;
- une distorsion entre les résultats de phénotypages et de génotypage concernant la résistance à l'amétoctradine, laissant suspecter une disparition des phénotypes mutants au cours des étapes de multiplication au laboratoire, en raison d'un coût de fitness potentiel lié à la substitution S34L ou d'une moins bonne « sensibilité » des tests biologiques lorsque les mutants sont à une très faible fréquence.

Dans ces deux études, les divergences entre les résultats obtenus par les phénotypages et les génotypages soulignent l'intérêt de mettre en œuvre différentes approches analytiques afin d'avoir une surveillance des mécanismes de résistance la plus exhaustive possible. En effet, la réalisation de tests biologiques nécessite l'adaptation au laboratoire du bioagresseur. Cette adaptation exerce un filtre génétique et peut conduire à l'élimination de certains génotypes. Enfin, pour les deux agents phytopathogènes, la présence simultanée d'allèle sauvage et muté du gène mitochondrial du cytochrome *b* dans les lésions individuellement échantillonnées laisse suspecter une possible co-infection d'une même lésion par deux souches ou l'infection par une unique souche dite hétéroplasmique, c'est-à-dire une souche où coexistent des génomes mitochondriaux différents.

Ces travaux ont donné lieu à des communications écrites et orales à destination des professionnels des filières concernées (Remuson et al, 2007 ; Fontaine et al, 2018). Ces données ont également été exploitées pour la rédaction des notes communes, rédigées par un comité d'experts de la DGAL, d'INRAE et de l'Anses, qui détaillent le statut des résistances

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

et proposent des recommandations de gestion. Concernant *P. viticola*, les suivis des résistances aux inhibiteurs du complexe III se poursuivent dans le cadre des plans de surveillance de la DGAL en combinant aux approches biologiques des approches de génotypage. Des travaux que j'ai encadrés lors d'un stage réalisé par une étudiante, assistante ingénieure (Lucile Gonnon), ont également été menés pour essayer d'identifier un éventuel coût biologique de la résistance à l'amétoctradine chez *P. viticola*.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1.1. Premier article : Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays

Research Article

Received: 13 February 2008 Revised: 3 June 2008 Accepted: 22 June 2008 Published online in Wiley Interscience: 30 September 2008

(www.interscience.com) DOI 10.1002/ps.1649

Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays

Séverine Fontaine,[a] Florent Remuson,[a] Laurence Fraissinet-Tachet,[b] Annie Micoud,[a] Roland Marmeisse[b] and Delphine Melayah[b]*

Abstract

BACKGROUND: Genetic resistance to QoI fungicides may account for recent failures to control *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter in French orchards. Two PCR-based assays were developed to detect the G143A point mutation in the fungal mitochondrial cytochrome b gene. The mutation is known to confer a high level of resistance to QoI fungicides. Occurrence of the G143A mutation in French field isolates collected from 2004 to 2007 was monitored.

RESULTS: The QoI-resistant cytochrome b allele was specifically detected either following the cleavage of the amplified marker by a restriction endonuclease (CAPS assay) or its amplification using an allele-specific PCR primer. Using either method, the G143A mutation was found in 42% of the 291 field samples originating from French orchards in which apple scab proved difficult to be controlled. Monitoring of the G143A mutation in orchards located in 15 French administrative regions indicated that the mutation was detected at least once in nine of the regions, and its presence ranged from 33% to 64% of the orchards analysed in 2004 and in 2007 respectively.

CONCLUSION: The PCR-based methods developed in this study efficiently reveal the presence of the G143A mutation in French *V. inaequalis* field populations.
© 2008 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: *Venturia inaequalis*; apple scab; QoI; fungicide resistance; allele-specific PCR; molecular diagnostics

1 INTRODUCTION

Apple scab, caused by the fungus *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, is characterised by brown to olive-coloured spots on apple tree leaves and fruits. This major disease in apple tree orchards is mainly controlled through fungicide treatments. Quinone outside inhibiting (QoI) fungicides are one of the latest families of chemicals that play an important role in plant protection against many phytopathogenic fungi including *V. inaequalis*. These molecules specifically inhibit cell respiration by binding at the ubiquinol oxidation centre (Qo site) of the mitochondrial cytochrome bc1 complex.[1,2]

Resistance to QoI fungicides has been detected in several fungal pathogens such as *Blumeria graminis* Speer[3] and *Mycosphaerella fijiensis* Morelet[4] or Oomycetes such as *Pseudoperonospora cubensis* (Burk. & Curt.) Rostosev.[5–7] QoI resistance in *V. inaequalis* was first reported in 1997 in European field and experimental trials.[8] In France, the commercial QoI fungicides used to control *V. inaequalis* correspond to strobilurins. Although strobilurins have been successfully used on apple trees to control scab since 1998, the first cases of QoI resistance that occurred in French commercial apple tree orchards were reported in 2002 (unpublished results from the Service Régional Rhône-Alpes de la Protection des Végétaux, France). Several mechanisms leading to QoI resistance have been reported in *V. inaequalis*. One known mode of resistance is the metabolisation of kresoxim-methyl, a commercial strobilurin molecule, by esterases and cytochrome P450 monooxygenases.[9] Under laboratory conditions, induction of the alternative respiration pathway has also been observed during conidia germination.[10] This latter phenomenon could possibly occur in apple tree orchards and contribute to resistance in the field.[8] Finally, the commonly found target-site mutation referred to as the G143A mutation, which accounts for a high level of resistance to QoI in many plant pathogens, has also been identified in QoI-resistant *V. inaequalis* isolates. This point mutation occurs in the mitochondrial cytochrome b (*Cyt b*) gene and results in a change of glycine to alanine at position 143 of the protein.[11] However, Steinfeld *et al.*[12] obtained an isolate of *V. inaequalis* that

* *Correspondence to: Delphine Melayah, Université de Lyon, Université Lyon 1, Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, Bâtiment André Lwoff, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. E-mail: delphine.melayah@univ-lyon1.fr*

a *DRAF-SRPV Rhône Alpes, Cité Administrative de la Part Dieu, Bât B, 165 rue Garibaldi, Lyon, F 69003, France*

b *Université de Lyon, Université Lyon 1, Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, Bâtiment André Lwoff, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

15264998, 2009, 1, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1649 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

presented a high level of resistance to QoI without the G143A mutation from an experimental orchard in Switzerland. As the alternative oxidase pathway was not found to be overexpressed in this isolate, additional mutations in genes encoding components of the cytochrome bc1 complex were suspected.

Monitoring of QoI resistance from field-collected infected material (leaves, apples) is of practical importance to evaluate the efficiency of these molecules and to reorient fungicide treatments in the corresponding orchards. Currently, detection of *V. inaequalis* QoI-resistant isolates relies on *in vitro* test systems based on spore germination on fungicide-amended media. As viability of *V. inaequalis* conidia recovered from commercial orchards treated with pesticides is usually low, alternative monitoring methods are needed. PCR-based detection is a valuable tool when the fungicide-resistant phenotype is clearly associated with a known point mutation. This is the case for the single nucleotide polymorphism that characterises the G143A mutation in the *Cyt b* gene of several fungal QoI-resistant pathogens including *V. inaequalis*.

The objectives of this study were to develop a rapid molecular test to detect the G143A mutation in field-collected apple scab lesions and to use this method to monitor this point mutation in apple tree orchards in France. Two methods based on the amplification of a portion of the *Cyt b* gene were developed. The first one requires the digestion of PCR products with a restriction enzyme that specifically cleaves the amplified fragment at the site of the mutation. The second one is an allele-specific PCR detection using an oligonucleotide primer that specifically binds to the mutant sequence.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal isolates

Two strains of *V. inaequalis* were isolated from infected apple tree leaves and maintained in pure culture on potato dextrose agar medium (Table 1). The QoI-sensitive single-spore isolate SFR2, collected in July 2002 originated from an orchard that had never been treated with fungicides. Single-spore isolate 160, collected in June 2003 from a commercial orchard in south France, displayed a high resistance factor (RF = 283) towards kresoxim-methyl (see Section 2.4). In addition to *V. inaequalis* isolates, strains of *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizopus* sp. and *Penicillium* sp. were used to test for the specificity of the PCR primers (Table 1).

A total of 317 field samples were collected from 2004 to 2007, and 291 were analysed (see supporting information in Table S1). They originated from commercial and experimental French orchards where strobilurin treatments were suspected to be ineffective to control the pathogen. Infected apple leaves collected from orchards that had never been treated with any fungicides were used as control QoI-sensitive field samples.

For each orchard, *V. inaequalis* spores were collected from 30–50 lesion-bearing leaves or fruits with a brush. Spore suspensions were adjusted in distilled water to 1×10^5 conidia mL^{-1}. For each orchard, 30 lesions on leaves (ca 0.6 × 0.6 cm) or fruits (ca 100 mg) were collected (1 lesion per leaf or fruit), pooled and stored at −20 °C until DNA extraction. In addition, individual leaf lesions were frozen separately. The latter samples were used as starting material to evaluate the detection thresholds of both PCR methods.

2.2 DNA extraction

Frozen mycelia as well as mixed and unique lesion samples were ground in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Fungal DNA or DNA from a plant–fungus mixture was extracted and purified using Nucleospin Plant DNA extraction kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's recommendations. DNA was resuspended in 100 µL of elution buffer and quantified using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer.

Table 1. Geographic origin and sampling year of the fungal isolates used in this study

Isolates	Sampling year	French administrative region (locality)	EC_{50}[a] (mg L^{-1})
Venturia inaequalis			
SFR2	2002	Rhône-Alpes (Saint Marcel d'Urfé)	0.06
160	2003	Midi-Pyrénées (Montauban)	8.5
Botrytis cinerea	2003	Rhône-Alpes (Saint Genis Laval)	nd[b]
Rhizopus sp.	2003	Rhône-Alpes (Saint Didier sous Riverie)	nd[b]
Penicillium sp.	2003	Rhône-Alpes (Saint Didier sous Riverie)	nd[b]

[a] EC_{50} refers to the concentration of kresoxim-methyl that leads to a 50% inhibition of the mycelia growth rate.
[b] nd = not determined.

2.3 PCR-based detection

2.3.1 *Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) assay*

The PCR primers PS1 and PR1 (Table 2) were designed using the published sequence of the *V. inaequalis Cyt b* gene (GenBank accession number AF004559).[13] They hybridise in exons 3 and 4 of the gene, respectively, and amplify a 488 bp fragment containing the region of interest, i.e. codon 143 site of the G143A mutation. This point mutation changes the sequence 5′-GGTGC-3′ into 5′-GCTGC-3′, which is specifically recognised by the restriction endonuclease *Fnu*4HI.

PCR amplifications were performed in a 25 µL volume containing 1 µL of DNA (1–10 ng), 0.5 µM of each primer, 200 µM of each dNTP, 0.5 mM magnesium chloride and 2 U of *Taq*-DNA polymerase in the appropriate buffer (Invitrogen). An initial denaturation step at 94 °C for 3 min was followed by 35 cycles that each included a denaturation at 94 °C for 30 s, a primer annealing step at 55 °C for 45 s and a polymerisation step at 72 °C for 50 s. Amplifications were terminated by a 5 min final extension at 72 °C. PCR products from the sensitive (SFR2) and resistant (160) isolates were directly sequenced using the BigDye3.1 Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) and analysed on an ABI3730XL capillary sequencer (Applied Biosystems) at Genoscreen Services (Lille, France). A quantity of 10 µL of the PCR products was digested overnight by 1.5 U of *Fnu*4HI (New England Biolabs) at 37 °C. Restriction fragments were separated on 2.5% agarose gels in 0.5 × TBE and stained with ethidium bromide. Gels were visualised using a UV transilluminator and photographed using the Gel Doc 2000 apparatus (BioRad).

2.3.2 *Allele-specific PCR (AS-PCR)*

Allele-specific PCR primers that would preferentially bind to the mutant sequence were designed. The backbone sequence of these primers corresponds to primer G143AMM0 for which the 3′ G nucleotide is complementary to the C residue specific to the

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 2. Primers used in this study. For the allele-specific primers G143AMM0 to G143AMM4, the introduced mismatch bases relative to the *Venturia inaequalis Cyt b* wild-type sequence are underlined

Name	Orientation	Sequence (5′ → 3′)	Nucleotide position[a]
PS1	Forward	GTTACAGCCTTCCTGGGTTAT	5025-5045
PR1	Reverse	AGGCCTCCCCACAGAAATTCG	5513-5495
G143AMM0	Reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGCAG	5457-5437
G143AMM1	Reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGCTG	5457-5437
G143AMM2	Reverse	GGTTTGTGATGACAGTTACAG	5457-5437
G143AMM3	Reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGTAG	5457-5437
G143AMM4	Reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGGAG	5457-5437
PS-exon7	Forward	GGTGTTATAGCTATGTTTGCAGCTA	10 394 – 10 418
PR-exon7	Reverse	CAAGAGGTACAATTCACAAAGTGAG	10 631-10 605

[a] Position as referred to the GeneBank accession AF004559.

mutant allele (Table 2). Enhanced allelic discrimination was tested by introducing an additional mismatch in the 3′ subterminal region of the primer, thus creating primers G143AMM1, G143AMM2, G143AMM3 and G143AMM4 (Table 2). These allele-specific primers were used in combination with primer PS1 and tested to amplify a 433 bp DNA fragment.

All AS-PCR reactions included, as an amplification control, a second set of primers, namely PS-exon7 and PR-exon7 (Table 2). This primer pair allows, from any *V. inaequalis Cyt b* alleles, the amplification of a 238 bp sequence located some 5 kb downstream of the G143 mutation. PCR amplifications were performed in a 25 µL volume containing 0.2 µM of allele-specific primers and 0.1 µM of control primers (PS-exon7 and PR-exon7). Other AS-PCR components included 1 µL of DNA (1 – 10 ng), 400 µM of each dNTP, 0.5 mM of magnesium chloride and 2 U of *Taq*-DNA polymerase in the appropriate buffer (Invitrogen). An initial denaturation at 94 °C for 3 min was followed by 30 cycles that each included denaturation at 94 °C for 30 s, a primer annealing step at 60 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 50 s. Amplifications were followed by a final extension of 3 min at 72 °C. PCR products were separated on 1% agarose gels in 0.5 × TBE and stained with ethidium bromide.

2.3.3 *Detection thresholds of PCR assays*

Total DNA extracted from leaves colonised by a QoI-sensitive fungal isolate was mixed at different ratios with DNA extracted from leaves contaminated by a G143A positive isolate. CAPS assay and AS-PCR were carried out as described above using 3 ng of mixed DNA samples as template.

2.4 Spore germination assay

The QoI fungicide used in bioassays was kresoxim-methyl (BASF). It was of technical-grade quality (97.8% purity). Stock solutions of kresoxim-methyl were prepared in ethanol, and varying volumes of these were added to water agar to achieve final concentrations that ranged from 1×10^{-3} to 3×10^{2} mg AI L^{-1} of medium. Randomly selected spore suspensions were also spread on kresoxim-methyl-containing medium amended with salicylhydroxamic acid (SHAM) at a final concentration of 30 mg L^{-1}.

A freshly prepared conidial suspension was spread on each of the different media at a density of about 230 conidia per 19.6 cm^2 Petri dish. Plates were incubated in the dark, at 20 – 22 °C, for 48 h. A total of 100 conidia were then scored as either germinated or not. For each fungicide concentration, the germination rate was calculated as the percentage germination on the fungicide-supplemented medium divided by the mean of percentage germination on the control, fungicide-free, medium. The 50% effective concentration (EC_{50}) was calculated using the regression curves obtained by graphically plotting the germination rates against the log-transformed value of the fungicide concentrations. The resistance factor (RF) corresponded to the EC_{50} value of the studied orchard divided by the EC_{50} value obtained from control orchards that had never been treated with strobilurins. For each analysis, the minimal inhibitory concentration (MIC) was determined.

3 RESULTS

3.1 PCR-based detection of the G143A mutation in *Venturia inaequalis*

3.1.1 *Cleaved Amplified polymorphic sequence (CAPS) assay*

The preliminary set of this experimental work consisted of controlling the primer specificity towards *V. inaequalis*. Primer pair PS1 – PR1 amplified a 488 bp fragment from DNA samples extracted from pure cultures of both QoI-sensitive (isolate SFR2) and resistant (isolate 160) *V. inaequalis* mycelia, as well as from DNA extracted from *V. inaequalis*-infected apple leaves and fruits collected in orchards. No amplification was obtained using DNA from non-infected apple tree leaves or other fungi such as *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. (data not shown).

Sequences of the PCR products from the sensitive and resistant isolates were identical to the published sequence of *V. inaequalis Cyt b* gene, except for a guanine to cytosine transversion in the sequence from the isolate 160 responsible for the typical G143A mutation conferring QoI resistance (Fig. 1). This mutation created an *Fnu*4HI (5′-GCTGC-3′) restriction site in the mutant sequence. Upon digestion with this endonuclease, two DNA fragments of 412 and 76 bp were obtained with the PCR fragment from the resistant isolate 160, whereas, as expected, the PCR product from the sensitive isolate SFR2 was not cleaved (Fig. 2), allowing CAPS analysis on composite samples. As a control for population analysis, DNA amplified from lesions collected in several control orchards that had never been treated with strobilurins could not be digested by *Fnu*4HI. On the other hand, DNA amplified from numerous samples collected in orchards in which strobilurin treatments failed to control apple scab were frequently partially digested by *Fnu*4HI (Fig. 2). Partial digestions probably resulted from the coamplification of sensitive and resistant *Cyt b* alleles, as the field-

 © 2008 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

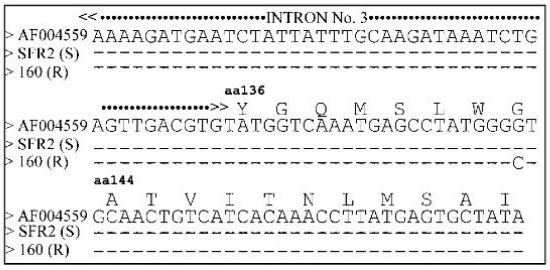


Figure 1. Partial alignment of the cytochrome b sequences from the QoI-sensitive (SFR2) and resistant (160) *Venturia inaequalis* isolates to the GeneBank AF004559 sequence. Note the G to C transversion at nucleotide position 5437 of the *Cyt b* gene, leading to the amino acid change glycine to alanine responsible for QoI resistance.

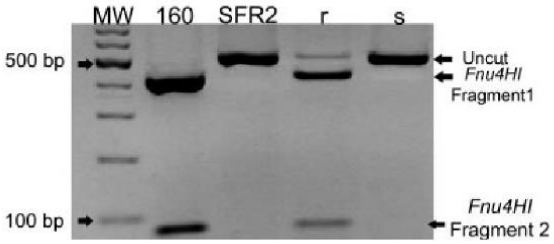


Figure 2. *Fnu*4HI digestion of the 488 bp PCR fragment of the cytochrome b gene generated by primer pair PS1–PR1 using DNA extracted from QoI-resistant *Venturia inaequalis* isolate 160 (lane 2), QoI-sensitive isolate SFR2 (lane 3) and apple scab lesions collected in an orchard where resistant isolates predominated (r; lane 4) or were absent (s; lane 5). MW, 1 kb DNA ladder (Fermentas).

collected samples are composite samples made up of 30 different apple scab lesions.

The sensitivity of the CAPS method was tested by establishing different ratios of DNA extracted from leaves infected with a QoI-resistant (R) isolate with DNA extracted from leaves infected with a QoI-sensitive (S) isolate. The QoI-resistant allele could not be detected after *Fnu*4HI digestion for R : S ratios equal to or below 1 : 9 (w : w) (Fig. 3).

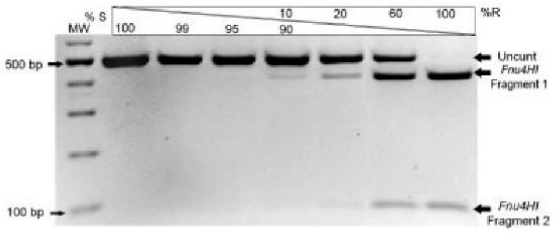


Figure 3. Sensitivity of the CAPS method. DNA extracted from individual lesions caused by QoI-resistant (R) and QoI-sensitive (S) isolates were mixed at different ratios (from 1 : 99 to 40 : 60, w : w) before amplification of a *Cyt b* 488 bp DNA fragment which was digested with *Fnu*4HI. The 100% sensitive and 100% resistant corresponded to DNA extracted from mycelium of the QoI-sensitive isolate SFR2 and the QoI-resistant isolate 160, respectively. MW, 1 kb DNA ladder (Fermentas).

3.1.2 Allele-specific PCR (AS-PCR)

In order to improve the sensitivity of the PCR detection method, the authors developed an AS-PCR method. For this purpose, primer PS1, which should hybridise to any *V. inaequalis Cyt b* allele, was combined with a second primer designed to bind specifically to the sequence of the mutant allele conferring QoI resistance. The first AS primer designed, G143AMM0 (Table 2), differed from the wild-type sequence by having a G at its 3′ end, which corresponds to the G143A mutation. Using the primer pair PS1-G143AMM0, both wild-type and mutant alleles were equally amplified at either annealing temperature tested (data not shown). Therefore, four additional AS primers that differed from G143AMM0 by a second mismatch in position −1, −2 or −3 relative to the 3′ end of the primer were designed (Table 2). In combination with primer PS1, these four primers amplified a 433 bp fragment from both sensitive and resistant isolates at an annealing temperature of 55 °C. Allelic discrimination, i.e. specific amplification of the QoI-resistant allele, was achieved using any of the four primer pairs at the annealing temperature of 60 °C (Fig. 4). Primer G143AMM1 was then chosen as the AS primer for all subsequent experiments. To make sure that the absence of amplification of a 433 bp fragment did not result from PCR inhibition, all AS-PCR reactions included a second primer pair (PS-exon7 and PR-exon7), which allowed the amplification of a 238 bp fragment from all *Cyt b* alleles (Fig. 4).

The sensitivity of the AS-PCR protocol was evaluated by amplifying *Cyt b* mutant allele DNA molecules when mixed at different ratios with wild-type allele molecules. The mutant allele was amplified at the lowest ratio tested, 1% of DNA extracted from leaves infected with a QoI-resistant isolate to 99% of DNA extracted from leaves infected with a QoI-sensitive isolate (Fig. 5), thus showing a higher sensitivity of the AS-PCR detection method compared with CAPS analysis.

3.2 Spore germination assay versus molecular detection methods

Among the 317 samples collected from orchards from 2004 to 2007, only 284 samples were analysed for QoI resistance by both the bioassay and the PCR approaches. The 33 remaining samples were only tested by PCR approaches. Here, 74% of spore germination assays could not be interpreted owing to an excessively low quantity of spores collected from the leaves or

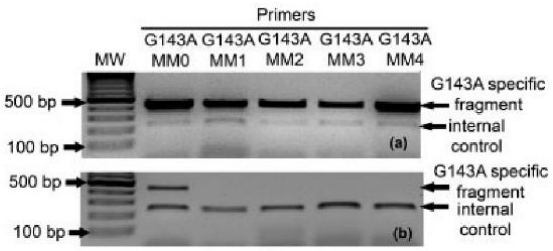


Figure 4. Allele-specific PCR amplification of the G143A *Cyt b* allele. DNA extracted from *Venturia inaequalis* QoI-resistant (a) and sensitive (b) isolates were used as templates for the PCR amplifications which used primer PS1 in combination with one of the five allele-specific primers G143AMM0 to G143AMM4 that specifically bind to the mutant cytochrome b sequence. As a positive amplification control, primers PS-exon7 and PR-exon7, which amplify a 238 bp fragment, were included in all PCR reactions. Primer G143AMM0, which differs from the wild-type sequence by one nucleotide at its 3′ end, was not specific at an annealing temperature of 60 °C. MW, 1 kb DNA ladder (Fermentas).

15264998, 2009, 1, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1649 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

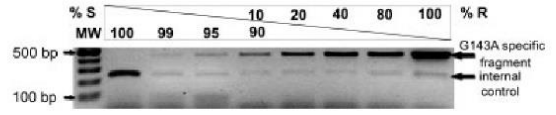


Figure 5. Sensitivity of the allele-specific PCR method. DNA extracted from QoI-resistant (R) and QoI-sensitive (S) isolates were mixed at different ratios (from 1 : 99 to 80 : 20, w : w) before coamplification at 60 °C by primer pair PS1–G143AMM1 of a G143A-specific 433 bp fragment and by primer pair PS-exon7 and PR-exon7 of a control 238 bp fragment. The 100% sensitive and 100% resistant corresponded to DNA extracted from mycelium of the QoI-sensitive isolate SFR2 and the QoI-resistant isolate 160, respectively. MW, 1 kb DNA ladder (Fermentas).

to a very low germination rate on QoI-free medium, although an unusually low threshold value of 10% was used. In contrast, only in 8% of these samples did PCR amplification of the *Cyt b* fragment fail. This could be ascribed to degradation of the DNA extracted from excessively old lesion tissues or leaf samples not well preserved between their collection and delivery in the laboratory.

The QoI-sensitive isolate SFR2 showed 50% mycelia growth inhibition when using 0.06 mg L^{-1} of kresoxim-methyl (Table 1). Comparatively, QoI-resistant isolate 160 exhibited an EC_{50} for mycelium of 8.5 mg L^{-1} of QoI fungicide. The present data are consistent with the baseline sensitivity (0.09 mg L^{-1}) and the mean EC_{50} value (6.09 mg L^{-1}) found in *V. inaequalis* populations exposed to kresoxim-methyl in Quebec orchards.[14] Using kresoxim-methyl, the EC_{50} for spores collected in French orchards that had never been treated with strobilurin varied between 0.001 and 0.006 mg L^{-1} (Table 3). These EC_{50} values are in accordance with literature data found for sensitive isolates (0.0006–0.007 mg L^{-1}).[8,12] As illustrated in Fig. 6, spores collected in 46 of the 73 analysed orchards had EC_{50} values that were at least 10 times higher (up to more than 10^4 times) than the values recorded for sensitive fungal isolates. For the resistant groups of orchards that were considered from *in vitro* germination tests as being infected by QoI-resistant isolates, molecular analyses made it possible to detect the presence of the G143A mutation in 35 (76%) of them. For the remaining 11 resistant orchards, the G143A mutation could not be detected by a PCR approach, in spite of the fact that their EC_{50} and MIC values were respectively 10–10 000 and 5–10 000 times higher than values recorded for sensitive fungal isolates (mean EC_{50} = 0.004 mg L^{-1}; highest MIC = 0.03 mg L^{-1}).

For the second group of the 27 remaining orchards, for which the EC_{50} values of the *V. inaequalis* spores ranged from 0.002 to 0.04 mg L^{-1} of kresoxim-methyl, the G143A mutation could be detected only in four of them.

3.3 Occurrence of the G143A mutation in French orchards from 2004 to 2007

From 2004 to 2007, infected leaves were sampled in 281 different commercial orchards in which fungicide treatments failed to limit the spread of apple scab, and 255 were successfully analysed by either PCR-based method. A total of 29 orchards were analysed over 2 years (22 orchards) or 3 years (7 orchards). In total, this represented 291 sample analyses. In 2004 and 2005 the samples were exclusively analysed using the CAPS method. In 2006, 67 samples were analysed by the CAPS method and 20 using AS-PCR (Table 4). Among the 67 initially analysed by CAPS, 21 were found to be positive and 46 to be negative for the mutation. Among these latter, 33 of them were reanalysed by AS-PCR, and five of them (15%) turned out to be positive for the mutation using this latter method. In 2007, all samples were analysed by AS-PCR.

Table 4. Prevalence of the *Venturia inaequalis Cyt b* G143A mutation in orchards sampled from 2004 to 2007, as revealed by either the CAPS method or allele-specific PCR (AS-PCR)

	CAPS		AS-PCR	
Sampling year	No. of orchards	G143A mutation present	No. of orchards	G143A mutation present
2004	46	15	–	–
2005	125	43	–	–
2006	67	21	53[a]	21[b]
2007	–	–	33	21
2004–2007	238	79	86	42

[a] Twenty unique samples + 33 that were found to be negative in the CAPS assay.
[b] Among which 5 were found to be negative by the CAPS method.

Table 3. Sensitivity to kresoxim-methyl of *Venturia inaequalis* spores collected in control orchards that had never been treated with strobilurins

Orchard	Sampling year	Geographic origin[a]	Germination[b] (%)	EC_{50}[c] (mg L^{-1})	MIC[d] (mg L^{-1})
FR B	2005	Saint Marcel d'Urfé	10	0.006	0.03
FR B	2007	Saint Marcel d'Urfé	20	0.005	0.03
FR M	2005	Saint Marcel d'Urfé	12	0.002	0.01
FR M	2006	Saint Marcel d'Urfé	13	0.003	0.01
FR M	2007	Saint Marcel d'Urfé	14	0.006	0.03
FR V	2005	Saint Marcel d'Urfé	10	0.001	0.01
FR V	2007	Saint Marcel d'Urfé	15	0.005	0.03
VB	2004	Givors	28	0.004	0.03
CB	2004	Saint Jean le Vieux	20	0.005	0.01
Mean (± SD)			15.7 (±5.5)	0.004 (±0.002)	0.02 (±0.01)

[a] Localities are all located in the French administrative region Rhône-Alpes.
[b] Percentage germination refers to the value obtained on fungicide-free medium.
[c] EC_{50} refers to the fungicide concentration that leads to a 50% inhibition of the germination rate.
[d] MIC is the minimal concentration of fungicide that entirely inhibits spore germination.

 © 2008 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

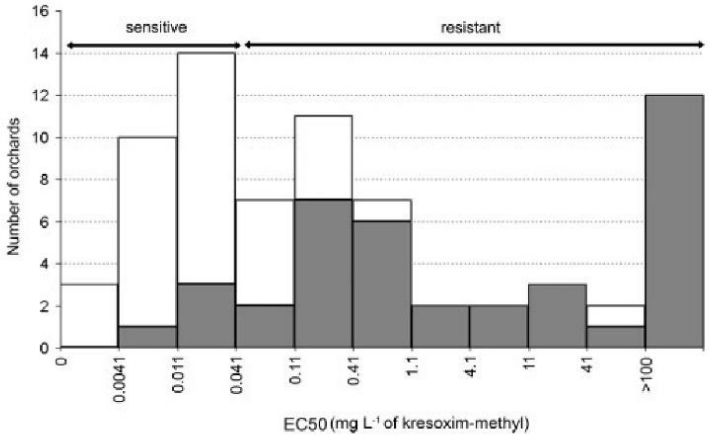


Figure 6. Distribution of the studied apple tree orchards according to the sensitivity of their *Venturia inaequalis* populations to kresoxim-methyl, as determined by spore germination assays. An arbitrary threshold value of 0.04 mg L^{-1} of fungicide (tenfold EC_{50} and twofold MIC of sensitive isolates) is usually used to separate the 'sensitive' from the 'resistant' fungal populations. Grey bars represent the number of orchards in which the G143A mutation was detected and white bars the number of orchards in which it could not be detected using either PCR-based method.

The G143A mutation was detected in 15 orchards (32%) in 2004, 43 (34%) in 2005, 42 (48%) in 2006 and 21 (64%) in 2007. Four out of the 238 samples analysed by the CAPS method revealed that the amplified 488 bp fragment was entirely digested by *Fnu*4HI, thus suggesting that, in these four situations, the G143A mutation predominated among the different *V. inaequalis* isolates present in each of these four orchards. For the 29 orchards analysed over 2 or 3 years, the mutation was detected in the first year of monitoring for 12 of them. Except for one orchard, the mutation continued to be detected over this time period, in spite of an alleged cessation of strobilurin treatments in these orchards.

The present analyses clearly indicated the repeated occurrence of the G143A mutation in multiple apple-producing regions in France all through the sampling years (Fig. 7). Indeed, in 2004 the mutation was recorded in three (33%) regions out of the nine from which samples were analysed: Midi-Pyrénées, Rhône-Alpes and Provence-Alpes-Côte d'Azur. In 2005, five (42%) regions out of 12 contained the mutation, six (54%) out of 11 in 2006 and all seven in 2007. In the two administrative regions where the G143A mutation had prevailed since 2004 (the Midi-Pyrénées and Rhône-Alpes regions), a global increase in the percentages of orchards with the G143A mutation was noticed, ranging from 73% in 2004 to 86% in 2006 in Midi-Pyrénées and from 67% in 2004 to 84% in 2006 in Rhône-Alpes (Fig. 7).

4 DISCUSSION

As one of the major pathogens of apple trees, it is necessary to monitor the occurrence, origin and distribution of fungicide resistance in *V. inaequalis* in order to optimise the use of pesticides in apple tree orchards. Single-target-site QoI fungicides have become popular to control apple scab. Recent reports of QoI resistance in the field have suggested that mutations conferring this phenotype could have been selected several times independently and/or were disseminating among pathogen populations.[15–17]

As shown in this study, spore germination assays on fungicide-supplemented media, although effective to estimate resistance levels, fail to give interpretable results in many cases owing to very low spore viability in field-collected samples. Indeed, field samples have often been exposed to additional fungicides other than QoI molecules, which, in addition to delays between collection time in the field and processing in the laboratory, may affect spore viability. Nevertheless, spore germination assays demonstrate that, in about 25% of the samples that were processed, the failure properly to control apple scab could not be attributed to QoI resistance, as both the EC_{50} and the RF values for these samples were similar to the values recorded for samples collected in control orchards contaminated by QoI-sensitive *V. inaequalis* isolates.

Detection of the G143A mutation by the CAPS method and/or AS-PCR has already been reported for several plant pathogens such as *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr,[18] *Erysiphe graminis* DC[19] and *Alternaria* sp.,[20] but not for *V. inaequalis*. The AS-PCR developed here proved to be at least 10 times more sensitive than the CAPS method based on the difference in detection level in the test samples containing different ratios of the mutated allele. This was confirmed in the samples from the orchards: the G143A mutation was detected in mixed lesion samples that were first interpreted as free of the mutation by CAPS. Nevertheless, this latter method may provide additional information compared with the AS-PCR, i.e. the presence of both the wild-type and the mutant *Cyt b* allele-bearing isolates occurring in a unique leaf sample. The digestion profiles indicate that in most cases (98%) the samples contain both the wild-type and the mutant *Cyt b* alleles. This situation may result from the coexistence in the samples of leaf lesions colonised by either mutant or wild-type sensitive strains. Alternatively, leaf lesions may have been colonised by heteroplasmic fungal strains containing in their mycelia a mixed population of mitochondria with or without the G143A mutation. Both hypotheses could be tested by analysing separately different lesions from the corresponding orchards as well as single spore isolates, as it cannot be ruled out that a single lesion could result from a coinfection by a QoI-sensitive and a resistant isolate. Heteroplasmy has been demonstrated for fungicide-resistant isolates originating from commercial orchards.[15]

As anticipated, the present results clearly show a strong association between the occurrence of the G143A mutation and the detection of QoI resistance by *in vitro* spore germination

 © 2008 Society of Chemical Industry

15264998, 2009, 1, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1649 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

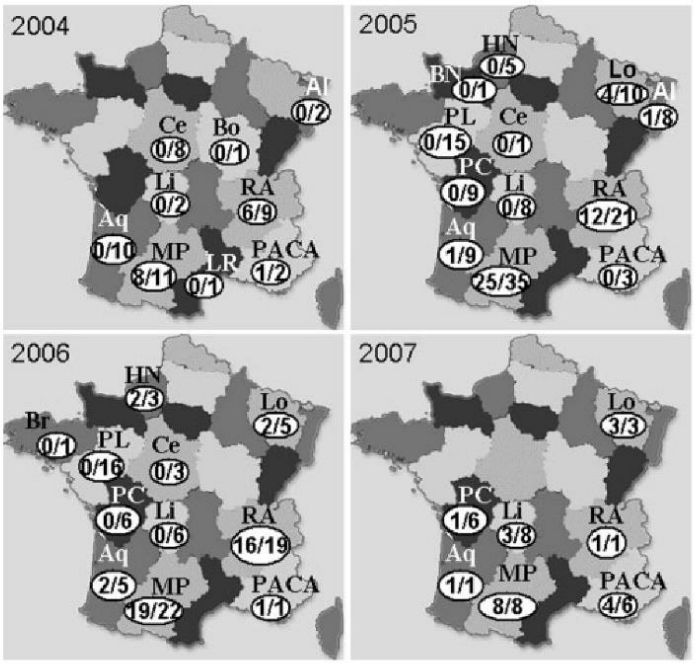


Figure 7. Distribution of the G143A mutation detected by PCR-based methods in French *Venturia inaequalis* populations sampled from 2004 to 2007. The number of populations where the point mutation was detected over the number of sampled orchards is indicated. The French administrative regions are as follows: Al, Alsace; Aq, Aquitaine; BN, Basse Normandie; Bo, Bourgogne; Br, Bretagne; Ce, Centre; HN, Haute Normandie; Li, Limousin; Lo, Lorraine; LR, Languedoc-Roussillon; MP, Midi-Pyrénées; PACA, Provence-Alpes-Côte d'Azur; PC, Poitou-Charentes; PL, Pays de Loire; RA, Rhône-Alpes.

assays. Furthermore, this mutation was also observed in many other samples that could not be studied by the *in vitro* assay. Altogether, these results demonstrate that the main cause of the failure to control apple scab using QoI fungicides arises from the spread of fungal strains harbouring this mutation. In a few cases, discrepancies between the spore germination assays and the molecular detection of the G143A mutation were observed. A high level of resistance in the absence of the G143A mutation could indicate that an alternative resistance mechanism is operating. Other resistance mechanisms have indeed been reported in *V. inaequalis* and/or in other fungi. Change from phenylalanine to leucine at position 129 of the *Cyt b* polypeptide (mutation F129L) has been shown to occur in field populations of *Pyricularia grisea* Sacc.[7,21] The present authors failed to detect this point mutation by sequencing the corresponding segment of the *V. inaequalis* gene amplified from one sample showing a moderate level of resistance without harbouring the G143A mutation (data not shown). The alternative oxidase pathway may also operate, thus leading to resistance, as previously demonstrated in *V. inaequalis*,[10,14] although, in the present case, inclusion of SHAM in the spore germination medium did not modify strobilurin sensitivity (data not shown). Further experiments would be needed to identify the other mechanisms of QoI resistance in *V. inaequalis*.

In contrast, PCR-based detection of the G143A mutation in samples that were shown to be QoI-sensitive in spore germination assays is more difficult to interpret. It could be hypothesised that these samples were a mixture of lesions colonised by predominantly sensitive isolates versus QoI-resistant ones, and that only the former contributed, owing to germination bias, to the spore germination assay, whereas DNA from both lesions contributed to the molecular assay.

In addition to being more reliable than the spore germination assays, molecular monitoring is less time consuming. It was performed on 291 samples collected in the main apple-producing regions of France in orchards in which apple scab could not be controlled by the use of strobilurin. These orchards are, however, not representative of French orchards in terms of apple scab control. Multiple detection of QoI resistance in the French apple-producing regions raises the epidemiological question about its origin, i.e. frequent occurrence of independent G143A mutational events versus the long-distance dissemination of a single or of very few G143A alleles.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Pierre Leroux and Anne Sophie Walker from INRA of Versailles for their helpful advice during this work. They also thank all the technicians and growers for collecting and sending samples of leaves.

REFERENCES

1 Sauter H, Steglich W and Anke T, Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angew Chem Internat Ed* **38**:1328–1349 (1999).

 © 2008 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2 Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-Dobrzanski B, The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* **58**:649–662 (2002).
3 Sierotzki H, Wullschleger J and Gisi U, Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pestic Biochem Physiol* **68**:107–112 (2000).
4 Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U, Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag Sci* **56**:833–841 (2000).
5 Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, *et al*, Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* **91**:1166–1171 (2001).
6 Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C and Corio-Costet MF, At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Appl Environ Microbiol* **73**:5162–5172 (2007).
7 Grasso V, Palermo S, Sierotski H, Garibaldi A and Gisi U, Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci* **62**:465–472 (2006).
8 Küng Färber RB, Chin KM and Leadbitter N, Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Manag Sci* **58**:261–267 (2002).
9 Jabs T, Cronshaw K and Freund A, New strobilurin resistance mechanism in apple scab (*Venturia inaequalis*). *Phytomedizin* **31**:15–16 (2001).
10 Olaya G, Zheng D and Köller W, Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pestic Sci* **54**:230–236 (1998).
11 Zheng D, Olaya G and Köller W, Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Curr Genet* **38**:148–155 (2000).
12 Steinfeld U, Sierotski H, Parisi S, Poirey S and Gisi U, Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Manag Sci* **57**:787–796 (2001).
13 Zheng D and Köller W, Characterization of the mitochondrial cytochrome b gene from Venturia inaequalis. *Curr Genet* **32**:361–366 (1997).
14 Jobin T and Carisse O, Incidence of myclobutanil- and kresoxim-methyl-insensitive isolates of *Venturia inaequalis* in Quebec orchards. *Plant Dis* **91**:1351–1358 (2007).
15 Dux H, Sierotzki H, Meier-Runge F and Gisi U, Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine, DMI and QoI fungicides, in *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*, ed. by Dehne H-W, Gisi U, Kuck K-H, Russell PE and Lyr H. British Crop Protection Council, Alton, UK, pp. 45–54 (2005).
16 Köller W, Parker DM, Turechek WW, Cruz AA and Cronshaw K, A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Dis* **88**:537–544 (2004).
17 Sallato BV and Latorre BA, First report of practical resistance to QoI fungicides in *Venturia inaequalis* (apple scab) in Chile. *Plant Dis* **90**:375 (2006).
18 Avila-Adame C and Köller W, Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Curr Genet* **42**:332–338 (2003).
19 Fraaije BA, Butters JA, Coelho JM, Jones DR and Hollomon DW, Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol* **51**:45–54 (2002).
20 Ma Z and Michailides TJ, An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. *J Phytopathol* **152**:118–121 (2004).
21 Kim YS, Dixon EW, Vincelli P and Farman ML, Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* **93**:891–900 (2003).

 © 2008 Society of Chemical Industry

15264998, 2009, 1, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1649 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1.2. Deuxième article : Investigation of the sensitivity of *Plasmopara viticola* to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools

Research Article

Received: 27 July 2018 Revised: 26 April 2019 Accepted article published: 11 May 2019 Published online in Wiley Online Library: 9 June 2019

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.5461

Investigation of the sensitivity of *Plasmopara viticola* to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools

Séverine Fontaine,* Florent Remuson, Laëtitia Caddoux and Benoit Barrès

Abstract

BACKGROUND: Complex III inhibitors are key compounds in the control of *Plasmopara viticola*. They are prone to the development of resistance, as demonstrated by the emergence of resistance to quinone-outside inhibitors. By using a combination of bioassays and molecular methods, we monitored sensitivity to amisulbrom and ametoctradin in *P. viticola* populations in French vineyards from 2012 to 2017.

RESULTS: We found that the alternative oxidase (AOX)-related resistance mechanism was common in French *P. viticola* populations. Target-site resistance to ametoctradin was first detected in 2015 and is likely caused by a single point mutation in the cytochrome *b* gene, leading to the S34L substitution. The role of this substitution in resistance to ametoctradin was corroborated by another study using an experimental model. A molecular biology method has been developed to detect the mutant allele. To date, the frequency of this mutation is low in French *P. viticola* populations and it is often co-detected with the wild-type allele.

CONCLUSION: Populations of *P. viticola* displaying evidence of AOX-related resistance were detected for every surveyed year, and their occurrence in French vineyards seems to be increasing over time. This resistance mechanism is currently threatening the efficacy of complex III inhibitors in the field. The low frequency of the S34L allele conferring resistance to ametoctradin, and the instability of resistant phenotypes in some populations, suggest that a fitness cost may be associated with the mutation.
© 2019 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: downy mildew; fungicide resistance; ametoctradin; AOX-related resistance; grapevine

1 INTRODUCTION

In the context of growing public concern over the adverse effects of pesticide use (environmental pollution, biodiversity loss, and potential harmful effects on human health), the monitoring of pesticide resistance is becoming a key issue. Indeed, the reduced diversity of the phytopharmaceutical toolbox resulting from more rigorous regulations has increased the risk of resistance developing towards the remaining pesticides. Pesticide resistance is mainly diagnosed in a laboratory via biological assays or molecular methods. Bioassays are considered the gold standard for pesticide resistance testing, enabling both the detection of all resistance types (known, unknown, related or not related to the target site) and the quantification of the tested pest's level of resistance. However, bioassays usually require a lot of manpower and remain time-consuming. Molecular methods, on the other hand, are easier to automate and enable large-scale analysis of many samples. However, they can only detect resistance for which the underlying mechanism has been already dentified.[1] Indeed an unknown mechanism of resistance can potentially rely on several genes, which can greatly complicate the development of molecular tools.

Downy mildew caused by the oomycete *Plasmopara viticola* (Berk and Curt) is an obligate parasite of grapevine. This disease can have major economic impacts on grapevine cultivation. The pathogen can affect all green parts of grapevines and lead to high yield losses, reduced berry quality, and brown-rot symptoms.[2] In conventional and organic grapevine cultivation, this disease is mainly controlled via the use of oomycete fungicides. Apart from multisite fungicides such as copper compounds, folpet and mancozeb, the main fungicide groups used to manage downy mildew are (i) carboxylic acid amides (CAA), which inhibit cellulose synthesis, (ii) phenylamides, which act as RNA polymerase inhibitors, and (iii) complex III inhibitors, which inhibit mitochondrial respiration. The latter class of fungicides encompasses various groups depending on their binding sites on cytochrome *b*, one of the three catalytic subunits of complex III. Cytochrome *b* is an integral membrane protein consisting of eight transmembrane

* *Correspondence to: S Fontaine, Université de Lyon, Anses, INRA, USC CASPER, 69007 Lyon, France. E-mail: severine.fontaine@anses.fr*

Université de Lyon, Anses, INRA, USC CASPER, Lyon, France

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

helices, having two distinct binding sites on each side of the mitochondrial membrane (Qo, quinone oxidation site, outside, such as kresoxim-methyl, trifloxystrobin; Qi, quinone reduction site, inside, such as cyazofamid and amisulbrom).[3] Complex III-inhibiting fungicides are classified as quinone-inside inhibitors (QiIs) or quinone-outside inhibitors (QoIs), depending on their binding to the Qi or Qo site. It has been demonstrated recently that ametoctradin, a third class of complex III-inhibiting fungicides, previously thought to bind to the Stigmatelin binding site, interacts with both the Qi and Qo sites[4] of cytochrome *b* (with a better affinity for the Qi site). Hence, they have been classified as QioI (instead of QoSI) in a recent classification (https://osf.io/qwg42/) by analogy with the classification first published.[5] *P. viticola* is considered a plant pathogen with a high risk of developing fungicide resistance (FRAC classification: http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8). This species alternates between sexual and asexual reproduction, which is thought to increase the evolutionary potential of plant pathogen species.[6] Sexual reproduction promotes allele recombination and enables the production of new genetic combinations (e.g. pyramiding of pesticide resistance alleles). Multiple asexual generations can result in a rapid increase in the frequency of resistant individuals in populations under selection pressure. The repeated use of fungicides has already led to the selection of several resistances towards the main fungicides that are currently used to manage downy mildew in vineyards (i.e. phenylamides,[7] cymoxanil[8] and more recently CAA[9]). The use of fungicides that target the mitochondrial respiration complex III has also resulted in the evolution of resistance. To date, two resistance mechanisms towards these fungicides have been identified in *P. viticola* populations. The first and most widespread resistance mechanism affects cytochrome *b*. It is a target site resistance to QoIs. This resistance is mainly caused by glycine to alanine substitution at position 143 (G143A) within the Qo binding site of cytochrome *b*.[10] The F129L substitution has also been described, but it has a low frequency in field populations.[10] The second type of resistance mechanism involves the overexpression of an alternative oxidase (AOX). AOX is involved in an alternative pathway bypassing complex III for electron transfer and ATP production when cytochrome *b* is inhibited. In fungi, this mechanism was first described in *Neurospora crassa*.[11] In contrast to the G143A and F129L substitutions, which confer resistance to QoIs only, the AOX pathway is responsible for resistance to all complex III inhibitors. Since cross-resistance is defined as a unique mechanism that simultaneously confers resistance to several fungicides acting on the same target, the AOX-related resistance mechanism can be considered as a cross-resistance. In the field, the impact of AOX overexpression on QoI efficacy is still under debate,[12,13] but a recent study using controlled inoculation in a field assay showed that a high proportion of AOX-related resistant strains can substantially affect the efficacy of ametoctradin or cyazofamid.[14] This observation needs confirmation from trials under natural infestation. These two resistance mechanisms are not exclusive and may be found in the same strain or may be associated with one or more resistances to other active substances: this is called multiple resistance.

The widespread distribution of the G143A substitution in French populations[15] has led to restrictive use of QoIs in France. QiIs and QioIs remain key modes of action for the control of downy mildew. They are still widely used in conventional grapevine cultivation. In this study, we monitored the amisulbrom (QiI) and ametoctradin (QioI) sensitivity of *P. viticola* populations in French vineyards. Fungicide sensitivity was studied using bioassays and/or molecular methods between 2012 and 2017. The objectives of this study were to (i) characterize the sensitivity of *P. viticola* to ametoctradin and amisulbrom using bioassays, (ii) evaluate the putative mechanisms involved in resistance to these compounds using an inhibitor of alternative respiration, (iii) identify the molecular determinant of resistance to ametoctradin observed in populations or isolates of *P. viticola*, and (iv) develop a rapid molecular test to easily detect the allele involved in ametoctradin resistance in order to screen for the resistant allele in *P. viticola* populations sampled in French vineyards from 2015 to 2017.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sampling and *in vitro* multiplication of *P. viticola*

From 2012 to 2017, sampling was performed from June to October in vineyards where amisulbrom and/or ametoctradin were sprayed. Thirty to forty leaves with downy mildew symptoms were randomly collected in each sampled vineyard. The sampled vineyards were located in different areas of French grapevine production and the annual number of samples was variable depending on disease pressure. Overall, samples were collected from 295 vineyards, with numbers ranging from 13 samples in 2015 to 104 samples in 2012. Upon receipt in the laboratory, the infected leaves were washed with water to remove old sporangia. Leaf pieces bearing downy mildew lesions were cut off and placed in a humid chamber at 20 °C for 24 h to stimulate fresh sporulation. The newly produced sporangia were collected using a brush and resuspended in 5 mL of sterile water to obtain a sporangial suspension. This suspension was then used for *in vitro* multiplication of *P. viticola* with inoculation on the abaxial face of excised leaves of *Vitis vinifera* (cv. Cabernet Sauvignon) placed on water-agar supplied in kinetin in petri dishes. The inoculated leaves were placed at 20 °C with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness for 7 days. If necessary, this multiplication step was repeated from one to four times, until enough biological material was produced to perform all the bioassays.

Two different sampling strategies were used for the molecular biological analyses. In 2015 and 2016, *P. viticola* sporangia were sampled as populations from multiple *in vitro* infected leaves after at least one multiplication step in the laboratory. In 2017, in order to reduce strain competition bias during the inoculum multiplication process, single lesions were cut out directly from the leaves collected from vineyards. For each sampled vineyard, 30 individual lesions, which were 6 mm in diameter and collected from different infected leaves, were individually placed in a microtube. The sporangia and individual lesions were kept for at least 12 h at −80 °C until DNA extraction.

2.2 Fungicide sensitivity bioassays

The fungicide sensitivity of each sampled population was determined by bioassays using the leaf-disc method as previously described.[16] Fungicide bioassays were performed with amisulbrom (Philagro, Saint Didier au Mont d'Or, France) from 2012 to 2017 and with ametoctradin (BASF, Ludwigshafen, Germany) from 2014 to 2017. Each fungicide was supplied as a formulated compound (containing only one active ingredient as the active compound). The final tested fungicide concentrations were 0, 1 and 10 mg L^{-1}. From 2013 onward, the amisulbrom bioassays were performed with and without the addition of 80 mg L^{-1} of salicylhydroxamic acid (SHAM; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri,

 © 2019 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

15264998, 2019, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.5461 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Table 1. Primer sequences used for cytochrome *b* sequencing and for the two AS-PCRs

Targeted locus	Primer name	Nucleotide position on AY696297.1 sequence	Sequence
Cytochrome *b*	ND9 529F[a]	754–774	5′-TGAATTTAATAGTCCTTGGTA-3′
	PvCytb5rev	1615–1596	5′-GGATGACCTAAAGTATTAGG-3′
	PvCytb2sens	1361–1380	5′-CGCCGTTGATAATCCAACAT-3′
	PvCytb2Rev	2161–2141	5′-ATCCAGCCGATACTGAACCA-3′
AS-PCR fragment	Pv-cytb-S34S-F3	934–955	5′-ATTATTTTTATGGATTCGGTTC-3′
	Pv-cytb-S34L-F1	934–955	5′-ATTATTTTTATGGATTCGGTTT-3′
	Pv-cytb-R1	1083–1063	5′-ACCAACCGTTATTTACATCAC-3′

The underlined nucleotides correspond to the locked nucleic acids (nucleic acid analogs that contain a 2′-O, 4′-C methylene bridge) used for enhancing the primer melting temperature.
[a] Previously published primer.[15]

USA), an inhibitor of alternative respiratory function. The results obtained with amisulbrom alone and with amisulbrom and SHAM were compared. If sporulation occurred in the amisulbrom but not in amisulbrom + SHAM bioassay, then we concluded that only the AOX-related mechanism was involved. If both bioassays sporulated, we concluded that there was at least one other resistance mechanism involved, and most probably a target-site resistance mechanism. The ametoctradin bioassays were conducted only with the addition of 80 mg L^{-1} of SHAM at final fungicide concentrations of 0, 1 and 10 mg L^{-1}. In 2012, the amisulbrom bioassays were performed only without SHAM. The sporangia obtained with amisulbrom bioassays were harvested for DNA extraction and cytochrome *b* sequencing. For all the bioassays, ten leaf discs were prepared on agar supplied in kinetin in Petri dishes. Three 15 µL droplets of a solution with the different fungicide concentrations and 1×10^5 sporangia mL^{-1} were spotted on the abaxial face of one leaf disc. After at least 48 h of incubation at 20 °C in the dark, the droplets were removed. The Petri dishes were then placed at 20 °C with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness. Sporulation intensity (size and density) at each inoculation spot was visually estimated and compared to pictures with different sizes of sporulation to witch scores are assigned 7 days after inoculation. The results were expressed as the ratio of the sporulation scores of the concentration to the sporulation score of the control (i.e. with a fungicide concentration of 0 mg L^{-1}). For both fungicides, populations with sporulation at 1 mg L^{-1} (with or without SHAM) were considered as resistant. The threshold of 1 mg L^{-1} was chosen based on the distribution of the CMI of all the populations tested (Supplementary Information File S1). To confirm the resistance status of a sample, the bioassay was repeated once for populations displaying phenotypes resistant to ametoctradin. When confirmed in a second bioassay, the obtained sporangia were harvested for DNA extraction and cytochrome *b* sequencing. Potential resistance to azoxystrobin (Amistar 250 g L^{-1}, kindly supplied by Syngenta) was assessed via a discriminant dose test (1 mg L^{-1}) with these samples as described above for the ametoctradin and amisulbrom sensitivity assays. The azoxystrobin bioassays were performed only in the presence of SHAM (80 mg L^{-1}).

2.3 DNA isolation for cytochrome *b* sequencing

In 2012, sporangia from four resistant populations on amisulbrom assays without SHAM were collected for cytochrome *b* sequencing. These populations were named 12-050, 12-124, 12-255 and 12-328. Four populations determined as sensitive to ametoctradin and two populations of *P. viticola* sporangia that sporulated in the presence of a discriminant dose of ametoctradin with the addition of SHAM were also collected for molecular biological analysis. The sensitive populations were named 15-0128, 16-0187, 17-0079 and 17-0127. The two resistant populations were named 15-083 and 17-083 and were sampled in 2015 and 2017, respectively. DNA extraction was performed with a CTAB-isoamyl alcohol/chloroform procedure.[17] The samples were homogenized in individual tubes for two 30-s cycles at 30 Hz using TissueLyser II (Qiagen Hilden, Deutschland) with a stainless-steel bead (4.76 mm). The samples were then incubated at 65 °C for 2 hours with 850 µL of preheated CTAB, and then 600 µL of lysate was pipetted in a new tube. DNA extraction was undertaken via the addition of 570 µL of chloroform-isoamyl alcohol, followed by centrifugation at 13000*g* for 10 min. DNA precipitation was performed via the addition of 2/3 volume of cold isopropanol to the supernatant, followed by incubation at −20 °C overnight. Centrifugation was performed at 13000*g* for 10 min and the supernatant was discarded. The DNA pellet was washed twice with 70% ethanol and resuspended in a final volume of 50 µL of ultra-pure water. DNA from uninfected leaves and from other phytopathogens commonly found on grapevine leaves (leaves bearing *Erysiphe necator* spores, and cultures of *Botrytis cinerea*, *B. pseudocinerea* and *Penicillium* spp.) were also extracted with the same CTAB procedure. These DNA extracts were used respectively as negative controls and to assess the specificity of the designed primers.

2.4 Cytochrome *b* sequencing

Due to the length of the cytochrome *b* gene, sequencing was performed with two pairs of primers (Table 1).[15] The first primer pair, ND9 529F/PvCytb5rev, enables the downstream amplification of the cytochrome *b* gene fragment, while the second pair, PvCytb2sens/PvCytb2Rev, enables the upstream amplification of the fragment. Two separate PCR amplifications were performed. PCRs were carried out in a final reaction volume of 30 µL containing 15 µL of Qiagen® Multiplex PCR Master Mix, 0.6 µmol L^{-1} of each forward and reverse primers, and 10–100 ng DNA. The PCR cycles consisted of an activation step with the Taq polymerase enzyme at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles of a denaturation step at 94 °C for 30 s, a hybridization step for 60 s at the annealing temperature (55 °C and 62 °C for the ND9 529F/PvCytb1rev and PvCytb2sens/PvCytb2Rev primer pairs, respectively) and an extension step for 60 s at 72 °C. A final extension step was performed at 72 °C for 5 min. Each pair of primers enabled the amplification of a fragment of approximately 800 bp. The complete sequence of

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

the cytochrome *b* gene was obtained by assembling the two partially overlapping amplicons (about 200 bp). Sanger sequencing of the PCR products was performed by the Genewiz company (South Plainfield, USA).

2.5 Allele-specific PCR assays

An alignment of the complete sequences of the cytochrome *b* obtained from two resistant strains and four sensitive samples showed that a polymorphism is linked to the target site resistance to ametoctradin (see Results). A molecular tool with two allele-specific PCRs (AS-PCRs) was developed in order to identify the different alleles. Two sets of primers that bind specifically to each allele (i.e. wild-type or mutant) were designed. For each forward primer, the 3′ end corresponded to the SNP position and was specific to the wild-type or the mutant nucleotide (wild-type specific primer Pv-Cytb-S34S-F3; mutant specific primer Pv-Cytb-S34L-F1). The reverse primer was common to both primer pairs. All primers contained 'locked nucleic acids' (nucleic acid analogs that contain a 2′-O, 4′-C methylene bridge) for enhancing primer melting temperature. PCR amplification was performed in a final reaction volume of 25 µL containing 12.5 µL of Qiagen® Multiplex PCR Master Mix, 0.62 µ mol L^{-1} allele-specific primers (Pv-Cytb-S34S-F3 or Pv-Cytb-S34L-F1 with Pv-Cytb-R1 – Table 1) and 1 µL DNA. The PCR cycle consisted of an activation step with the Taq polymerase enzyme at 95 °C for 15 min followed by a 35 cycles of touchdown PCR procedure that included denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 65 °C for 30 s for the first 20 cycles and at 64 °C for the last 15 cycles, and extension at 72 °C for 60 s. The final elongation step was performed for 5 min at 72 °C. The PCR products were separated using the QIAxcel® system. Migrations were performed with a screening cartridge using one of the default methods implemented in the machine, named 'AM420.' To enable the sizing of the amplified fragment, QX Size Marker 100 bp-2.5 kb was used in combination with QX Alignment Marker 15 bp-3 kb.

Detection thresholds for the AS-PCR method were determined with two serial DNA dilutions from a 'wild' (sensitive) genotype and a 'mutant' (resistant) genotype ranging from 0.375 to 10 ng μL^{-1}.

2.6 Statistical analysis of the evolution of the prevalence of the AOX-related resistance mechanism in *P. viticola* populations

In order to test whether there were changes in the prevalence of the AOX-related resistance mechanism over the years and within epidemic seasons, we analyzed the impact of the sampling year and the number of days between the start of an epidemic and the time of collection on the prevalence of resistant populations within a generalized linear mixed model framework. Every year, the collection date for the first sample was considered as the start of the epidemic, for all vineyards. The day variable for the epidemic was built by subtracting the date of sample collection from the day of the start of the epidemic. A binomial distribution with a logit link function was assumed for the response variable (sensitive/resistant). Because the populations were sampled in different vineyards from one year to the next, they were considered as independent. The vineyards were only sampled once during a year, and thus there was no within-year temporal autocorrelation. We modeled the rate of resistant populations as a function of the fixed 'year' and 'day' variables for each epidemic. In order to take into account potential spatial autocorrelation between populations, the 'département' (a French administrative division) was included in the model as a random effect. The 'glmer' function of the R package 'lme4'[18] was used to fit the model. The R scripts used for the data analyses and the production of the figures are available online.[19]

3 RESULTS

3.1 Fungicide sensitivity assays

3.1.1 Amisulbrom sensitivity bioassays and resistance due to AOX pathway

From 2012 to 2017, amisulbrom assays were performed for 295 populations. More than 24% of the samples had sporulation in the presence of amisulbrom at a concentration of 1 mg L^{-1} (Supplementary Information File S1). Two populations out of the 24 sampled in 2016 were resistant to amisulbrom mixed with SHAM in the bioassays. These results were not confirmed by a second repetition of the bioassay. These two populations were excluded from the subsequent analyses of AOX-related resistance because a target site resistance to amisulbrom could not be completely ruled out. All the other resistant to amisulbrom populations were sensitive in the presence of SHAM, which showed that the resistance mechanism involved AOX-related resistance, presumably AOX overexpression.[20] The percentage of populations displaying the AOX-related resistance mechanism varied from year to year, ranging from 4% in 2012 to 54% in 2017. In 2012, the bioassays were conducted only without SHAM, so the possible involvement of a different resistance mechanism could not be ruled out, even though we did not detect any signs of target site resistance to amisulbrom in the three following years. The cytochrome *b* sequencing performed with the 2012 lesions sporulating in the presence of amisulbrom from four different populations (12-050, 12-124, 12-255 and 12-328) did not reveal any specific polymorphism (apart from the well-known G143A substitution). We found a significant increase in the frequency of populations with the AOX-related resistance mechanism over the years (coefficient estimate ± SE: 0.50 ± 0.10, $P < 0.001$; Fig. 1). The number of days between the beginning of the epidemic and sampling also seemed to significantly increase the probability of finding populations with strains with AOX-related resistance (coefficient estimate ± SE: 0.015 ± 0.007, $P < 0.05$; Fig. 1). Populations with the AOX-related resistance mechanism were mainly found in two areas of France. In the north-east of France (Bourgogne-Franche-Comté and Champagne vineyards; Fig. 2), populations displaying this resistance phenotype were detected every year. To a lesser extent, populations with AOX-related resistance mechanism were also found in the south-west of France (e.g. Charente, Bordeaux, Bergerac and Armagnac vineyards; Fig. 2).

3.1.2 Ametoctradin sensitivity assays

From 2014 to 2017, ametoctradin bioassays in the presence of SHAM were performed for 128 populations. Nine populations displayed the resistance phenotype during the first round of tests, but only two could be confirmed as resistant with the second round of tests. Among the 45 populations analyzed in 2014, no resistance phenotype was detected (Fig. 3(A)). In 2015, out of eight analyzed populations, two were found to be resistant to ametoctradin in the presence of SHAM. Both were located in the north-east of France and were very close to each other (within a few kilometers). Only one of these samples remained resistant during the confirmation bioassay. In 2016, five of the 44 analyzed populations were found to display the phenotype of resistance

 © 2019 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

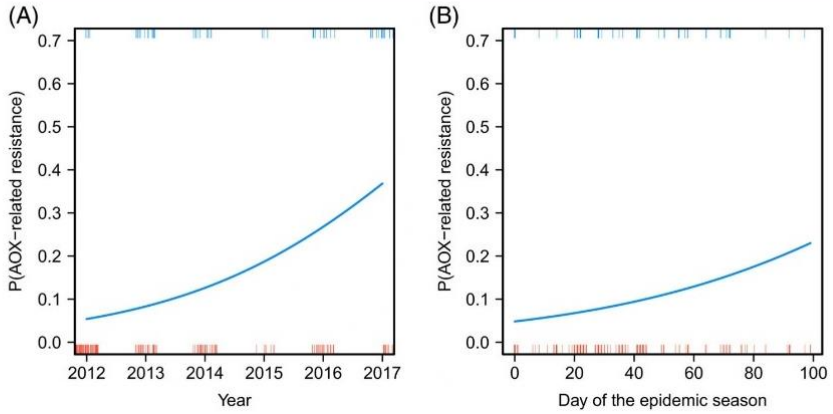


Figure 1. Change in the frequency (P) of AOX-related resistance in populations of *Plasmopara viticola* in French vineyards over the years (A) and during epidemic seasons (B). The underlying model takes into account both effects as well as the département administrative division as a random effect (see Materials and Methods section for details).

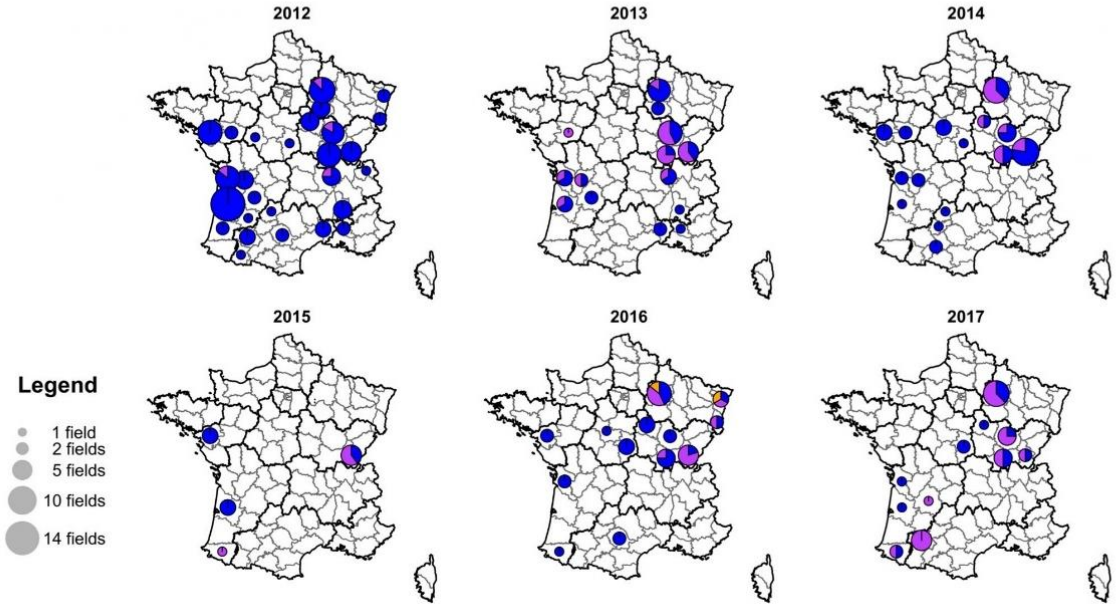


Figure 2. Maps of the distribution of AOX-related resistance in populations of *Plasmopara viticola* in French vineyards from 2012 to 2017. AOX-related resistance was assessed by bioassay with amisulbrom, with or without SHAM. The pie chart areas are proportional to the number of populations sampled in a département. Blue and purple represent sensitive populations and those with AOX-related resistance, respectively. Orange represents the two populations in 2016 where target-site resistance to amisulbrom was detected but not confirmed by a second bioassay.

to ametoctradin with the addition of SHAM in the first test only. None were confirmed with the second bioassay. They were all sampled from vineyards located in the north-east of France as well (Fig. 3(A)). In 2017, two populations out of the 31 screened were resistant to ametoctradin + SHAM. Both were from the south-west of France. Only one remained resistant in the second round of bioassays.

3.2 Development of a molecular tool to detect target site resistance to ametoctradin

3.2.1 Cytochrome b *sequencing*

Sequence analyses of the two populations (15-083 and 17-083) with confirmed resistance to ametoctradin + SHAM revealed the presence of the same single point mutation in the cytochrome *b* gene resulting in the replacement of serine by leucine at codon 34 (S34L). This mutation was not present in cytochrome *b* sequences from populations determined as sensitive to ametoctradin (15-0128, 16-0187, 17-0079 and 17-0127; Supplementary Information File S2). This substitution is caused by a change of a cytosine to a threonine in the nucleotide triplet (TCA/TTA). The G143A substitution known to be involved in QoI resistance was detected in the sequence obtained from the 15-083 population. The G143A substitution was not found in the 17-083 population. Both populations were sensitive to amisulbrom + SHAM at the concentration of the assays. As expected, only the 15-083 population, which carried the G143A substitution,

 © 2019 Society of Chemical Industry

15264998, 2019, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.5461 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

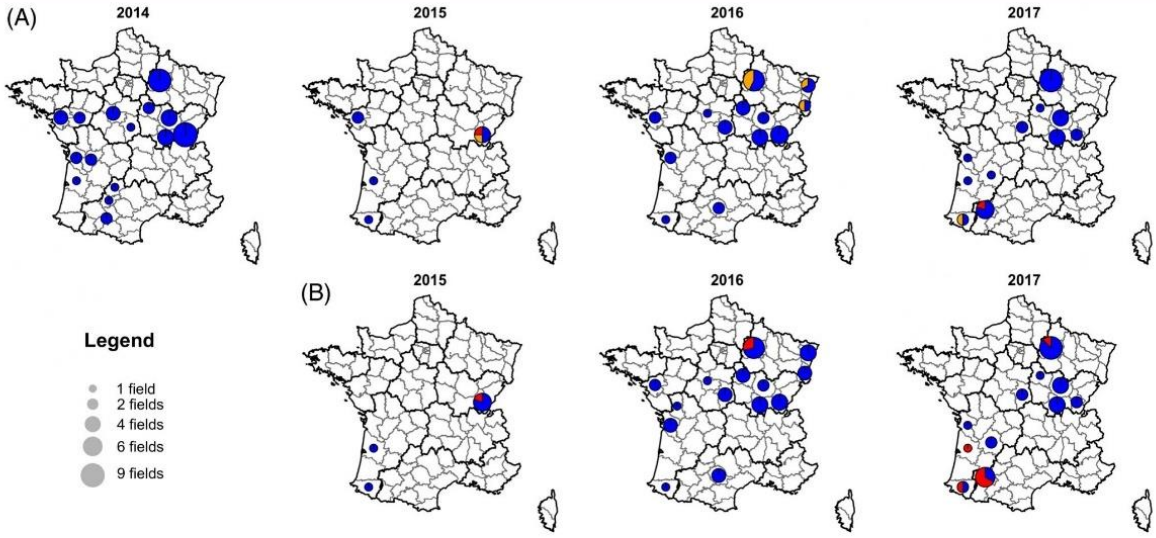


Figure 3. Maps of the distribution of target-site resistance to ametoctradin in populations of *Plasmopara viticola* in French vineyards determined by bioassays from 2014 to 2017 (A) and by molecular biological assays from 2015 to 2017 (B). The pie chart areas are proportional to the number of populations sampled in a département. For the bioassay maps, blue and red represent sensitive and resistant populations, respectively. Orange represents populations where target-site resistance to ametoctradin was detected but not confirmed by a second bioassay. For the molecular biological maps, red and blue represent populations where the S34L mutation was detected or not detected, respectively.

was found to be resistant to azoxystrobin. The cytochrome *b* sequences of both strains were deposited in GenBank (accession numbers MF102263 for 15-083 and MG757168 for 17-083).

3.2.2 *Allele-specific PCR validation*

Discrimination between sensitive S34 and resistant L34 alleles of cytochrome *b* was obtained with both primer sets Pv-Cytb-S34S-F3/Pv-Cytb-R1 and Pv-Cytb-S34L-F1/Pv-Cytb-R1, using touchdown PCR. Each set of primers enabled the amplification of a specific 152-bp fragment when the corresponding allele was present. With both sets of primers, no amplification was obtained from the DNA of uninfected grapevine leaves or other common grapevine-pathogenic fungi. Both AS-PCRs enabled the targeted allele to be detected at the lowest tested concentration of DNA (0.375 ng μL^{-1}).

3.3 Occurrence of the S34L substitution in French vineyard populations

From 2015 to 2017, the S34L detection test was performed with 89 samples. The tests were carried out with populations in 2015 and 2016 and with individual lesions in 2017. In 2015, out of seven vineyards analyzed, the substitution was detected in one population collected in Bourgogne-Franche-Comté. In 2016, out of the 49 vineyards tested, S34L was detected only in two populations (3%), both sampled in Champagne vineyards (Fig. 3(B)).

The S34L change was detected in 22 individual lesions out of the 1011 analyzed in 2017 (2.2%). These lesions came from seven different vineyards out of the 33 tested (18%) in 2017; five of them were located in vineyards in the south-west of France and one was from the Champagne area (Fig. 3(B)). Within five vineyards, the substitution was detected at a low frequency, ranging from 3% to 13%. A higher frequency of the S34L substitution was found in one vineyard where 36% of the individual lesions tested were positive for this substitution. Most of the time, both alleles (i.e. mutant and non-mutant) were detected in individual lesions (75%).

A comparison of the results obtained using molecular biological analysis and bioassays revealed some discrepancies. Among nine vineyards where the mutant allele was detected, five samples were also found to be resistant using bioassays with ametoctradin + SHAM. Only two out of five of these populations were confirmed as resistant by a second bioassay. The three remaining populations that were not confirmed as resistant with a second bioassay were retested with the molecular biological tool. The mutant allele could no longer be detected in these populations. Lastly, in four vineyards sampled in 2017, the mutant allele was detected in individual lesions, but this result could not be confirmed by a bioassay carried out at the population level. In all of these four populations, the detected frequency of the mutant allele was very low (ranging from 3% to 13%) and several multiplication steps were needed between the lesion sampling and the bioassays in order to have enough inoculum to perform the test.

4 DISCUSSION

Confident in the fact that S34L substitution is associated with ametoctradin resistance, we developed and validated a molecular biological method to easily detect this substitution by AS-PCR with downy mildew sporangial populations or lesions. We have also presented a survey result of spatial and temporal changes in resistance to amisulbrom associated with an AOX-related resistance mechanism. Target site resistance to amisulbrom was first detected in two populations, but not confirmed by a second bioassay after multiplication, probably because it was at low frequency in our samples. Nevertheless, a target site resistance to cyazofamid, another QiI, has been recently described.[21] This resistance was found to be associated with the E203-DE-V204 insert or the L201S change in cytochrome *b* and is suspected to confer cross-resistance to amisulbrom.

 © 2019 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

4.1 Target site resistance to ametoctradin in French vineyards

Our survey has revealed the presence of *P. viticola* populations specifically resistant to ametoctradin in French vineyards. The first resistant population was detected in north-east France in 2015. Resistant phenotypes are correlated with a substitution at position 34 of the cytochrome *b* gene. The S34 amino acid is located in the Qi site. A recent study on the binding mode of ametoctradin revealed that this fungicide can interact both with Qi and Qo sites.[4] Our findings show that a substitution in the Qi site caused – or was likely the cause of – a decrease of sensitivity to ametoctradin in *P. viticola* without cross-resistance to amisulbrom or azoxystrobin. A study performed with a yeast model confirmed that S34L caused a loss of sensitivity to ametoctradin.[22] The yeast mutant carrying S34L showed cross-resistance to amisulbrom, which seems to conflict with our findings. However, the level of resistance to amisulbrom could not be properly assessed in the yeast model and may be too low to be observed in our bioassays performed with only two discriminant doses.

Complete sequencing of the cytochrome *b* gene revealed that the S34L substitution can be found in combination with the substitution conferring resistance to QoIs (G143A). This demonstrated that strains combining both substitutions are viable and can resist both ametoctradin and QoIs. These strains with multiple target site resistance could complicate the control of downy mildew on grapes in the future.

To date, the occurrence and frequency of ametoctradin resistance in *P. viticola* populations seem to be low in French vineyards. Using bioassays, this resistance could only be confirmed in two vineyards (even though up to eight resistant populations were detected during the primary round of resistance bioassays, see below), one in 2015 and one in 2017. In 2017, using the new AS-PCR tool, we were able to evaluate the frequency of the S34L substitution within populations by analyzing multiple independent leaf lesions for each investigated vineyard. Except for one population, the frequency of S34L was always very low. Interestingly, in most cases (75% of lesions with mutant alleles), both wild and resistant alleles were detected. This finding may have been due to either co-infection or heteroplasmy. Despite the limited size of the cut lesions ($\approx 0.2\ cm^2$), the presence of multiple strains could not be completely ruled out. Co-infection at the lesion level has already been described in several pathosystems (e.g. *Podosphaera plantaginis*[23] and *Microbotryum violaceum*[24]). However, it is unlikely that co-infection alone could explain such a high prevalence of mixed alleles within single lesions. Heteroplasmy is the presence of more than one type of mitochondrial DNA in the same cell. This phenomenon has been described in many eukaryotes[25] and in several phytopathogens (e.g. *Podosphaera leucotricha*[26]). It has even been described for the G143A mutant allele associated with QoI resistance in *Venturia inaequalis*,[27] *Podosphaera xanthii*[28,29] and *Botrytis cinerea*.[30] Further investigations are necessary to determine if mixed alleles in one lesion are caused by mixed strains in the same lesion or by mixed mitochondrial DNA in same strain, but monosporangial isolation in resistant populations seemed to confirm that multiple-allele detection was at least partly due to heteroplasmy in *P. viticola* strains. It is difficult to know if this is a transient state that will evolve towards homoplasmy or if the combination of mutant and wild type alleles in a cell confers a fitness advantage and would thus be maintained.

The discrepancies between the results obtained using bioassay and molecular tools emphasize the complementary nature of the two methodologies. They may also highlight some limitations of our sampling procedures, which depend on the type of analysis (molecular biological or bioassay). It is important to note that the two confirmed cases of specific resistance to ametoctradin detected by repeated bioassays were found to carry the S34L substitution. All the differences observed in our tests suggest greater sensitivity with the molecular biological assay. Such divergences between molecular biological and *in vitro* assays have already been reported in heteroplasmic strains of *P. xanthii*[28,29] and *Botrytis cinerea*.[30] Because of the difference in sensitivity between the two methods, the detection of the G143A mutant allele in *P. xanthii* is associated with a QoI resistance phenotype only when its frequency within the studied strain exceeds 70%.[28] Another potential cause of discrepancies between the two types of tests could result from the multiplication steps required to perform bioassays. It is possible that the mutant mitochondria (in the case of heteroplasmic strains) or mutant individuals (in the case of multiple strains found in the sample) are lost during the multiplication steps, be it by genetic drift only, mainly when the mutant allele or strain is detected at a low frequency, or because of a potential fitness cost linked to S34L substitution. The loss of mutant alleles during multiplication steps has already been described in the literature for the G143A mutation involved in QoI resistance.[29,31] Moreover, potential adverse effects on complex III activity and growth capacity were identified with S34L-carrying strains of mutant yeasts.[22] It is possible that a fitness cost may also be associated with the S34L substitution in *P. viticola* and results in an advantage of wild mitochondria/strains over mutant mitochondria/strains. This hypothesis of a fitness penalty would be consistent with the low number of populations (two out of eight) in which we confirmed the observed resistance phenotype in a second bioassay, requiring several more multiplication steps.

Our results exemplified an often underestimated limitation of pesticide resistance bioassays when performed using populations following *in vitro* multiplications. These multiplications can lead to an alteration of the composition of the original population, especially when resistance is at low frequency. In that sense, a sensitive molecular biological tool to detect such substitutions is essential for the early and efficient monitoring of alleles involved in target site resistance to ametoctradin. The potential cost of the S34L substitution requires further investigation as it may be of key importance in the future management of this resistance in the wine-growing landscape.

4.2 Increasing occurrence of AOX-related resistance

The activation of the alternative respiration pathway that may be associated with cross-resistance to complex III inhibitor fungicides was found to be common in French vineyards. Even though there are some spatial and inter-annual variations in the occurrence of this resistance mechanism, it seems to be well established in most French vineyards and has been increasing in the past few years. This mechanism has been characterized in several other phytopathogens such as *Septoria tritici*,[32] *Venturia inaequalis*,[33] *Mycosphaerella fijensis*[34] and *Magnaporthe grisea*.[35] It is considered to be a less efficient pathway for energy production than the ordinary electron transfer chain.[13] In *P. viticola*, the role of AOX overexpression in resistance to QoIs has been established. A fitness study performed *in vitro* without selection pressure and with a combination of sporangia with and without AOX overexpression showed a strong reduction in AOX expression in sporangia after several multiplication cycles.[20] The competitiveness of sporangia with AOX overexpression but without selection pressure seems

 © 2019 Society of Chemical Industry

15264998, 2019, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.5461 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

to be weaker. However, even though a cost of AOX-related resistance has been established in laboratory experiments, the steady increase in the occurrence of AOX-related resistant *P. viticola* populations observed in this survey is worrying (even though this surveillance was only limited to 5 years).

Our survey also showed that the proportion of populations identified as carrying the AOX-related resistance mechanism increases significantly during epidemic seasons, which is not compatible with a high fitness cost of resistance in field situations. The level of resistance associated with the AOX-related mechanism is quite high. Our bioassays performed with two concentrations of amisulbrom + SHAM revealed resistant strains with a resistance factor of 30 or 300. The mechanism confers positive cross-resistance to all complex III inhibitor fungicides.[12,13,36] Moreover, the AOX-related resistance mechanism could lead to an increase in the size of the population on which other selection pressures can act and increase the risk of selection for other resistance. This could potentially lead to the accumulation of different resistance mechanisms within the same strain that could result in higher resistance factor to an active ingredient. Such phenomenon has been hypothesized in some *P. viticola* strains resistant to cyazofamid.[21]

5 CONCLUSION

Annual monitoring of resistance to amisulbrom and ametoctradin in French *P. viticola* populations suggested the existence of two resistance mechanisms: a mechanism due to an AOX pathway and a target site resistance to ametoctradin caused by a mutation in the cytochrome *b* gene. The AOX-related mechanism in *P. viticola* populations seems to increase within epidemic seasons and be increasing over the years. This finding needs to be confirmed by further monitoring, and the impact of this mechanism on amisulbrom and ametoctradin efficacy needs to be addressed properly with field assays.

In this study, we also described a previously unreported amino acid substitution on the Qi site of cytochrome *b*, namely S34L, which only affects sensitivity to ametoctradin. A molecular biological tool was developed that enables the mutant allele to be detected in both sporangia and downy mildew lesions. Molecular biological analyses and bioassays were performed in parallel. A comparison of the results obtained with these two assays revealed some apparent discrepancies, which raised the issue of the possible fitness cost associated with the S34L substitution, which has not yet been validated.

The different natures of the two types of resistance are key to their management. Target site resistance to ametoctradin can be managed by limiting the application frequency of this active substance, thus lowering the selective pressure on the populations of the pathogen. The management of the AOX-related resistance mechanism, on the other hand, cannot be addressed based solely on the application of a specific active substance. This mechanism probably affects most (if not all) active substances belonging to the complex III inhibitor class of fungicides. Therefore, resistance management should only be approached by considering applications of all active substances targeting cytochrome *b* at a quinone site (QoI, QiI, QioI). The co-occurrence of both types of resistance mechanisms may also further complicate the strategy required to limit the progression of these resistances, threatening the efficacy of conventional pest management. It is most likely that only field trials or field surveys would be necessary to identify the best strategy for managing this complex of resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all the field workers who participated in sample collection, especially Jacques Grosman, who is in charge of the network. We would like to thank Brigitte Meunier for her comments on an earlier version of this manuscript. This project was partly funded and supported by ANSES via the tax on sales of plant protection products. Proceeds from this tax are assigned to ANSES to finance the establishment of the phytopharmacovigilance (PPV) system for monitoring the adverse effects of plant protection products, pursuant to the French Act on the future of agriculture of 13 October 2014.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

1 Network R4P, Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends Plant Sci* **21**:834–853 (2016).
2 Gessler C, Pertot I and Perazzolli M, *Plasmopara viticola:* a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol Mediterr* **50**:3–44 (2011).
3 Fisher N and Meunier B, Re-examination of inhibitor resistance conferred by Qo-site mutations in cytochrome b using yeast as a model system. *Pest Manag Sci* **61**:973–978 (2005).
4 Dreinert A, Wolf A, Mentzel T, Meunier B and Fehr M, The cytochrome bc1 complex inhibitor Ametoctradin has an unusual binding mode. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1859**:567–576 (2018).
5 Esser L, Quinn B, Li Y-F, Zhang M, Elberry M, Yu L *et al.*, Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc1 complex. *J Mol Biol* **341**:281–302 (2004).
6 McDonald BA and Linde C, Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* **40**:349–379 (2002).
7 Leroux P and Clerjeau M, Resistance of *Botrytis cinerea* Pers and *Plasmopara viticola* (Berk and Curt) Berl and Detoni to fungicides in French vineyards. *Crop Prot* **4**:137–160 (1985).
8 Genet JL and Vincent O, Sensitivity of European *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *Pest Manag Sci* **55**:129–136 (1999).
9 Blum M, Waldner M and Gisi U, A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genet Biol* **47**:499–510 (2010).
10 Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A and Gisi U, Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci* **62**:465–472 (2006).
11 Lambowitz A, Sabourin J, Bertrand H, Nickels R and McIntosh L, Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol* **9**:1362–1364 (1989).
12 Fernández-Ortuño D, Torés JA, De Vicente A and Pérez-García A, Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int Microbiol* **11**:1–9 (2008).
13 Wood PM and Hollomon DW, A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Manag Sci* **59**:499–511 (2003).
14 Panon M, Steva H, Debuisson S and Descotes A, Efficacité au vignoble de plusieurs préparations fongicides en présence de différents pourcentages de phénotypes résistants AOX de *Plasmopara viticola*. *12ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes*. Tours, France, AFPP (2018).
15 Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C and Corio-Costet MF, At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Appl Environ Microbiol* **73**:5162–5172 (2007).
16 Micoud A, Remuson F, Le Guellec M and Grosman J, La résistance de *Plasmopara viticola* aux fongicides – Résultats des plans de surveillance de la DGAL-SDQPV en 2012 et 2014. *11ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes*. Tours, France, AFPP (2015).

 © 2019 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

17 Dufour MC, Fontaine S, Montarry J and Corio-Costet MF, Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci* **67**:60–69 (2011).
18 Bates D, Mächler M, Bolker B and Walker S, Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:14065823* https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01 (2014).
19 Barrès B, DownyMildewResist: Supporting data and code for: Investigation on the sensitivity of *Plasmopara viticola* to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools. DOI:10.5281/zenodo.2845404 (2019).
20 Fehr M, Wolf A and Stammler G, Binding of the respiratory chain inhibitor ametoctradin to the mitochondrial bc1 complex. *Pest Manag Sci* **72**:591–602 (2015).
21 Cherrad S, Hernandez C, Steva H and Vacher S, Résistance de *Plasmopara viticola* aux inhibiteurs du complexe III : un point sur la caractérisation phénotypique et génotypique des souches. *12ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes*. Tours, France, AFPP (2018).
22 Mounkoro P, Michel T, Benhachemi R, Surpateanu G, Iorga BI, Fisher N *et al.*, Mitochondrial complex III Qi-site inhibitor resistance mutations found in laboratory selected mutants and field isolates. *Pest Manag Sci* (2019). https://doi.org/10.1002/ps.5264.
23 Tollenaere C, Susi H, Nokso-Koivisto J, Koskinen P, Tack A, Auvinen P *et al.*, SNP design from 454 sequencing of *Podosphaera plantaginis* transcriptome reveals a genetically diverse pathogen metapopulation with high levels of mixed-genotype infection. *PLoS One* **7**:e52492 (2012).
24 Lopez-Villavicencio M, Jonot O, Coantic A, Hood ME, Enjalbert J and Giraud T, Multiple infections by the anther smut pathogen are frequent and involve related strains. *PLoS Pathog* **3**:e176 (2007).
25 Barr CM, Neiman M and Taylor DR, Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol* **168**:39–50 (2005).
26 Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F and Deising HB, Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. *J Plant Dis Prot* **113**:259–266 (2006).
27 Villani SM and Cox KD, Heteroplasmy of the cytochrome *b* gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. *Phytopathology* **104**:945–953 (2014).
28 Vielba-Fernandez A, Bellón-Gómez D, Tores JA, de Vicente A, Perez-Garcia A and Fernandez-Ortuno D, Heteroplasmy for the cytochrome b gene in *Podosphaera xanthii* and its role in resistance to QoI fungicides in Spain. *Plant Dis* **102**:1599–1605 (2018).
29 Ishii H, QoI fungicide resistance: current status and the problems associated with DNA-based monitoring, in *Recent Developments in Management of Plant Diseases*. New York, Springer, pp. 37–45 (2010).
30 Ishii H, Fountaine J, Chung WH, Kansako M, Nishimura K, Takahashi K *et al.*, Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag Sci* **65**:916–922 (2009).
31 Genet JL, Jaworska G and Deparis F, Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pest Manag Sci* **62**:188–194 (2006).
32 Ziogas BN, Baldwin BC and Young JE, Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to Azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pest Manag Sci* **50**:28–34 (1997).
33 Kunz S, Lutz B, Deising H and Mendgen K, Assessment of sensitivities to Anilinopyrimidine- and Strobilurin-fungicides in populations of the apple scab fungus *Venturia inaequalis*. *J Phytopathol* **46**:231–238 (1998).
34 Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U, Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag Sci* **56**:833–841 (2000).
35 Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A *et al.*, Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1442**:161–169 (1998).
36 Miguez M, Reeve C, Wood PM and Hollomon DW, Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QoI fungicides. *Pest Manag Sci* **60**:3–7 (2004).

 © 2019 Society of Chemical Industry

15264998, 2019, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.5461 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [07/11/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2. Quelles sont les contributions des connaissances issues de la caractérisation des mécanismes sous- jacents aux phénomènes de résistance aux PPP pour la mise en œuvre de mesures de gestion ?

Caractériser le(s) mécanisme(s) de résistance présent(s) chez un bioagresseur permet, entre autres, de déterminer le niveau de la résistance, le support génétique du caractère résistant, la dominance ou la récessivité de la résistance, d'identifier son caractère mono ou polygénique ou l'existence de résistances croisées…. Dans cette perspective, l'intégration d'approches génotypiques aux approches phénotypiques est indispensable. Cette caractérisation permet d'apporter des connaissances utiles pour apprécier le risque inhérent au mécanisme de résistance et élaborer des mesures de gestion adaptées.

Les travaux présentés dans ce chapitre illustrent l'intérêt de combiner les approches génotypiques et phénotypiques pour l'étude des mécanismes de résistances aux PPP chez un modèle de choix tant d'un point vue agronomique que d'un point de vue plus fondamental, *M. persicae*. Cette espèce de puceron est extrêmement polyphage et dommageable pour un très grand nombre de cultures. Il est capable de coloniser des espèces du genre *prunus*, principalement le pêcher (*Prunus persicae*), ainsi qu'un très grand nombre de plantes annuelles appartenant à plus de 40 familles botaniques différentes. Son cycle de reproduction est complexe et polymorphe, et dépend des conditions climatiques. Dans les climats tempérés, *M. persicae* a un cycle de vie holocyclique hétéroécique, avec une reproduction sexuée, à l'automne sur des arbres du genre *Prunus* (principalement pêcher), et nombreux cycles de reproduction asexuée par parthénogénèse sur des hôtes herbacés du printemps jusqu'à l'automne. Dans les régions tropicales et sub-tropicales, seule une reproduction asexuée (anaholocyclique) peut exister (Blackman, 1974 ; Margaritopoulos et al, 2002). Vecteur de très nombreuses viroses préjudiciables économiquement, son caractère généraliste en fait un ravageur extrêmement problématique dans de nombreuses filières agricoles. Il est, par exemple, responsable de la vection du virus de la sharka en culture de pêchers et des différents virus de la jaunisse chez la betterave. La lutte contre ce puceron repose très majoritairement sur l'utilisation d'insecticides de synthèse. Or, *M. persicae,* est une espèce qui a évolué des résistances à de nombreuses familles d'insecticides (Figure 23) impliquant divers mécanismes tels que la surexpression d'enzymes de détoxication, des résistances liées à la cible (mutation ou surexpression), ou une moindre pénétration de la molécule létale (Bass et al, 2014). Selon le mécanisme, l'efficacité d'un seul ou de plusieurs modes d'action peuvent être compromis.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

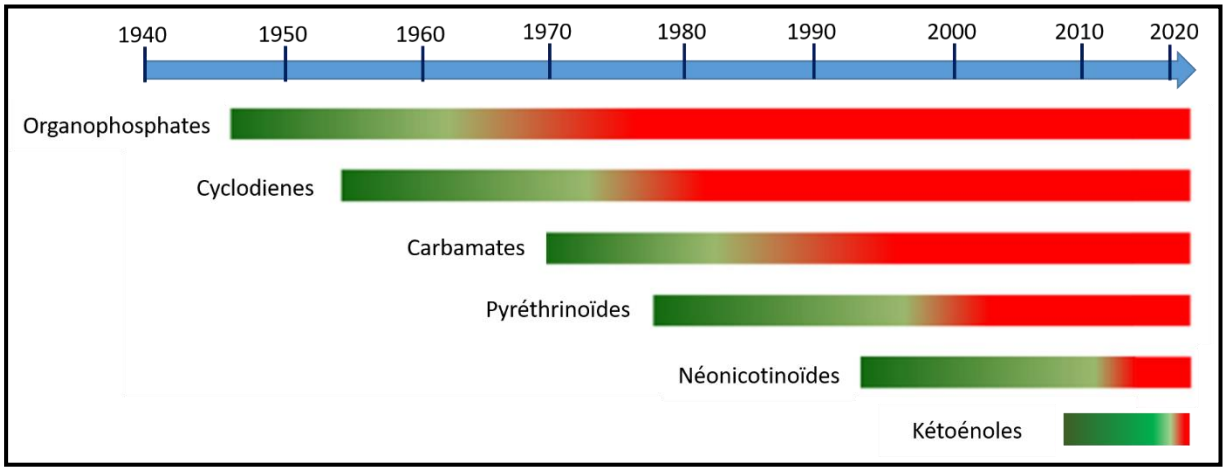


Figure 23 : Chronologie de l'évolution des résistances aux différentes familles d'insecticides chez *M. persicae*. Les gradients de couleur allant du vert au rouge indiquent le passage des années d'utilisation sans signalement de résistance vers le développement de la résistance au champ. (Figure adaptée de Bass et al, 2014).

M. persicae est un modèle biologique suivi sur diverses cultures, depuis de nombreuses années, dans le cadre des plans de surveillance de la DGAL. C'est également l'un des modèles biologiques sur lequel portent les travaux de recherche de l'USC CASPER. Au cours des quinze dernières années, j'ai travaillé régulièrement sur cette espèce et sur les mécanismes à la base des résistances qu'elle développe vis-à-vis de diverses familles d'insecticides. Parmi les travaux que j'ai menés, j'ai choisi de présenter deux publications portant sur la caractérisation de deux mécanismes de résistance de cible.

La première publication, parue dans "Pest management Science" (Fontaine et al., 2011), présente des résultats de génotypages de marqueurs de résistance aux pyréthrinoïdes et aux carbamates. Ce travail a permis :

- de caractériser une nouvelle mutation (M918L) affectant le canal sodium et responsable d'un fort niveau de résistance à la lamba-cyalothrine, un pyréthrinoïde ;
- d'identifier la présence d'un génotype combinant une résistance de cible aux carbamates et aux pyréthrinoïdes dans les populations de *M. persicae* en culture colza ;
- de constater d'importants changements dans la fréquence des allèles de résistance aux insecticides de la famille des carbamates et des pyréthrinoïdes dans les populations vivant sur colza en moins d'une dizaine d'années.

La surveillance des résistances de cible aux pyréthrinoïdes et aux carbamates chez *M. persicae* en culture de colza a été par la suite poursuivie et à l'origine d'une autre publication (Roy et al., 2013) dont j'étais co-autrice. Cette publication visait à comprendre l'évolution des fréquences des génotypes résistants aux insecticides en culture de colza au cours des années 2000 à l'aide d'approches de génotypage de marqueurs sélectionnés et neutres.

Le second article, publié dans "Journal of Economic Entomology", pour lequel je suis co-autrice (Mottet et al, 2016) concerne la résistance aux néonicotinoïdes en vue de déterminer le niveau de dominance de la mutation R81T affectant la sous-unité *β1* des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR). Cette mutation est impliquée dans la

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

résistance aux néonicotinoïdes et est très répandue dans les populations de *M. persicae* vivant dans les cultures de pêchers du sud de l'Europe. Ce travail a permis de montrer :

- l'existence d'une résistance croisée entre les deux substances néonicotinoïdes testées, imidaclopride and thiaclopride, chez les lignées porteuses de la mutation R81T ;
- le caractère semi-récessif de l'allèle 81T ;
- un fort niveau de résistance aux deux néonicotinoïdes chez les individus homozygotes pour R81T et une grande diversité de sensibilité chez les individus hétérozygotes et dans une moindre mesure chez les homozygotes non mutés.

Ce travail de caractérisation de la résistance de cible aux néonicotinoïdes a été par la suite complété par une étude, à laquelle j'étais également associée, visant à évaluer la contribution respective aux phénotypes résistants des deux principaux mécanismes impliqués dans la résistance aux néonicotinoïdes : la mutation de la cible (R81T) et la surexpression de deux cytochromes P450 (Mottet et al, 2024).

L'ensemble de ces travaux a également participé à la constitution d'une collection d'une vingtaine de clones, maintenus en élevage dans l'unité CASPER, représentatifs de la diversité des génotypes présente dans le paysage agricole français. Ils ont participé à dresser une cartographie des résistances et à une meilleure compréhension des mécanismes qui ont évolué chez cette espèce polyphage dans des différentes cultures hôtes. Ils illustrent également la vitesse à laquelle une résistance peut évoluer chez certaines espèces de bioagresseurs puisque la fréquence des *M. persicae* combinant des allèles de résistance aux pyréthrinoïdes et aux carbamates a rapidement évolué dans les populations vivant en culture colza après la commercialisation d'un produit associant deux substances actives appartenant à chacune des familles d'insecticides.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2.1. Premier article : Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops

Spotlight

SCI

Received: 28 January 2011 Revised: 28 April 2011 Accepted: 3 May 2011 Published online in Wiley Online Library: 27 June 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.2224

Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops

Séverine Fontaine,* Laëtitia Caddoux, Christine Brazier, Corentin Bertho, Paul Bertolla, Annie Micoud and Lise Roy

Abstract

Within the framework of a molecular exploration of target resistance in populations of *Myzus persicae* on oilseed rapes in France, (1) the S431F mutation (coding gene *ace2*), although previously reckoned to be rare, revealed to be frequent, (2) M918L (phenotypically characterised) and L932F (both on *para*) were found for the first time in *M. persicae*, and (3) a linkage was revealed between M918L and S431F. While until recently populations developing on French oilseed rapes were dominated by genotypes possessing pyrethroid target resistance and esterase overproduction, to date a different type of dominating genotype, equipped with carbamate and pyrethroid target resistance, seems to be invading such fields.
© 2011 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: target resistance; *Myzus persicae*; oilseed rape; carbamates; pyrethroids

1 INTRODUCTION

The green peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), is an important hemipteran pest on a wide range of agricultural and horticultural crops, responsible for direct damage (feeding punctures) and, more importantly, indirect damage (transmission of various phytopathogenic viruses). Many European crops can be infested to *M. persicae* (peach, potato, pepper and oilseed rapes, among others). In France, oilseed rape crops may be affected by this aphid species during autumn.

The repeated use of insecticides is known to select for insects that are resistant against active compounds. Overall, as known for most pest arthropods, in *M. persicae* the two most frequently reported mechanisms against organophosphates, carbamates and pyrethroids are metabolic and target resistance. The former is generated by the overproduction of detoxification enzymes, whereas the latter consists of a structural modification of the target protein, thereby decreasing its sensitivity to the inhibitory effect of the insecticide. In the latter, one or more non-silent mutations on cDNA induce the persistence of the protein function in the presence of insecticide concentrations much higher than concentrations that would induce the death of sensitive individuals.

The molecular mechanisms underlying desensitisation to insecticides is the focus of the present study. As the control of *M. persicae* in oilseed rape has over the last decade mainly been achieved with pirimicarb (a carbamate compound), lambda-cyhalothrin and deltamethrin (pyrethroids) or combinations thereof, only mutations on genes targeted by carbamates and pyrethroids are considered here. Carbamates target acetylcholinesterase (AChE), an enzyme encoded in many insects, including *M. persicae*, by two different genes of which one is paralogous and the other is orthologous to the *Drosophila* unique *ace* gene.[1] In *M.* persicae,[2] a serine-to-phenylalanine mutation (S431F) on *ace2* (paralogous to *Drosophila ace*) is known to render AChE insensitive to carbamates. This mutation is named *Mace* (modified acetylcholinesterase). With respect to target resistance against pyrethroids, two resistant phenotypes were initially discovered in the 1950s in the housefly and named kdr (for knockdown resistance) and super-kdr, and later linked to mutations in the *para*-orthologous sodium channel genes.[3,4] These mutations (L1014F and M918T, as well as a few others) were subsequently isolated in a variety of other arthropod species, including *M. persicae* (L1014F,[5] M918T[6]). In most insect species, including *M. persicae*, the M918T mutation is consistently detected in the presence of L1014F, never as a single polymorphism, although *in vitro* this mutation has been able to induce target resistance by itself.[3,4]

The aim of the present study is to establish an overview of the frequency and possible associations between non-silent mutations on genes *ace2* and *para* in French *M. persicae* populations sampled on oilseed rape, and to investigate the links between these mutations and resistance. This investigation, which was initiated by field reports, is the first part of a monitoring study, the aim of which, in the long term, is to provide information on the current geographical distribution and frequency of well-known resistance mechanisms in *M. persicae* populations living on oilseed rapes in France.

* *Correspondence to: Séverine Fontaine, Anses Lyon – Unité résistance aux produits phytosanitaires, 31 av. Tony Garnier, 69364 Lyon, Cedex 07, France. E-mail: severine.fontaine@anses.fr*

Anses Lyon – Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires, Lyon, France

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 1. Resistance genotypes isolated among individuals of *Myzus persicae* collected in French oilseed rape fields in 2009. An asterisk follows labels of reference clones; labels without an asterisk represent field isolates. Gen1 = S431F^{-}, L1014F^{ss}, M918L^{ss}, L932F^{ss}; Gen2 = S431F^{+}, L1014F^{ss}, M918L^{sr}, L932F^{ss}; Gen3 = S431F^{-}, L1014F^{sr}, M918L^{ss}, L932F^{sr}; Gen4 = S431F^{+}, L1014F^{sr}, M918L^{ss}, L932F^{ss}

Isolate/reference clone label	French administrative area or country	Date of sampling	Number of individuals under test	Number of individuals each possessing identified resistance genotype				
				Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Other resistance genotypes
09–305	Champagne-Ardennes	2/10/09	4	0	**1**	**3**	0	0
09–312	Burgundy	6/10/09	13	0	**8**	**5**	0	0
09–313	Burgundy	6/10/09	4	0	**2**	**2**	0	0
09–378	Lorraine	7/10/09	2	0	0	**2**	0	0
09–384	Franche-Comté	19/10/09	3	0	**3**	0	0	0
09–390	Picardie	19/10/09	4	0	**4**	0	0	0
09–393	North	19/10/09	4	0	**4**	0	0	0
09–396	Burgundy	19/10/09	4	0	**4**	0	0	0
09–400	Burgundy	6/10/09	3	0	**3**	0	0	0
09–401	Ile-de-France	28/10/09	5	0	**1**	**4**	0	0
10-Ssyma*	Rhône-Alpes	7/10/10	3	0	**3**	0	0	0
10-Ssymb*	Rhône-Alpes	7/10/10	3	0	**3**	0	0	0
09-MpL06*	Rhône-Alpes	5/9/11	2	0	0	0	**2**	0
00–4106A*	Scotland	1/8/00	2	**2**	0	0	0	0
10–384c*	Franche-Comté	30/7/10	3	0	**3**	0	0	0

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Biological material

2.1.1 *Field sampling*

Myzus persicae populations were collected during autumn 2009 in oilseed rape fields located in north-eastern France. Ten populations were sampled in France from seven administrative geographical areas (cf. supporting information SI-1). In each field, about 30 different leaves each bearing some aphids were selected. From each isolate, depending on its size, 8–40 parthenogenetic females or L4 nymphs were randomly sampled (Table 1) and stored at −20 °C in individual vials. In addition, in some cases, remaining individuals from field isolates were maintained on excised leaves of oilseed rape or Chinese cabbage in a controlled environment room at 20–25 °C with a 16 : 8 light : dark photoperiod for subsequent molecular analyses. A few females from these isolates were then isolated and allowed to reproduce as a clonal parthenogenetic colony. Colony members were then individually characterised in bioassays according to identified resistance genotypes.

2.1.2 *Aphid reference clones*

Two aphid clones, labelled 1X and 13HH, were graciously provided by Emmanuele Mazzoni (Facoltà di Agraria, Istituto di Entomologia e patologia vegetale, Piacenza, Italy) and used as references in AS-PCR analyses (see below and supporting information SI-2). They represent a drug-sensitive reference and a Mace positive reference respectively. Moreover, four different living clones were reared for comparisons in bioassays and/or biochemical assays, namely 4106A, a fully drug-sensitive reference clone, 4916A, a clone overproducing carboxylesterases (R3 level) (both were kindly provided by Diana Cox, Rothamsted Research, Harpenden, UK), SSymA and 384c, both stemming from oilseed rape field isolates (Rhône Alpes and Franche-Comté respectively). Lastly, clone MpL06, sampled on peppers in a greenhouse in Rhône-Alpes, was kindly provided by Yvan Rahbé (laboratoire BF2I, INRA – INSA, Lyon, France).

2.2 Molecular analysis

DNA from single individuals of *M. persicae* was extracted and purified using Nucleospin Tissue DNA extraction kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's recommendations.

Mutations on the *para*-orthologous sodium channel gene were detected by sequencing an 578 bp PCR fragment of *para* gene (primer pair kdr-F1 and kdr-R4).[7] This fragment encompasses domain II S4–S6 and covers the positions of all amino acid mutations, with the exception of M827I mutation, according to Davies *et al.*[4] Sequencing analysis was achieved by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) with a 3730 XL genetic analyser (Applied Biosystems). Sequencing was performed directly on PCR products and in most but not all cases on both strands. For sequencing analysis, the 20 bp at 5′ and 56 bp at 3′ of the files were discarded, resulting in an alignment of 502 bp fragments. The presence of the Mace mutation in the *ace2* gene was assessed by allele-specific PCR (AS-PCR), as described in supporting information SI-2. Additionally, sequencing of the *ace2* fragment was performed using AChE-F2 and AChE-R3[7] in some clone in order to estimate the zygosity of S431F.

2.3 Bioassays

Aphids were bioassayed in 4.5 cm diameter plastic boxes using 1–3 replicates per concentration and per independent assay. Leaf discs were introduced into plastic boxes containing agar solution (15 g L^{-1}; 10 mL). A total of 12–14 apterous parthenogenetic females were transferred to each leaf disc the day before the test. Stage status and living condition were checked prior to spraying, and every L4 introduced by mistake, as well as dead individuals, were discarded. Leaves with installed aphids were sprayed with serial dilutions of the insecticide employing a Potter-modified Burgerjon tower. Two commercial products were tested separately: Karaté® Zeon (lambda-cyhalothrin) and Pirimor® G (pirimicarb). Insecticides were applied at 4.0 mg cm^{-2} ± 0.2 mg solution on leaf discs (solutions based on the following use concentrations:

 © 2011 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 2. Bioassay results. Mean values obtained from 1–3 independent assays (*n*), each including 1–3 replicates per clone, with Karaté® Zéon (lambda-cyhalothrin 98.5%). UC = 7.5 mg L^{-1} lambda-cyhalothrin, na = not assayed. Per clone, only assays with >75% living individuals in controls were retained

	Percentage of living aphids after 48 h exposure to Karaté® Zéon					
		Abbott-corrected percentage				
	Percentage control	UC/16	UC/4	UC	4 × UC	16 × UC
4106A	95 ($n = 3$)	22 ($n = 1$)	4 ($n = 1$)	0 ($n = 2$)	0 ($n = 2$)	0 ($n = 2$)
384c	83 ($n = 4$)	75 ($n = 1$)	95 ($n = 1$)	82 ($n = 3$)	63 ($n = 2$)	71 ($n = 3$)
SSymA	100 ($n = 1$)	na	na	77 ($n = 1$)	100 ($n = 1$)	77 ($n = 1$)

7.5 mg L^{-1} for lambda-cyhalothrin and 250 mg L^{-1} for pirimicarb), and mortality was scored after 48 h. LC_{50} values were established using Priprobit software.

2.4 Biochemical assays

In order to check the esterase status associated with some particular genotype, some microplate esterase assays were performed following Devonshire *et al.*[8] The total protein content was measured using Pierce® BCA protein assay kit (Thermo Scientific), following the manufacturer's recommendations.

3 RESULTS

Among the 47 individual aphids tested (representative of ten different French field isolates, located in seven different administrative areas) (see supporting information SI-1), only non-silent nucleic substitutions were detected in the *para* DNA fragment, and no more than 3, respectively at positions Met918, Leu932 and Leu1014. The mutations corresponding to S431F on *ace2* and M918L on *para* were both detected in 31 aphids (66%), whereas the mutation corresponding to residue L1014F was detected only in the absence of these two mutations in each of the 16 remaining aphids (34%) (Table 1). On the amino acid level, the Mace (S431F) and kdr (L1014F) mutations were common, whereas the mutation detected at the s-kdr position was not the common form M918T, but M918L (caused by an A/T nucleic substitution, EMBL accession number FR774834). This mutation has previously been observed[9,10] in *Aphis gossypii* (Glover, 1877) and has thus far not been described in *M. persicae*.

Additionally, a second polymorphism on the sequenced fragment of the *para* gene in individuals possessing L1014F kdr mutation was detected at position 932 (G/T, EMBL accession number FR774835), causing an L932F amino acid substitution, which has previously been described in a louse.[11]

All detected mutations on the *para*-orthologous sodium channel gene were heterozygous. Sequencing of the *ace2* fragment of focused clone 384c revealed that mutation S431F is heterozygous in this clone. The zygosity of the S431F mutation remains unknown for other clones/populations under test. Taking into account available information on zygosity (two different states for S431F: +, −; three different states for L1014F, M918L and L932F: ss, rs, rr), 54 different resistance genotype combinations of the detected *ace2* and *para* non-silent mutations are possible. In the remaining text, four of them are referred to as follows: Gen1 = $S431F^{-}$, $L1014F^{ss}$, $M918L^{ss}$, $L932F^{ss}$; Gen2 = $S431F^{+}$, $L1014F^{ss}$, $M918L^{sr}$, $L932F^{ss}$; Gen3 = $S431F^{-}$, $L1014F^{sr}$, $M918L^{ss}$, $L932F^{sr}$; Gen4 = $S431F^{+}$, $L1014F^{sr}$, $M918L^{ss}$, $L932F^{ss}$. Gen1 is the fully sensitive genotype, Gen2 and Gen3 are the only genotypes that have been identified across the present study on oilseed rapes and Gen4 was encountered in the only French field isolate not originating from oilseed rape (Table 1).

As for bioassays, the focus was upon clones 384c and SSymA, which possess the Gen2 genotype ($S431F^{+}$ and $M918L^{sr}$), as a tentative investigation in order to estimate whether M918L mutation might induce pyrethroid resistance in the absence of L1014F. The percentage of surviving individuals based on the field use concentration (UC) of Karaté® Zéon (7.5 mg L^{-1} lambda-cyhalothrin) is provided in Table 2. Priprobit calculations as applied to multiassayed clones 384c and 4106A result in estimated LD_{50} values of 237.61 mg L^{-1} (166.53–336.46) and 3.07×10^{-2} (3.29×10^{-6}–2.47×10^{-1}) respectively, and this is consistent with results obtained from every independent assay in the present study: LD_{50} appears in all cases to be >120 mg L^{-1} in 384c and SSymA (Gen2) and <0.47 mg L^{-1} in 4106A (Gen1). In assays using Pirimor® G, as expected according to published data, a roughly comparable gap between the upper and lower limits of lethal doses of 4106A on the one hand and 384c and SSymA on the other hand was noted (data not shown).

Finally, mean ratios R/S of esterase activity per milligram of proteins obtained from microplate esterase assays on clone 384c using 4106A as a sensitive reference and 4916A as an R3 resistant reference revealed a much lower esterase overproduction in 384c than in the R3 reference clone 4916A: 2.34 ± 0.88 for 384c versus 4106A and 9.52 ± 0.62 for 4916A versus 4106A (three independent microplate assays, each including two replicates per clone).

4 DISCUSSION

Compared with the 2.1% frequency value of individuals possessing the mutation S431F (multilocus microsatellite genotypes G1, G12, G15) in *M. persicae* populations, as recorded by Zamoum *et al.*,[12] among isolates sampled on oilseed rapes in 2001 in seven different French administrative areas, the dataset presented here suggests that, during the past decade, an outbreak of S431F mutation on the *ace2* gene has occurred (66% of the 47 individuals tested, which originate from seven different areas, four of which are common to Zamoum *et al.*'s study).

Moreover, strong linkage disequilibrium appears between the S431F Mace mutation and the M918L s-kdr mutation on the one hand and between the L1014F kdr mutation and the 'louse' L932F mutation on the other hand. Given that 54 different resistance genotype combinations of detected mutations are possible (see above), the fact that only two different combinations (Gen2 and Gen3) have been detected in the present study in populations living on oilseed rapes suggests either that a few parthenogenetic

 © 2011 Society of Chemical Industry

15264998, 2011, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2224 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [10/03/2025]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

clones have spread through France on oilseed rape and/or that particular selective pressures have occurred during the last few years. And yet, clone MpL06, which offered the opportunity to observe an *M. persicae* resistance genotype in a population not originating from oilseed rape, provided a different combination (Gen4).

In contrast to the common M918T s-kdr mutation, which is never found in the absence of the L1014F kdr mutation (in insects in general,[3] and in *M. persicae* in particular[13]), the present M918L mutation occurs as a single amino acid substitution in *A. gossypii* (Genbank accession number AF412815).[9] Here, it is shown that it is also present as a single SNP on the *para* fragment under test in *M. persicae* and confers resistance against lambda-cyhalothrin. Carletto *et al.*[14] have shown a probable link between resistance to pyrethroids and the mutation M918L in *A. gossypii*. Nevertheless, these authors did not search for any mutation at position 1014. As a result, it was not certain whether observed higher LD_{50} in the clone possessing M918L mutation was due to this mutation alone or, partly or totally, to any mutation at position 1014 (or elsewhere). In the present study, the association of M918L with a markedly resistant phenotype in the absence of any previously identified target mutation strongly argues in favour of the former hypothesis, at least in *M. persicae*. Indeed, given that only a ca 5–15-fold resistance to deltamethrine is conferred by R3 levels of esterase in *M.* persicae,[15] the largest gap (>256-fold) between LD_{50} in clone 4106A (Gen1) and in clones 384c and SSymA (Gen2) may not be solely due to carboxylesterase overproduction. Moreover, the fully characterised Gen2 clone 384c has a carboxylesterase production much lower than a R3 level. This strengthens the major role of M918L in the high resistance against pyrethroids associated with Gen2. Interestingly, the shift from hydrophobic methionine to an aliphatic hydrophobic amino acid at position 918 instead of a hydrophilic one such as threonine, in the absence of any change at the Leu1014 position, and associated with a high resistance level, had already been noted in *Bemisia tabaci*, with a methionine to valine mutation.[16] This illustrates the importance of this amino acid position in the interaction between pyrethroid and its receptor, already established in expression assays with M918T.[17,18] The interpretation proposed by Lee *et al.*[18] is that L1014F counteracts a functional deficiency caused by the super-kdr point mutation M918T, which is probably not viable when present alone. Present results consolidate this interpretation. The viability of M918V/L alone is likely linked with the non-polar nature of the new amino acids.

With respect to the L932F substitution, it is known to play a role in the resistance of lice to permethrin in association with another mutation,[11,19,20] although it appears to reduce but not eliminate permethrin sensitivity when expressed alone.[21] This substitution was detected in individuals possessing the Gen3 resistance genotype, i.e. including L1014F, which is known to induce the kdr resistance phenotype. What resistance phenotype can generate the combination of L1014F and L932F? Unfortunately, no bioassay has been performed on any of the Gen3 clones in the present study because the rare Gen3 clones isolated in the lab failed to survive.

In conclusion, the frequency of target mutation S431F on *ace2*, the gene known to be responsible for resistance to carbamate in French populations of *M. persicae* on oilseed rape, appears to have conspicuously increased during the last decade. Moreover, mutation M918L on *para* in the form of a single SNP and present in association with S431F (Gen2) was shown to be responsible for a strongly increased tolerance to pyrethroids. Although it is known that parthenogenesis allows aphids rapidly to develop favourable genotypes, the specific causes of the observed expansion of this resistance genotype during the last decade remain unclear. Further population screening is needed to assess the spread of these mutations in aphid populations on oilseed rape in France and their overall impact on efficiency of carbamates and pyrethroids. Characterising the resistance phenotype associated with the uncommon combination L1014F + L932F is a major challenge and requires that living Gen3 aphid clones be actively sought. Finally, functional explorations employing expression of variants produced by site-directed mutagenesis with a diversity of combinations of *para* mutations L932F, M928L and L1014F would very likely provide fundamental information on the molecular functioning of target resistance against pyrethroids in insects.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are deeply grateful to Y Ballanger (CETIOM) and to O Mangenot, E Bonnin, J Collet, E Courbet, T Durand, B Oste and L Warangot for supplying field aphid samples, and to E Mazzoni (Piacenza, Italy), D Cox (Harpenden, UK) and Y Rahbé (Lyon, France) for providing reference aphid clones. They also thank T Buronfosse for valuable advice and C Mottet for technical help.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

1 Fournier D, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact* **157**:257–261 (2005).
2 Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T and Kono Y, An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem Biophys Res Commun* **307**:15–22 (2003).
3 Soderlund DM and Knipple DC, The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **33**:563–77 (2003).
4 Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR and Williamson MS, DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* **59**:151–162 (2007).
5 Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Williamson MS and Devonshire AL, A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and insecticides in the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Mol Biol* **8**:339–346 (1999).
6 Anstead JA, Williamson MS, Eleftherianos I and Denholm I, High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochem Mol Biol* **34**:871–877 (2004).
7 Cassanelli S, Cerchiari B, Giannini S, Bizzaro D, Mazzoni E and Manicardi GC, 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 (2005).
8 Devonshire AL, Devine GJ and Moores GD, Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* **82**:459–463 (1992).
9 Yang X and Williamson MS, A new super-kdr mutation is associated with resistance to pyrethroid insecticides in cotton aphid, *Aphis gossypii*. GenBank accession no. AF412815, NIH genetic sequence database at NCBI (2001).
10 Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR and Williamson MS, A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol* **16**:243–252 (2007).

 © 2011 Society of Chemical Industry

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

15264998, 2011, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2224 by Laboratoire De Rougeres, Wiley Online Library on [10/03/2025]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

11 Gao JR, Yoon KS, Lee SH, Takano-Lee LM, Edman JD, Meinking TL, *et al*, Increased frequency of the T929I and L932F mutations associated with knockdown resistance in permethrin-resistant populations of the human head louse, *Pediculus capitis*, from California, Florida, and Texas. *Pestic Biochem Physiol* **77**:115–124 (2003).
12 Zamoum T, Simon JC, Crochard D, Ballanger Y, Lapchin L, Vanlerberghe-Masutti F, *et al*, Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*? *Heredity* **94**:630–639 (2005).
13 Eleftherianos I, Foster SP, Williamson MS and Denholm I, Characterization of the M918T sodium channel gene mutation associated with strong resistance to pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Bull Entomol Res* **98**:183–191 (2008).
14 Carletto J, Martin T, Vanlerberghe-Masutti F and Brévault T, Insecticide resistance traits differ among and within host races in *Aphis gossypii*. *Pest Manag Sci* **66**:301–307 (2009).
15 Devonshire AL, Field LM, Foster SP, Moores GD, Williamson MS and Blackman RL, The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Phil Trans R Soc Lond B* **353**:1677–1684 (1998).
16 Morin S, Williamson MS, Goodson SJ, Brown JK, Tabashnik BE and Dennehy TJ, Mutations in the *Bemisia tabaci para* sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol* **32**:1781–1791 (2002).
17 Soderlund DM, Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manag Sci* **64**:610–616 (2008).
18 Lee SH, Smith TJ, Knipple DC and Soderlund DM, Mutations in the house fly *Vssc1* sodium channel gene associated with *super-kdr* resistance abolish the pyrethroid sensitivity of Vssc1/tipE sodium channels expressed in *Xenopus oocytes*. *Insect Biochem Mol Biol* **29**:185–194 (1999).
19 Yoon KS, Gao JR, Hyeock Lee S, Clark JM, Brown L and Taplin D, Permethrin-resistant human head lice, *Pediculus capitis*, and their treatment. *Arch Dermatol* **139**:994–1000 (2003).
20 Kristensen M, Identification of sodium channel mutations in human head louse (Anoplura: Pediculidae) from Denmark. *J Med Entomol* **42**:826–829 (2005).
21 Yoon KS, Symington SB, Hyeock Lee S, Soderlund DM and Marshall Clark J, Three mutations identified in the voltage-sensitive sodium channel alpha-subunit gene of permethrin-resistant human head lice reduce the permethrin sensitivity of house fly Vssc1 sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochem Mol Biol* **38**:296–306 (2008).

 © 2011 Society of Chemical Industry

15264998, 2011, 8, Downloaded from https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2224 by Laboratoire De Fougeres, Wiley Online Library on [10/03/2025]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2. Deuxième article : Assessment of the dominance level of the R81T target resistance to two neonicotinoid insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae)

Journal of Economic Entomology Advance Access published August 7, 2016

Journal of Economic Entomology, 2016, 1–8
doi: 10.1093/jee/tow148
Research article

OXFORD

Insecticide Resistance and Resistance Management

Assessment of the Dominance Level of the R81T Target Resistance to Two Neonicotinoid Insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

Claire Mottet,[1,2] Séverine Fontaine,[1] Laëtitia Caddoux,[1] Christine Brazier,[1] Frédérique Mahéo,[4] Jean-Christophe Simon,[4] Annie Micoud,[1] and Lise Roy[3]

[1]ANSES – Laboratoire de Lyon, Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires, 31, avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07, France (claire.mottet@anses.fr; severine.fontaine@anses.fr; laetitia.caddoux@anses.fr; christine.brazier@anses.fr; annie.micoud@anses.fr), [2]Corresponding author, e-mail: claire.mottet@anses.fr, [3]UMR 5175 CEFE Centre d'Ecologie Fonctionnelle et évolutive, Equipe Interactions Biotiques, 1919, Route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France (lise.roy@univ-montp3.fr) and [4]INRA UMR Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP), Domaine de la Motte, 35653 LE RHEU, France (frederique.maheo@rennes.inra.fr; jean-christophe.simon@rennes.inra.fr)

Received 5 February 2016; Accepted 4 June 2016

Abstract

Myzus persicae (Sulzer, 1776), a major crop pest worldwide, displays insecticide resistance to most molecules. The R81T substitution on the β1 subunit of nicotinic receptors of acetylcholine (nAChR) confers target site resistance to neonicotinoids and is widespread in aphid populations colonizing peach tree orchards in Southern Europe. But the impact of this resistance in the field, as well as ways to optimize its management, depends largely on the dominance level of the R81T mutation. In this study, we measured by in vitro assays the response of R81T mutation to two neonicotinoids (imidacloprid and thiacloprid) in 23 *M. persicae* clones with different resistance genotypes in order to assess the dominance status of this allele. In this study, all homozygous clones for the R81T mutation (genotype 81^{TT}) showed a much higher level of resistance to both active substances than other clones. The heterozygous clones 81^{RT} displayed a slightly higher level of resistance than wild homozygous, though resistance phenotypes against both neonicotinoids in these two genotypes were overlapping. A great variation of resistance level was found within these two latter clones' categories. The dominance level of insecticide resistance (D_{LC}) strongly suggested that the mutant allele 81T is semirecessive (the wild 81R allele being rather dominant) for both insecticide molecules under test. Mean D_{LC} values were 0.316 for imidacloprid and 0.351 for thiacloprid. Cross-resistance was shown between imidacloprid and thiacloprid. This partial recessivity is valuable information to broaden the knowledge on neonicotinoid resistance, a prerequisite for devising adapted management strategies against insecticide-resistant populations of *M. persicae*.

Key words: *Myzus persicae*, resistance, neonicotinoid, R81T mutation, dominance level

Downloaded from http://jee.oxfordjournals.org/ by guest on August 11, 2016

Myzus persicae (Sulzer, 1776), the green peach aphid, is an important insect pest that can infest a wide range of cultivated crops and wild plants. This pest causes detrimental economic impact through direct feeding damages, and mostly through the transmission of various phytopathogenic viruses.

Under certain conditions depending on climate and peach tree distribution, *M. persicae* can reproduce both parthenogenetically and sexually, alternating sexual reproduction on peach during late fall with many parthenogenetic generations on peach and other herbaceous species (crops or noncrops) throughout the year (Blackman 1974). Some clonal lineages were found to be geographically widespread (Margaritopoulos et al. 2009) and persist in the agricultural landscape during several years (Fenton et al. 2010).

The intensive use of insecticides to limit infestation has led to the selection of insecticide resistance in *M. persicae* populations. As in most other insect pest species, two major kinds of resistance mechanisms have been identified in this species against commonly used molecules: insecticide target site resistance (induced by structurally altered target proteins, due to one or more amino-acid substitutions) and metabolic resistance (caused by overproduction of detoxification enzymes). Neonicotinoids, one of the most recently developed insecticide families, act as agonists of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), where they mimic the action of the neurotransmitter acetylcholine. Following binding to the nicotinic receptor, nerve impulses are spontaneously discharged at first (depolarization and excitation), followed by failure of the neuron to propagate any

© The Authors 2016. Published by Oxford University Press on behalf of Entomological Society of America.
All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

signal (hyperpolarization and inhibition of excitation; Jones and Sattelle 2010, Dederer 2013). Sustained activation of the receptor results in the inability of acetylcholinesterases to break down the pesticide (Matsuda and Sattelle 2004). Both metabolic (Puinean et al. 2010) and target site (Bass et al. 2011) resistances were found in this aphid species against neonicotinoids. The R81T substitution in the β1 subunit of nAChR in *M. persicae* was the first target site mutation selected by neonicotinoids in the field, while the first one was found in a laboratory-selected strain of the plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Liu et al. 2005). In *M. persicae*, 81T is the only currently known mutation in this target gene, so that only two different cDNA alleles are known to date (wild 81R and mutant 81T). Bass et al. (2011) characterized the resistance phenotype of a clone of *M. persicae* possessing the mutant 81T allele at the homozygous status. Based on spray bioassays, they showed that this homozygous mutant had a 1,679-fold and 225-fold resistance level against imidacloprid and thiamethoxam, respectively. Slater et al. (2012) and Panini et al. (2014) found that the 81T allele was widespread in *M. persicae* populations sampled in peach tree orchards over Southern France, Spain, and in Italy.

Dominance of one allele over another one is the result of interactions between alternative alleles at a specific locus. In the case of complete dominance, the heterozygote phenotype is indistinguishable from that of one of the two homozygous parents, while intermediate levels of dominance result in heterozygote phenotype being more or less close to it (incomplete dominance). Codominance results in the two phenotypes of both homozygote parents being simultaneously expressed in the same offspring organism. In the case of target resistances, Bourguet and Raymond (1998) highlighted that the physiological impacts of target proteins and the insecticide mode of action underpin the relationships between alleles in the phenotypic expression. Especially, they have shown that when an insecticide acts by opening an ion channel, the mutant allele associated with a decreased affinity of the insecticide molecule with the target protein is mostly recessive to semirecessive, the wild allele being dominant. They explained this as follows: the permanent opening of only a few channels is usually sufficient to cause death (e.g. sodium channels). Heterozygous insects which possess 50% of sensitive channels are therefore phenotypically similar to susceptible insects in the presence of insecticide. The impact of target site resistances in the field largely depends on their dominance level: in case of recessive resistant allele, some recommendations may be drawn. Indeed, management strategies for controlling the development of pest resistance, when assuming monogenic resistance, may be mainly based on doses applicable in the field such that all heterozygotes are killed, at least in sexual organisms (Curtis et al. 1978). Bourguet et al. (2000) highlighted that specifically measuring not only the dominance level of insecticide resistance (D_{LC}), but also the effective dominance (D_{LM}) and the dominance of relative fitness in the treated area (D_{WT}), is crucial for adapting pest management strategies to the field situation. D_{LC} is calculated on the position of the mortality curve for heterozygous individuals relative to those for both homozygotes, at a given mortality level (e.g., LC_{50}). D_{LC} measures vary between 0 (complete recessivity) to 1 (complete dominance), with the following standard three intermediate categories defined by Bourguet and Raymond (1998): semirecessive when $0 < D < 0.5$, codominant when $D \approx 0.5$, and semidominant when $0.5 < D < 1$. D_{ML} is estimated as a ratio of the mortality of heterozygous individuals relative to that of both homozygotes at a given insecticide concentration which depends on the doses applied in practical conditions. This ratio allows estimating to what extent heterozygous individuals may be effectively killed in the field. D_{WT} compares the fitness of the heterozygotes to that of the two homozygotes at a given insecticide dose in the presence (D_{WT}) or in the absence (D_{WNT}) of insecticide. Assessing these three traits of resistance dominance requires important and time-consuming bioassays. Yet, stating the first dominance trait (D_{LC}) may represent a useful first step in order to estimate whether further research toward the development of recessive-based resistance management strategies might be feasible. Indeed, in case of full dominance level in the lab, it is likely that no such strategy might be developed to delay insecticide resistance. In order to evaluate whether estimation of D_{ML} and D_{WT} could be helpful for field recommendation, we assessed the dominance level of the mutant allele 81T relative to the wild allele 81R (nAChR beta 1 subunit [Bass et al. 2011]) in multiple clones of *M. persicae*.

It has already been established that R81T substitution can be an effective target resistance and that it is widespread in Southern Europe (Bass et al. 2014). However, to get a complete picture of R81T target resistance, the phenotype(s) associated with each genotype had to be characterized. For that purpose, the resistance could not be explored at the population level, but had to be assessed at the individual level. Our study provides extensive bioassays on synchronized clonal lineages, establishing a direct link between individual genotypes on the 81 position and associated phenotype with regard to neonicotinoid resistance. We measured by in vitro assays the impact of R81T mutation on sensitivity to different neonicotinoids in different homozygous and heterozygous clones. Connecting phenotypes with their associated genotype in numerous clones allowed us to investigate the dominance level associated with this allele, which, to date, no study has done. It also gives insights into the range of levels of resistance to neonicotinoids observed in the three genotypes 81^{RR}, 81^{RT}, and 81^{TT} borne by different clones of *M. persicae*.

Materials and Methods

Biological Material

Parthenogenetic female individuals of *M. persicae* were sampled during spring 2011, 2012, and 2013 in France in peach orchards (Table 1). One aphid individual was collected per leaf and was maintained alive and individually isolated on Chinese cabbage in a controlled environment room at 20–22 °C with a photoperiod of 16:8 (L:D) h. Such a rearing method allowed the reproduction of each aphid as a clonal colony. In addition, three clones were also included in the bioassays as nAChR sensitive references: 4106A, a fully drug-sensitive reference clone; 4916A, a clone overproducing carboxylesterases (R3 level), but devoid of any of the mutations cited above; and 384C, a clone sampled on French oilseed rape in 2010 and carrying both Mace (Modified Acetylcholinesterase, a mutation associated with high-level resistance against carbamates) and M918L (a mutation associated to high-level resistance against pyrethroids), but not R81T (homozygous for the wild-type allele).

In order to check that clones under study had distinct genotypes, one adult of each clone was genotyped using published microsatellite loci following Wilson et al. (2004) and Zamoum et al. (2005).

Artificial Feeding Bioassays

Three weeks before the bioassays, aphids reared on Chinese cabbage plants were transferred to cabbage leaf discs disposed on 12% agar in 4-cm-diameter pillboxes. Each clone was multiplied in pillboxes until enough individuals were produced for the tests.

Downloaded from http://jee.oxfordjournals.org/ by guest on August 11, 2016

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 1. Sampling information and in vitro assay results on 23 field clones and three reference clones treated with imidacloprid or thiacloprid

Clone ID	Field sampling information		nAChR 81	*n*	Slope (±SE)	Imidacloprid LC_{50} (µg liter^{-1}) [95% CL]	Chi-square	df	RL	*n*	Slope (±SE)	Thiacloprid LC_{50} (µg liter^{-1}) [95% CL]	Chi-square	df	RL
4106A (lab clone)	–	–	81^{RR}	3,743	2.75 (0.20)	40.97 [34.62–47.07]	0.0024125	7	-	3,047	4.34 (0.18)	85.9 [75.17–97.44]	0.0002338	5	-
384C (lab clone)	–	–	81^{RR}	244	2.34 (0.34)	42.2 [29.7–54.3]	0.3079251	5	1	808	3.83 (0.24)	154.9 [142.8–168.1]	0.0898813	4	2
4916A (lab clone)	–	–	81^{RR}	1,088	2.21 (0.13)	33.5 [29.6–37.6]	0.1096410	5	1	898	2.99 (0.20)	151.1 [135.38–168.39]	0.0894138	7	2
12-069-004	Peach 2012	Roche de Glun, RA	81^{RR}	715	2.68 (0.24)	67.0 [57.1–76.7]	0.9159961	5	2	954	2.74 (0.16)	511.5 [461.6–566.81]	0.7040088	7	6
11-037-001	Peach 2011	Fossur-Mer, PACA	81^{RR}	466	3.08 (0.29)	199.8 [173.3–228.3]	0.9924539	7	5	636	2.99 (0.22)	876.0 [782.89–976.07]	0.7382860	3	10
13-001-050	Peach 2013	Etoile sur Rhône, RA	81^{RR}	815	3.53 (0.29)	75.7 [68.1–83.9]	0.0672275	5	2	720	5.31 (0.62)	183.6 [165.72–200.94]	0.9687557	4	2
13-001-039	Peach 2013	Etoile sur Rhône, RA	81^{RR}	664	3.79 (0.27)	76.5 [69.8–83.9]	0.6246372	4	2	679	4.22 (0.36)	348.0 [316.78–381.75]	0.2568523	4	4
11-062-016	Peach 2011	Beaucoisin, LR	81^{RR}	463	2.81 (0.27)	177.2 [152.7–208.6]	0.2908136	8	4	771	4.44 (0.38)	761.7 [698.12–826.96]	0.3001455	3	9
11-037-018	Peach 2011	Fos-sur-Mer, PACA	81^{RR}	367	2.45 (0.32)	70.0 [55.8–84.8]	0.8190045	7	2	633	3.48 (0.31)	371.1 [329.88–413.62]	0.6130857	4	4
13-001-032	Peach 2013	Etoile sur Rhône, RA	81^{RT}	1,572	3.60 (0.45)	158.0 [126.53–185.51]	0.0330774	7	4	698	3.93 (0.30)	494.8 [450.08–543.84]	0.7053094	5	6
11-037-012	Peach 2011	Fos-sur-Mer, PACA	81^{RT}	313	2.62 (0.33)	268.9 [216.7–329.6]	0.6349449	6	7	563	3.38 (0.25)	1,217.4 [1,095.6–1,352.7]	0.2578019	4	14
12-067-023	Peach 2012	Loriol, RA	81^{RT}	744	2.51 (0.36)	237.4 [160.3–326.1]	0.0010954	5	6	671	4.11 (0.31)	1,014.4 [928.8–1,106.6]	0.2276186	3	12
12-068-004	Peach 2012	Roche de Glun, RA	81^{RT}	735	2.68 (0.22)	267.0 [234.0–299.9]	0.1578049	3	7	856	2.84 (0.21)	1,198.7 [1,074.4–1,336.2]	0.2777975	6	14
12-068-006	Peach 2012	Roche de Glun, RA	81^{RT}	613	3.73 (0.36)	274.3 [242.2–307.3]	0.2056611	4	7	824	3.85 (0.30)	1,118.9 [1,020.4–1,224.9]	0.6728259	6	13
11-060-015	Peach 2011	Prades, LR	81^{RT}	478	3.77 (0.46)	430.6 [370.9–504.9]	0.9759978	7	11	833	3.40 (0.21)	1,337.4 [1,226.8–1,458.4]	0.9174754	4	16
12-069-001	Peach 2012	Roche de Glun, RA	81^{RT}	810	2.19 (0.16)	378.9 [330.7–429.1]	0.0682904	4	9	793	2.08 (0.22)	1,417.4 [1,223.4–1,685.6]	0.2968596	2	15
11-060-006	Peach 2011	Prades, LR	81^{RT}	767	2.83 (0.23)	275.9 [245.6–309.9]	0.4633737	7	12	732	5.20 (0.40)	1,065.2 [989.13–1,147.1]	0.1781583	4	15
11-060-106	Peach 2011	Prades, LR	81^{RT}	571	3.75 (0.32)	497.5 [448.7–550.9]	0.0844492	3	7	709	3.78 (0.31)	1,282.5 [1,166–1,405.7]	0.0734081	3	12
12-068-003	Peach 2012	Roche de Glun, RA	81^{RT}	889	3.73 (0.26)	534.9 [491.6–580.8]	0.7403031	3	13	555	3.33 (0.26)	1,821.4 [164.9–2,015.1]	0.8640062	3	21
13-001-048	Peach 2013	Etoile sur Rhône, RA	81^{RT}	901	4.36 (0.36)	680.5 [622.44–741.91]	0.1483827	5	17	735	4.04 (0.34)	890.6 [808.59–977.89]	0.7538681	4	10
12-068-005	Peach 2012	Roche de Glun, RA	81^{RT}	682	2.55 (0.19)	727.4 [647.3–816.6]	0.3071127	3	18	1,144	2.85 (0.19)	2,246.5 [2,049.7–2,468.3]	0.2656962	7	26
13-001-041	Peach 2013	Etoile sur Rhône, RA	81^{TT}	735	4.11 (0.70)	6,400 [4,648.7–8,478.1]	0.0033729	4	156	859	3.87 (0.30)	10,431 [9,518.3–11,399]	0.2251085	4	121
11-039-103	Peach 2011	St Félin d'Avall, LR	81^{TT}	268	2.68 (0.31)	8,623.3 [7,193.4–10,358]	0.6624780	4	210	794	3.78 (0.29)	9,322.5 [8,473–10,242]	0.7478353	4	109
11-039-003	Peach 2011	St Félin d'Avall, LR	81^{TT}	265	3.26 (0.38)	9,563.1 [8,139.4–11,311]	0.6224103	4	233	652	2.58 (0.18)	11,359 [10,051–12,891]	0.4109053	5	132
11-039-001	Peach 2011	St Félin d'Avall, LR	81^{TT}	286	2.64 (0.52)	10,212 [6,448–18,441]	0.0336702	4	249	817	4.27 (0.33)	10,106 [9,267.6–11,006]	0.5766367	4	118
13-001-045	Peach 2013	Etoile sur Rhône, RA	81^{TT}	499	2.97 (0.25)	16,908 [15,090–19,026]	0.0281827	2	412	722	2.69 (0.19)	15,410 [13,729–17,400]	0.1154079	5	179

nAChR 81: Genotype of 81 amino-acid residue in the nAChR *β*1 subunit.

n: Number of tested individuals per genotype.

LC_{50}: Lethal concentration resulting in 50% dead or poorly co-ordinated aphids. 95% CL: confidence limits at 95%.

RL: Resistant level = LC_{50} for clone/LC_{50} for 4106A.

PACA: Provence-Alpes-Côte-d'Azur, LR: Languedoc-Roussillon, RA: Rhône-Alpes.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Different protocols have been used for determining the sensitivity of *M. persicae* against neonicotinoids (Foster et al. 2003, Beckingham et al. 2013, Panini et al. 2014). Because of the systemic mode of action of neonicotinoids (Buchholz and Nauen 2002), we selected a bioassay based on controlled insecticide ingestion, which seems more relevant to specifically evaluate the differences in sensitivity in the studied clones. As we used a different method as the aforementioned authors, we could not compare directly our measures with those obtained from earlier studies. We decided to work using only newborn L1 instar larvae, because 1) besides being easier to discriminate from other instars, it permits to work on a more homogenous batch of individuals with same age (responses are thus expected to be more repeatable), and 2) they had no time to feed on plants prior transfer to artificial medium, so were not allowed to get used to feed on plant, thus avoiding any repellent effect of the artificial device. Prior research has shown that some aphids experience poor performance on a given host plant when having previously experienced other food source (e.g., Ramirez and Niemeyer 2000).

The artificial feeding bioassays were adapted from the sachets method developed by Rahbé and Febvay (1993). Between 25 to 35 adult females were placed for 24 h in a PVC ring (4 cm in diameter) covered with two membrane layers of parafilm containing the artificial diet AP3 (provided by G. Febvay and Y. Rahbé). Newborn L1 nymphs (0–24 h old) produced by the females aforementioned were then used to determine the oral toxicity of imidacloprid and thiacloprid. They were transferred to a fresh PVC ring (3 cm in diameter) covered with two membrane layers of parafilm containing the artificial medium amended with insecticide. Two commercial products were tested separately: Confidor (imidacloprid) [Bayer CropScience, Lyon, France] and Calypso (thiacloprid) [Bayer CropScience, Lyon, France]. Commercial products were used instead of technical product (as commonly used in resistance bioassays), because the latter has to be diluted in alcohol, and thus cannot be incorporated into the artificial medium. Artificial diet AP3 was supplied with 5% of a solution of the commercial product with different concentrations of the active substance (imidacloprid or thiacloprid, respectively) so as to obtain final insecticide concentrations ranging from 10 µg liter^{-1} to 40,960 µg liter^{-1} (with an increment of 2 in each dose). For each concentration, two replicates or more, involving at least 15 L1 per replicate, were tested.

To assess Abbott mortality (Abbott 1925), control tests with insecticide-free conditions were carried out in parallel with each tested insecticide. The absolute mortality in both insecticide and control tests was scored 48 h after the transfer to the AP3 medium. Aphids were turned on to their back; those unable to turn back and move after 15 s were scored as dead. Tests were repeated until ca 100 aphids per dose were assayed.

Molecular Analyses

DNA from a single individual of *M. persicae* for each studied clone was extracted and purified using Nucleospin Tissue DNA extraction kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's recommendations.

The R81T mutation in the β1 subunit of nAChR was detected by dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) PCR. A restriction site is created when the allele is nonmutated with a forward primer placed close to the codon 81, one of which bases is not complementary to the sequence. The PCR is followed by an enzyme digestion in order to discriminate the wild-type allele (two fragments of 116 pb and 37 pb) from the mutant allele lacking any restriction site (a single fragment of 153 pb).

PCR were performed in a final volume of 25 µl with 200 µM of dNTPs, 300 µM of each primer (forward primer MpB1F-SmlI: AAAAGAGTCAAATAATGAAATCAAACGTTTGCTTGA—reverse primer MpB1TMR from Slater et al. 2012), 2 mM of $MgCl_2$, 0.1 µg/µl of BSA, 1.5 units of Taq polymerase in the appropriate buffer (Fermentas, Villebon sur Yvette, France), and 1 µl of DNA. The PCR cycle consisted of an initial denaturation phase of 5 min at 94 °C and then 35 cycles including denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and then extension at 72 °C for 30 s. PCR ended with a final extension of 5 min at 72 °C. Digestion of 10 µl of PCR products was performed with 5 units of SmlI enzyme (NEB) at 55 °C overnight. PCR products from a wild individual, a mutant heterozygote, and a mutant homozygote were systematically included as references. Restriction fragments were separated and visualized using QIAxcel (an automated capillary electrophoresis system by Qiagen, Hilden, Germany) with the QIAxcel DNA Screening Kit (alignment marker: 15pb–1 kb, molecular weight marker: 50–800 pb) and method AM420. The sizes of fragments were automatically calculated and exported using the bioCalculator software, which provided a gel view and an electrophoregram of the fragments separation.

Statistics

Aphid mortality was subjected to dose-probit analysis using the Finney equivalent option of PriProbit software (Finney 1971, Finney 1978, Sakuma 1998). This yielded LC_{50} values (concentrations estimated to be lethal to 50% of the clonal population under test). Their 95% confidence limits and the goodness-of-fit χ^2 statistics were also calculated. When the *P*-value associated with the χ^2 was <0.05, the heterogeneity factor H was calculated by the PriProbit software and applied for the calculation of LC_{50} values and their associated confidence limits (as recommended by Raymond [1985]). Resistance levels (RL) were calculated by dividing the LC_{50} of a clonal test population for a particular chemical by the corresponding value for the susceptible reference clone 4106A.

The level of significance of differences among LC_{50} between clones having different nAChR genotypes was measured using nonparametric tests (Kruskal–Wallis analysis of variance by ranks and post-hoc Wilcoxon Mann–Whitney). The dominance level (D_{LC}) was calculated following equation [2] in Bourguet et al. (2000): $D_{LC} = (\log LC_{RS} - \log LC_S)/(\log LC_R - \log LC_S)$.

In order to state whether there is cross resistance associated with the 81^T allele for both imidacloprid and thiacloprid, the Spearman correlation coefficient was calculated to assess association between the LC_{50} of imidacloprid and the LC_{50} of thiacloprid in genotypes carrying the R81T mutation. A *P* value of ≤ 0.05 was considered indicative of a statistically significant correlation.

Results

Twenty-two of the 24 sampled clones (all coming from peach fields) had unique multilocus microsatellite genotypes. Only two (clones 11-060-006 and 11-062-013) had the same multilocus genotype, so likely belonged to the same clonal lineage. To avoid a bias due to the inclusion of the same genotype twice in the study, we kept only one (11-060-006) of these two clones in the bioassays.

The artificial feeding bioassays were carried out on these 23 clonal populations (i.e., possessing various β1 nAChR genotypes) and on three laboratory strains with the wild 81^{RR} nAChR genotype (Table 1). This collection of 23 clones included the three nAChR genotypes, with 6 clones with 81^{RR}, 12 with 81^{RT}, and 5 with 81^{TT}.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

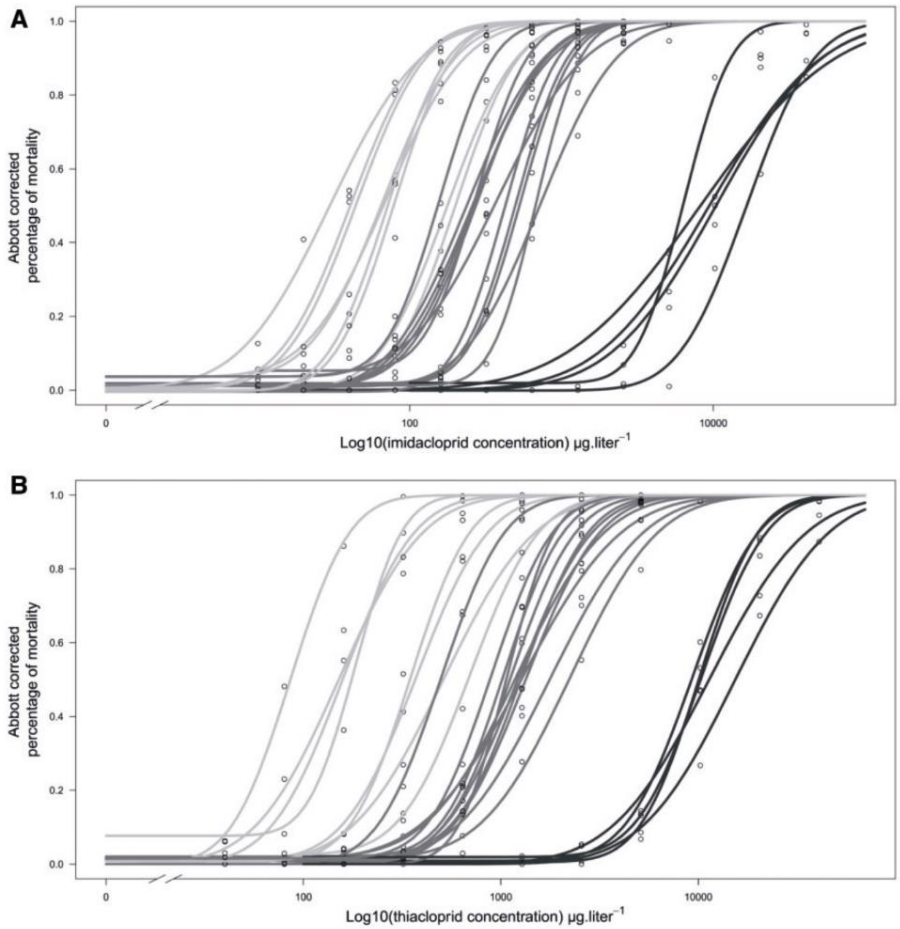


Fig. 1. Imidacloprid (**A**) and thiacloprid (**B**) dose response curves for the 23 clones tested and the three reference clones (genotype [RR] is shown in light grey, [RT] in medium grey, and [TT] in dark grey).

Mortality in the untreated control ranged from 0 to 7%. The three laboratory strains had similar estimated LC_{50} with imidacloprid (ca. 40 µg liter^{-1}). In contrast, the 95% confidence interval of the estimated thiacloprid LC_{50} for the laboratory clone 4106A was not overlapping the 95% confidence intervals of the two other laboratory clones (384C and 4916A), suggesting that this clone was a little more sensitive than the two other laboratory clones to this molecule (LC_{50}: 85.9 µg liter^{-1} [75.17–97.44] vs. ca. 154.9 µg liter^{-1} [142.8–168.1] for 384C and 151.1 µg liter^{-1} [135.38–168.39] for 4916A).

The five homozygous clones for the R81T mutation (genotype 81^{TT}) showed a much higher level of resistance to both active substances under test than other clones ($LC_{50} > 6{,}400$ µg liter^{-1} and RL > 100 for both active substances, with a maximum of 16,908 µg liter^{-1} and RL = 412). For both insecticide molecules, a conspicuous gap was visible between mortality curves of the resistant homozygous clones and those of both heterozygous and sensitive homozygous clones (Fig. 1), as well as between 95% CL of estimated LC_{50} (4,648.7–19,026 µg liter^{-1} for 81^{TT} genotypes and 29.6–816.6 µg liter^{-1} for both 81^{RR} and 81^{RT} genotypes).

Heterozygous and sensitive homozygous clones both displayed a great range of responses, observable in mortality curves obtained with either imidacloprid (Fig. 1A) or thiacloprid (Fig. 1B): for imidacloprid, sensitive homozygous LC_{50} ranged from 67.0 to 199.8 µg liter^{-1} and heterozygous from 158.0 to 727.4 µg liter^{-1}; for thiacloprid, sensitive homozygous LC_{50} ranged from 183.6 to 876.0 µg liter^{-1} and heterozygous from 494.8 to 2,246.5 µg liter^{-1}.

Mean D_{LC} values were 0.316 for imidacloprid and 0.351 for thiacloprid, as calculated based on the most commonly considered median lethal concentration (LC_{50}). These values did not vary much when the calculation was processed on different % lethality (e.g., with LC_{10} and LC_{90}, D_{LC} were 0.344 and 0.323 resp. for imidacloprid and 0.344 and 0.367 resp. for thiacloprid). Although sensitive homozygous and heterozygous clones provided overlapping 95% CL of estimated LC_{50} and no gap between their mortality curves, the LC_{50} of all three groups of clones (genotypes 81^{RR}, 81^{RT}, and 81^{TT}) appeared to be significantly different according to the Kruskal–Wallis analysis of variance by ranks ($P < 0.0001$ for both imidacloprid and thiacloprid bioassays) and post hoc Wilcoxon Mann–Whitney pairwise analyses ($P < 0.05$ for every pair in both series of bioassays after Bonferroni correction). All the heterozygous clones 81^{RT} were less sensitive than laboratory sensitive reference clones to both active substances. 95% CL for estimated LC_{50} of a few sensitive homozygote field clones (only wild type allele—nAChR genotype 81^{RR}) and heterozygous clones (nAChR genotype 81^{RT}) were overlapping. Indeed, for imidacloprid, 95% CL extended from 57.1 to 84.8 µg liter^{-1} for all 81^{RR} clones except two (11-037-001 and 11-062-016, 95% CL from 152.7 to 228.3 µg liter^{-1}), whose 95% CL were overlapping

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

with two 81^{RT} clones' (13-001-032 and 12-067-023, 95% CL from 126.53 to 326.1 µg liter^{-1}).

The ratio of thiacloprid LC_{50} over imidacloprid LC_{50} ratio was close to 1 in each of the five 81^{TT} clones tested (mean 1.16 ± 0.12), which was expected in regards to the similar molar weights of imidacloprid and thiacloprid (255.66 g mol^{-1} and 252.72 g mol^{-1}, respectively). In contrast, great differences were observed between LC_{50} for the two chemicals per clone in both 81^{RR} and 81^{RT} genotypes (thiacloprid LC_{50}/imidacloprid LC_{50} ratio = 4.43 ± 1.05 for sensitive homozygous clones 81^{RR}; 3.62 ± 1.59 for heterozygous clones 81^{RT}).

Cross-resistance between imidacloprid and thiacloprid in *M. persicae* clones carrying the R81T mutation was also noticed. LC_{50} values for imidacloprid and thiacloprid for these clones showed a high significant positive correlation (Spearman coefficient rs = 0.90—$P < 0.00001$; see linear regression on Fig. 2). This is consistent with other neonicotinoid cross-resistances (mainly imidacloprid–thiamethoxam cross-resistances) previously reported in *M. persicae* clones possessing the R81T mutation (Bass et al. 2011, Slater et al. 2012, Cutler et al. 2013).

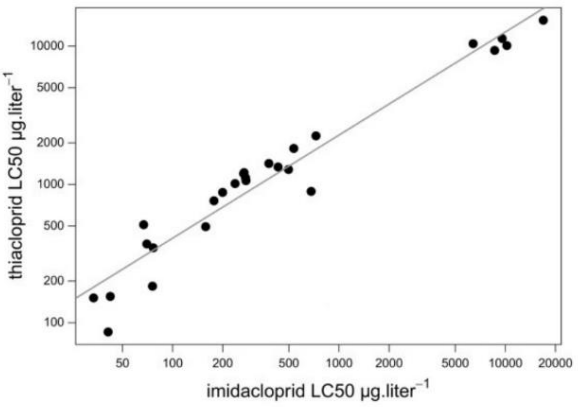


Fig. 2. Correlation between LC_{50} values for imidacloprid and thiacloprid showing cross-resistance between these two molecules.

Discussion

Here we provide an interesting overview of the range of resistance phenotypes against neonicotinoids found in *M. persicae* from French peach orchards according to codon genotype of position 81 in the β1 nAChR subunit.

First, we observed highly resistant phenotypes ($118 \leq RL \leq 412$) associated with the homozygous mutant genotype 81^{TT} for the codon 81 of the β1 nAChR subunit as previously established. It was shown to be implicated in a drastic loss of sensitivity to different active substances belonging to neonicotinoids family (Bass et al. 2011, Slater et al. 2012, Panini et al. 2014).

Second, the D_{LC} values as calculated following Bourguet et al. (2000) allow to assign the mutant allele 81T to the semirecessive category (ca. 0.3 for both insecticide molecules tested). Note that the equation used to calculate the dominance level is based on log values of lethal concentrations, which makes interval between 0.3 and 0.5 a considerable one. Compliantly to Bourguet and Raymond (1998)'s categorization, this value falls within the range of the semirecessive category but is excluded from that of the codominant category. This allele appears to be at least partly recessive over the wild 81R allele, which is consistent with the known mode of action of neonicotinoid molecules (their binding induce the opening of the cation channel nAChR): as previously reported by Bourguet and Raymond (1998), mutant alleles preventing an insecticide to open a channel are commonly found recessive to semirecessive, as only a few open channels may be lethal. In the present case, the ca. 0.30–0.35 D_{LC} values obtained using different lethal concentrations (10, 50, and 95) for both molecules are within the range of values obtained by these authors with other ion channels.

Slater et al. (2012) observed that the expression of the mutant allele in heterozygous individuals was effective. The fact that, despite above evoked overlapping of 95% CL, the 12 heterozygous clones tested provided significantly different LC_{50} values as compared to the 81^{RR} genotypes raises the question of the influence of the mutant allele in heterozygous status in the resistance phenotype. As expressed by the continuous values of D_{LC} (from 0 to 1 with 0 for complete recessivity and 1 for complete dominance), the recessivity is not a binary trait, so that a limited role of the 81T allele in the presence of 81R is not excluded. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ion channels that open transiently after binding two agonist molecules (Auerbach and Akk 1998). Channel closure is allowed when the agonist acetylcholine (ACh) molecule is hydrolyzed by acetylcholinesterase (which is the most common case in the absence of neonicotinoid with any of the 81 alleles or in the presence of neonicotinoid with the mutant allele 81T allele). The involvement of two agonist molecules in the channel position may result in more or less unpredictable effect of mixed mutant and wild amino-acid sequences. All the more that the nAChR are pentameric receptors (five subunits are arranged around the central ion channel), which are formed by identical (homomeric) or different (heteromeric) subunits (Jones and Sattelle 2010). Although the specific composition of insect receptors is not yet well known, several different subunits are known to be present in insect nAChR. Recently, using the full genome of *Acyrtosiphon pisum*, Dale et al. (2010) isolated 11 genes encoding putative nAChR subunits in this aphid, suggesting the presence of several different nAChR subtypes in single individuals, as in vertebrates. As a result, insecticide–nAChR protein interactions may be highly complex. This makes possible that inclusion of both mutant and wild alleles in different nAChR subtypes does not exactly result in the strict abolition of advantage conferred by the mutant allele.

Other important modifiers such as metabolic resistance related with P450 cytochrome are likely to play a role in the phenotypic variations observed in both wild homozygotes and in heterozygotes. Such an involvement was shown in *M. persicae* resistance to neonicotinoid insecticides (Puinean et al. 2010). In previous studies carried out with homozygous resistant genotypes, a significant decrease of resistance level was observed when bioassays were realized after a piperonyl butoxide (PBO) treatment, which inhibits P450 enzyme activity (Bass et al. 2011, Panini et al. 2014). It is likely that such modifiers, as well as others not yet identified, are also responsible for mortality curve differences between sensitive homozygous and heterozygous clones. Both sensitive homozygous 81^{RR}, and, to a lesser extent, heterozygous 81^{RT}, display a great range of phenotypes, for both imidacloprid, and even more so, for thiacloprid. This is also consistent with the marked differences between thiacloprid and imidacloprid LC_{50} which were observed in 81^{RR} and 81^{RT} genotypes, but not in 81^{TT} genotype. According to the semirecessive profile of 81T, only clones with the 81^{TT} genotype possess fully effective target resistance, and therefore likely have reached a maximum threshold of resistance. In contrast, the less sensitive clones

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

among both 81^{RR} and 81^{RT} genotypes most likely have developed other resistance mechanisms, such as overproduction of detoxifying enzymes, the efficiency of which may differ among molecules.

In conclusion, the partial recessivity of the mutant 81T allele over the wild 81R allele, established for two neonicotinoids, by bioassays on 23 clonal populations, adds a new facet to the understanding of neonicotinoid resistance in *M. persicae*. Given the ca. 0.3 D_{LC} values and the large gap between heterozygous and sensitive homozygous clones on one hand and resistant homozygous clones on the other hand, it is not unlikely that some field-applicable doses may kill all or almost all heterozygous individuals. Assessing these doses could be of great help for managing such resistance on peach trees in the presence of refuge zones, although such a management method should be considered with caution, considering that cyclical parthenogenetic reproduction is likely to allow rapid amplification of homozygous genotypes. Since peach tree is the primary host of *M. persicae*, all aphids developing on this plant result from recent sexual reproduction events. As a consequence, the advantage of maintained homozygosity during asexual generation could be lost in these populations by the regular occurrence of sexual reproduction, with associated recombination events breaking the association of the two resistant alleles (unless this locus is seated in a region of low recombination). However, exerting some such selective pressure on primary host may result in increased resistance on secondary hosts under the same insecticide selective pressure (selected homozygous resistant genotypes being able to swarm to secondary hosts where only parthenogenetic reproduction occurs). With this risk in mind, measuring the D_{ML} by assessing the relative mortality level for insecticide concentrations consistent with real field application using more field-mimetic Potter spray application method could be useful. Furthermore, establishing the dominance of fitness traits (both D_{WT} and D_{WNT}) would provide a helpful recommendation for resistance management against neonicotinoids on the primary host. Bioassays involving comparisons in the presence and in the absence of synergist PBO would allow stating to which extent known metabolic resistance mechanism against neonicotinoids contribute as modifiers to the observed high sensitivity variations amongst both wild and heterozygous genotypes, and would complete the picture of neonicotinoid resistance in *M. persicae*.

Acknowledgments

We are grateful to Gérard Febvay and Yvan Rahbé (UMR 203 INRA/INSA de Lyon, Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I)) for teaching us the bioassay sachets method and for providing Ap3 artificial feeding. We are also thankful to Diana Cox (Rothamsted Research, Harpenden) for providing clones 4106A and 4916A.

Benoît Barrès (Anses - Laboratoire de Lyon) provided valuable comments on the manuscript.

References

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265–267.

Auerbach, A., and G. Akk. 1998. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. J. Gen. Physiol. 112: 181–197.

Bass, C., M. Puinean, C. T. Zimmer, I. Denholm, L. M. Field, S. P. Foster, O. Gutbrod, R. Nauen, R. Slater, and M. S. Williamson. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 1–11.

Bass, C., A. M. Puinean, M. Andrews, P. Cutler, M. Daniels, J. Elias, V. L. Paul, A. J. Crossthwaite, I. Denholm, L. M. Field, et al. 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neurosci. 12: 51.

Beckingham, C., J. Phillips, M. Gill, and A. J. Crossthwaite. 2013. Investigating nicotinic acetylcholine receptor expression in neonicotinoid resistant *Myzus persicae* FRC. Pesticide Biochem. Physiol. 107: 293–298.

Blackman, R. L. 1974. Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. Bull. Entomol. Res. 63: 595–607.

Bourguet, D., and M. Raymond. 1998. The molecular basis of dominance relationships: The case of some recent adaptative genes. J. Evol. Biol. 11: 103–22.

Bourguet, D., A. Genissel, and M. Raymond. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. J. Econ. Entomol. 93: 1588–1595.

Buchholz, A., and R. Nauen. 2002. Translocation and translaminar bioavailability of two neonicotinoid insecticides after foliar application to cabbage and cotton. Pest Manag. Sci. 58: 10–16.

Curtis, C. F., L. M. Cook, and R. J. Wood. 1978. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. Ecol. Entomol. 3: 273–287.

Cutler, P., R. Slater, A. J. Edmunds, P. Maienfisch, R. G. Hall, F. G. Earley, T. Pitterna, S. Pal, V. L. Paul, J. Goodchild, et al. 2013. Investigating the mode of action of sulfoxaflor: A fourth-generation neonicotinoid. Pest Manag. Sci. 69: 607–619.

Dale, R. P., A. K. Jones, C. Tamborindeguy, T.G.E. Davies, J. S. Amey, S. Williamson, A. Wolstenholme, L. M. Field, M. S. Williamson, T. K. Walsh, et al. 2010. Identification of ion channel genes in the Acyrthosiphon pisum genome. Insect Mol. Biol. 19: 141–153.

Dederer, H. 2013. Nicotinic Receptors of Parasitic Insects: Biochemical and Pharmacological Studies. Docteur, Universität Tübingen.

Fenton, B., J. T. Margaritopoulos, G. L. Malloch, and S. P. Foster. 2010. Micro-evolutionary change in relation to insecticide resistance in the peach–potato aphid, *Myzus persicae*. Ecol. Entomol. 35: 131–146.

Finney, D. J. 1971. Probit analysis, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Finney, D. J. p. 1978. Statistical Method in Biological Assay, 3rd Ed. Charles Griffin & Company, London, United Kingdom.

Foster, S. P., I. Denholm, and R. Thompson. 2003. Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). Pest Manag. Sci. 59: 166–173.

Jones, A. K., and D. B. Sattelle. 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. Adv. Exp. Med. Biol. 683: 25–43.

Liu, Z., M. S. Williamson, S. J. Lansdell, I. Denholm, Z. Han, and N. S. Millar. 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 8420–8425.

Margaritopoulos, J. T., L. Kasprowicz, G. L. Malloch, and B. Fenton. 2009. Tracking the global dispersal of a cosmopolitan insect pest, the peach potato aphid. BMC Ecol. 9: 13.

Matsuda, K., and D. B. Sattelle. 2004. Mechanism of selective actions of neonicotinoids on insect nicotinic acetylcholine receptors, pp. 172–182, New Discoveries in Agrochemicals, American Chemical Society, Washington DC.

Panini, M., D. Dradi, G. Marani, A. Butturini, and E. Mazzoni. 2014. Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*. Pest Manag. Sci. 70: 931–938.

Puinean, A. M., S. P. Foster, L. Oliphant, I. Denholm, L. M. Field, N. S. Millar, M. S. Williamson, and C. Bass. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. PLoS Genet. 6: e1000999.

Rahbé, Y., and G. Febvay. 1993. Protein toxicity to aphids: an in vitro test on *Acyrthosiphon pisum*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 67: 149–160.

Ramirez, C., and H. Niemeyer. 2000. The influence of previous experience and starvation on aphid feeding behavior. J. Insect Behav. 13: 699–709.

Raymond, M. 1985. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM, sée. Ent. Méd. Et Parasitol. XXIII: 117–121.

Sakuma, M. 1998. Probit analysis of preference data. Appl. Entmol. Zool. 33: 339–347.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Slater, R., V. L. Paul, M. Andrews, M. Garbay, and P. Camblin. 2012. Identifying the presence of neonicotinoidresistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. Pest Manag. Sci. 68: 634–638.

Wilson, A., B. Massonnet, J. C. Simon, N. Prunier-Leterme, L. Dolatti, K. Llewellyn, C. Figueroa, C. Ramirez, R. Blackman, A. Estoup, et al. 2004. Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. Mol. Ecol. Notes 4: 104–109.

Zamoum, T., J. C. Simon, D. Crochard, Y. Ballanger, L. Lapchin, F. Vanlerberghe-Masutti, and T. Guillemaud. 2005. Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*? Heredity 94: 630–639.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3. Quelles perspectives et opportunités sont offertes par les techniques de séquençage à haut débit dans le cadre de la surveillance des résistances aux PPP ?

Les deux précédents chapitres ont illustré l'apport et l'intérêt de l'utilisation des outils de biologie moléculaire classique pour contribuer à l'amélioration de la surveillance des résistances ainsi qu'à une meilleure compréhension et caractérisation des mécanismes en jeux. Cependant, avec ces approches, le nombre de populations et d'individus génotypés restent très limité au regard des milliers de populations sur le territoire, elles-mêmes constituées de plusieurs milliers (voire millions) d'individus. Par exemple l'article sur la détection et au suivi des résistances chez *P. viticola*, le génotypage individuel de lésions de mildiou pour rechercher la mutation S34L n'a été réalisé que dans 34 populations représentant au total plus de 1000 lésions analysées (en moyenne 29 individus / population). Ce type d'approche individu-centrée, qui nécessite déjà un temps de travail assez conséquent, ne permet d'étudier qu'un marqueur de résistance à la fois. Or, des mutations affectant différents loci peuvent être responsables de la résistance à une substance active ou famille de substances actives. Lorsque ces loci sont regroupés dans une zone relativement restreinte du gène, un séquençage Sanger individuel reste envisageable, mais le coût de l'analyse et l'approche individuelle peuvent rapidement être des facteurs limitant le nombre de populations étudiées. Lorsque plusieurs mutations, réparties sur plusieurs milliers de paires de bases, sont impliquées dans la résistance à une ou plusieurs familles de substances actives, les approches traditionnelles de biologie moléculaire deviennent rapidement complexes à mettre en œuvre. La démocratisation des outils de séquençage à haut débit offre une opportunité d'explorer de manière plus large toute cette diversité de mutations, y compris dans un contexte de surveillance.

De ce point de vue, la résistance de l'ambroisie à feuille d'armoise (*A. artemisiifolia*) vis-à-vis des herbicides inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS), une enzyme impliquée dans la synthèse des acides aminés ramifiés (valine, leucine, et isoleucine), était une candidate parfaite pour ce type d'étude. *A. artemisiifolia* est une espèce extrêmement invasive, largement répartie sur le territoire, dont les populations peuvent être extrêmement importantes. En raison de son cycle de développement, cette espèce est particulièrement problématique dans le domaine agricole pour les cultures d'été. Du fait de sa forte capacité de prolifération (Figure 25B et C) ainsi que de son fort pouvoir concurrentiel, *A. artemisiifolia* est responsable de pertes de rendement importantes (Figure 26B) dans les cultures de tournesol, soja, maïs ou blé (Mutch et al, 2003 ; Clay et al, 2006 ; Ozaslan et al, 2016).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

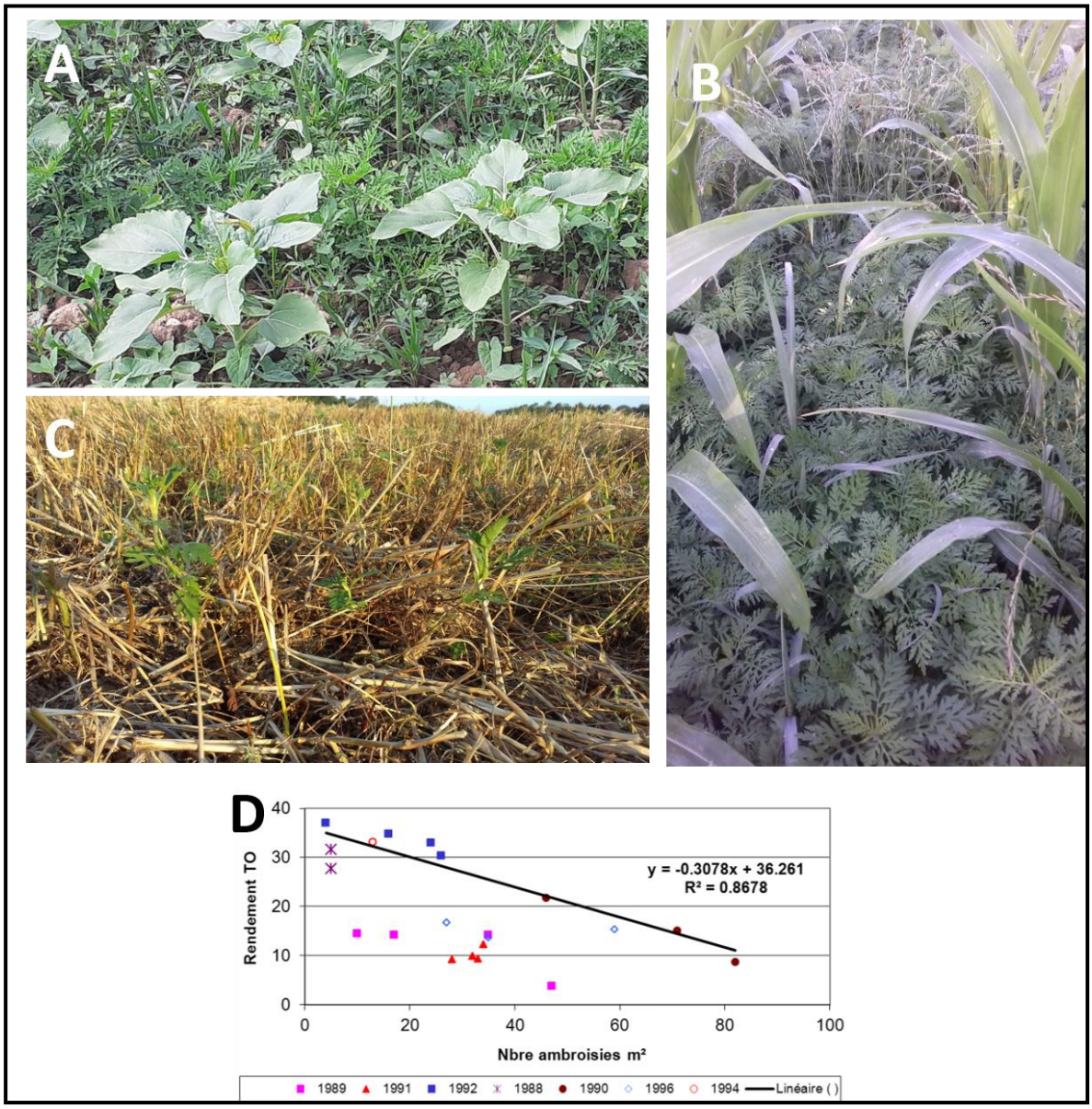


Figure 25 : Exemple de cultures colonisées par l'ambroisie à feuille d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*). A. culture de tournesol ; B. inter-rang de culture maïs ; C. chaume de blé ; D. Rendement en fonction de nombre d'ambroisie à feuilles d'armoise par m^2 en culture de tournesol – la nuisibilité de l'ambroisie est estimée à 3q/ha par tranche de 10 ambroisies/m² (Source : Terres Inovia, étude « Nuisibilité des Ambroisies sur Tournesol 1988-1994 »).

En culture de tournesol, la lutte contre cette adventice est rendue complexe par la proximité taxonomique des deux espèces. Le recours aux variétés rendues tolérantes aux herbicides (VRTH), à partir de 2010, a représenté une opportunité pour contourner des impasses techniques de désherbage et gérer cette adventice. Les variétés VRTH étaient, jusqu'à récemment, uniquement des variétés tolérantes à des inhibiteurs de l'ALS qui sont des herbicides considérés comme à fort risque d'évolution de résistance (Moss et al, 2019). Selon la base de données internationale sur les adventices résistantes aux herbicides ("Heap" : https://www.weedscience.org/Home.aspx, consultée le 08/11/2024), 175 espèces ont évolué des résistances vis-à-vis de cette famille avec des mécanismes liés ou non liés à la modification

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

de la cible (RLC / RNLC). En France, des cas de résistance chez *A. artemisiifolia* vis-à-vis des inhibiteurs de l'ALS, ont été identifiés à partir de 2013 (Delye et al, 2015). Concernant la résistance impliquant une modification de la cible, plusieurs mutations affectant différents codons de l'ALS (8 à ce jour) ont été décrites dans des espèces issues du champ (Figure 26). En laboratoire, l'étude de l'activité *in vitro* de différentes ALS mutées a montré que d'autres codons pourraient également être responsables d'une perte de sensibilité à ces herbicides (Jung et al, 2004).

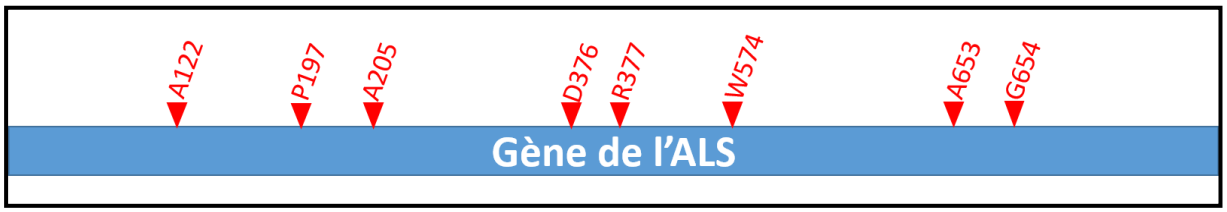


Figure 26 : En rouge les positions des différents codons impliqués et suspectés d'être impliqués dans une perte de sensibilité aux herbicides inhibiteurs de l'ALS. (Figure adaptée de Loubet et al, 2020)

La publication présentée dans ce chapitre, pour laquelle je suis co-autrice, est parue dans "Scientific Reports" (Loubet et al, 2021), illustre les résultats d'une étude de grande ampleur sur les résistances aux inhibiteurs de l'ALS chez l'ambroisie à l'aide de diverses approches associant des tests biologiques et du séquençage à haut débit. C'est une valorisation du projet ENI-VTH (Effets non intentionnels associés à l'utilisation des variétés de tournesol tolérantes aux herbicides), financé dans le cadre du plan Ecophyto II[2], piloté par INRAE Dijon de 2017 à 2019 et auquel j'ai participé. Ce projet avait pour objectif général de surveiller les effets non intentionnels des variétés rendues tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS. La surveillance de l'évolution de résistances chez l'ambroisie constituait l'un des volets de ce projet, par la réalisation et l'analyse de nombreux prélèvements de feuilles d'ambroisie (plus de 200) conduits par INRAE dans des parcelles de cinq régions françaises où les cultures de tournesol sont communes et où *A. artimisiifolia* avait été signalée. J'ai contribué au projet en adaptant aux conditions du laboratoire CASPER la préparation des échantillons en vue du séquençage à haut débit *via* la technologie Illumina™, ainsi que l'analyse des données et la rédaction de l'article. J'ai assuré l'encadrement d'une étudiante d'IUT et d'une technicienne pour la réalisation de ce travail. L'ensemble des résultats obtenus a permis :

- de confirmer la présence de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez l'ambroisie à feuille d'armoise en France ;
- de constater que l'occurrence et la fréquence de la RLC sont assez faibles avec une diversité des substitutions (au nombre de 9) affectant cinq codons différents du gène de l'ALS ;
- de révéler que la RNLC est le type de mécanisme de résistance majeur aux inhibiteurs de l'ALS et que cette RNLC est très fréquente dans les populations d'ambroisie présentes dans les parcelles agricoles en France.

[2] Plan publié en 2015 qui visait à réduire de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires à l'horizon 2025.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Pour l'unité CASPER, ce projet représente le début de la mise œuvre d'approches de séquençage à haut débit dans le cadre de nos travaux sur la résistance aux PPP. Il a été à l'origine d'une montée en compétences de l'unité sur ces techniques qui pourra être valorisée dans d'autres travaux.

La seconde publication présentée ici est le résumé d'une communication réalisée à la 13e CIMA (Conférence Internationale sur les Maladies des plantes) (Fontaine et al, 2022). Elle porte sur la validation d'un outil d'analyse de séquençage à haut débit pour quantifier, au niveau populationnel, des allèles impliqués dans la résistance vis-à-vis de différentes familles de fongicides chez *Cercospora beticola*, l'agent de la cercosporiose de la betterave. C'est un des volets de l'AMI transversalité Anses « Quantall » (Détection et QUANTification à haut débit d'ALLèles liés à la résistance des bioagresseurs aux produits phytopharmaceutiques). *C. beticola* est un champignon pathogène majeur des cultures des betteraves sucrières dont la nuisibilité tend à être plus problématique depuis quelques années. Une étude menée précédemment dans l'unité CASPER dans le cadre du projet RECIFE, piloté par INRAE, l'ITB (Institut Technique de la Betterave) et l'Anses, avait mis en évidence la présence, en France, de souches résistantes vis-à-vis des différentes familles de fongicides : 1) les inhibiteurs de la respiration par liaison du cytochrome *b* aux sites Qo (QoI), 2) les inhibiteurs de la *β*-tubuline (benzimidazoles), 3) les inhibiteurs de l'14*α*-déméthylase (IDM tels que les triazoles). Pour ces trois familles de fongicides, la RLC peut résulter de la présence d'une unique ou de plusieurs mutations affectant la cible respective de ces fongicides (Figure 27).

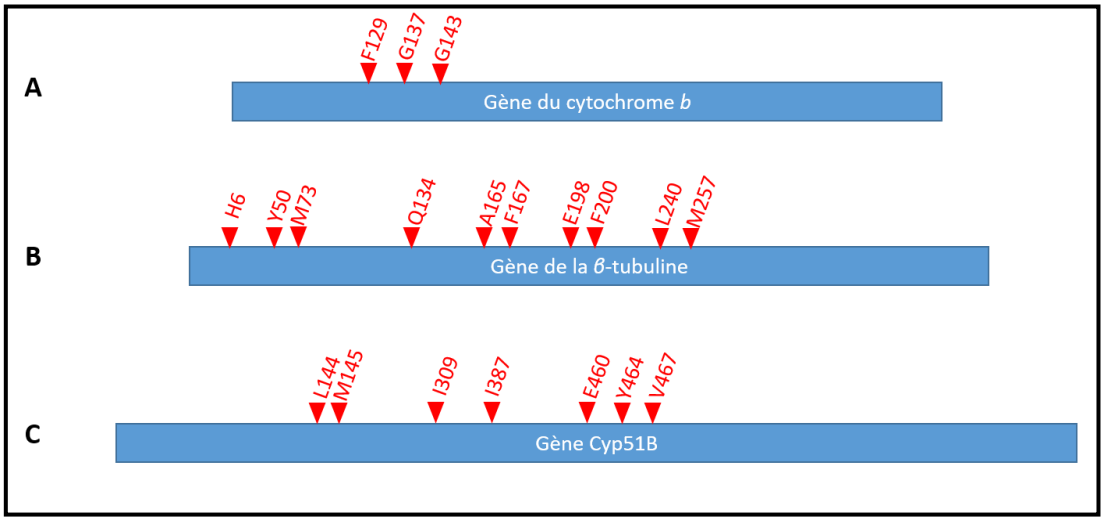


Figure 27 : En rouge positions des différents codons impliqués dans la résistance aux QoI, B-benzimidazoles et IDM. A. positions des codons impliqués dans la résistance au QoI identifiés chez différentes espèces de champignons phytopathogènes dans le gène codant le cytochrome *b.* B. positions des codons impliqués dans la résistance au Benzimidazoles identifiés chez différentes espèces de champignons phytopathogènes dans les gènes codant la *β*- tubuline (Mair et al, 2016) ; C. codons impliqués dans une perte de sensibilité aux IDM chez *C. beticola* (Trkulja et al, 2017 ; Spanner et al, 2020 ; Kumar et al, 2021 ; Muellender et al, 2021 ; Hoffmeisteret al, 2024).

Cette communication a permis :

- de valider un outil sensible et précis permettant de détecter et quantifier simultanément, au sein de populations de *C. beticola*, l'ensemble des mutations

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

impliquées dans la RLC vis-à-vis de trois familles de fongicides chez *C. beticola* via la technique Illumina™,

- d'identifier les atouts et les limites des approches de séquençage à haut débit pour quantifier des allèles de résistance.

Cet outil a été utilisé ensuite sur un plus grand nombre de prélèvements fournis par l'ITB et une partie des résultats obtenus dans cette étude à plus large échelle a donné lieu à la réalisation d'un poster pour la conférence internationale « Resistance 2024 » organisée par Rothamsted Research. Enfin, comme déjà évoqué précédemment, ce travail fait partie d'un projet plus global visant à développer l'approche de séquençage Illumina™ pour détecter et quantifier des mutations impliquées dans des résistances chez plusieurs espèces de bioagresseurs d'intérêts pour l'unité. Un article sur l'entièreté du projet est en cours de rédaction et devrait être soumis fin 2025. Des retombées extrêmement positives de ce projet ont également été le développement de liens avec la plateforme Anses de séquençage située à Ploufragan. Cela a également permis une montée en compétences et permet maintenant d'avoir recours au séquençage Illumina™ régulièrement dans le cadre du plan de surveillance de la DGAL pour différentes espèces de bioagresseurs.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3.1. A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia L.*)

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.)

Ingvild Loubet[1,2], Laëtitia Caddoux[2], Séverine Fontaine[2], Séverine Michel[1], Fanny Pernin[1], Benoit Barrès[2], Valérie Le Corre[1] & Christophe Délye[1]✉

Ambrosia artemisiifolia **L. (common ragweed) is a globally invasive, allergenic, troublesome arable weed. ALS-inhibiting herbicides are broadly used in Europe to control ragweed in agricultural fields. Recently, ineffective treatments were reported in France. Target site resistance (TSR), the only resistance mechanism described so far for ragweed, was sought using high-throughput genotyping-by-sequencing in 213 field populations randomly sampled based on ragweed presence. Additionally, non-target site resistance (NTSR) was sought and its prevalence compared with that of TSR in 43 additional field populations where ALS inhibitor failure was reported, using herbicide sensitivity bioassay coupled with ALS gene Sanger sequencing. Resistance was identified in 46 populations and multiple, independent resistance evolution demonstrated across France. We revealed an unsuspected diversity of ALS alleles underlying resistance (9 amino-acid substitutions involved in TSR detected across 24 populations). Remarkably, NTSR was ragweed major type of resistance to ALS inhibitors. NTSR was present in 70.5% of the resistant plants and 74.1% of the fields harbouring resistance. A variety of NTSR mechanisms endowing different resistance patterns evolved across populations. Our study provides novel data on ragweed resistance to herbicides, and emphasises that local resistance management is as important as mitigating gene flow from populations where resistance has arisen.**

Among crop pests, weeds are the leading causes for row crop yield losses in agriculture[1]. The use of synthetic herbicides to control weeds since the middle of the twentieth century contributed to increase global crop yields. However, following the intensive use of herbicides to control weeds, a number of weed species evolved mechanisms allowing them to survive and successfully reproduce in treated fields. Herbicide resistance can be defined as the natural, inheritable ability of mutant weed genotypes to survive herbicide concentrations that kill or inhibit the development of wild-type genotypes of the same species (sensitive genotypes), and/or as the outcome of the adaptive evolution of weeds as a result of selection for reduced sensitivity under herbicide selective pressure[2]. The efficacy of herbicides is now threatened by the widespread evolution of resistance. To date, resistance has been reported in 263 weed species worldwide and to 23 of the 26 known herbicides modes of action[3]. The mechanisms underlying herbicide resistance can be classified into two main categories: target site resistance (TSR) and non-target site resistance (NTSR)[4,5]. TSR can be caused by mutation(s) at the gene encoding the target protein of the herbicide, resulting in a modification of the protein structure that reduces herbicide binding. TSR can also be due to an increase in the amount of the herbicide target (gene amplification and/or over-expression). TSR is generally under monogenic control, although there are a few exceptions[5]. By contrast, NTSR is endowed by quantitative and/or qualitative change(s) in the weed secondary metabolism that leads to a reduction in the quantity of active herbicide molecules reaching their target site (e.g. excretion, sequestration, exacerbated metabolism). NTSR is generally considered a complex, polygenic adaptation to herbicide selective pressure that involves large genes families[4,5].

A diversity of mechanisms is involved in TSR or in NTSR. The amino-acid changes involved in TSR must allow the mutant herbicide target to retain its physiological activity. Thus, a relatively limited set of amino-acid replacements is observed across weed species for a given herbicide target[3,6]. Furthermore, different amino-acid substitutions at a given herbicide target are not always functionally redundant and can confer resistance to different sets of herbicide molecules acting at this target[7]. NTSR is most often a quantitative trait. It is considered

[1]UMR Agroécologie, INRAE, Dijon, France. [2]USC CASPER, Anses, INRAE, Université de Lyon, Lyon, France. ✉email: christophe.delye@inrae.fr

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

to evolve gradually from standing genetic variation by the accumulation of small-effect alleles[4]. Due to this quantitative nature, it is likely that a number of allelic combinations can cause NSTR to a given herbicide. On the other hand, it has been demonstrated that one given NSTR mechanism can cause resistance to herbicides with different targets[8]. At the level of one individual weed plant, herbicide resistance can be caused by one or by several TSR and/or NTSR alleles. As a diversity of such alleles exist, the evolution of herbicide resistance in weed species is most often a complex process, and the evolutionary trajectory of a weed population will depend on the resistance mechanism(s) selected. Furthermore, multiple, independent evolution across populations is likely[9,10]. Yet, few studies so far have explored the diversity of resistance mechanisms within a species on a large geographical scale[4].

Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is one of the most troublesome weeds worldwide. This annual plant from the *Asteracea* family is native from North America[11], but has spread worldwide, mostly by human mediated seed dispersal[12]. Common ragweed is currently considered as a major weed in agricultural fields, competing with crops for light, water and soil nutrients. It particularly impacts summer crops such as maize, soybean and sunflower[13,14]. Moreover, common ragweed is also a major concern for public health. Its highly allergenic pollen is one of the most important cause of hay fever globally[15]. In agricultural fields, common ragweed is mainly controlled by herbicide applications. As a result, resistance to herbicides targeting photosystem II, protoporphyrinogen oxidase, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and/or acetolactate-synthase (ALS) has been reported in this species in its native range (the United States and Canada[3]).

Common ragweed has been introduced in France in 1863[16]. It is currently a growing concern in agriculture, with especially high levels of infestation in sunflower and in soybean. Sunflower cultivars resistant to the ALS-inhibiting herbicides tribenuron or imazamox have been marketed to control weeds difficult to control in "conventional" sunflower cultivars, including ragweed[17]. Imazamox is also used for common ragweed control in soybean. Both herbicides provide efficient ragweed control. Yet, a decrease in their efficacy has recently been reported in highly infested areas, arising the suspicion of the occurrence of resistance to ALS inhibitors. TSR is a frequent and widespread cause of resistance to ALS inhibitors, especially in broadleaf weeds[18,19]. Indeed, TSR to ALS inhibitors endowed by an ALS allele carrying a Trp574Leu substitution observed in the USA is the only mechanism of resistance identified to date in common ragweed[20–22].

Managing or mitigating herbicide resistance requires understanding its modalities of evolution, and identifying the mechanisms involved. Here, we investigated the occurrence of resistance to ALS inhibitors in French common ragweed populations. In a first step, we used a high-throughput genotyping-by-sequencing approach (Pool-seq) to seek TSR to ALS inhibitors in a massive and national-scale sampling of ragweed populations. In a second step, we investigated the presence of resistance, whatever the underlying mechanism, using herbicide sensitivity bioassays, and compared the respective prevalence of TSR and NTSR mechanisms. The cross-resistance pattern associated to the two major TSR ALS alleles identified in common ragweed was established. In addition, we examined the patterns of resistance evolution among populations.

Results

Detection of nine amino-acid substitutions at the ALS gene in French common ragweed populations. Overall, nine nucleotide substitutions causing nine amino-acid changes within the ALS protein were detected in the two ragweed population samplings analysed in this study. Three substitutions occurred at codon 197, two at codon 205, two at codon 574, one at codon 376 and one at codon 578.

A random sampling including a total of 213 common ragweed populations collected in areas in France where ragweed is frequently observed in agricultural fields was analysed using Illumina Pool-seq. We detected five amino-acid substitutions at a total of four codons involved or potentially involved in TSR to ALS inhibitors in 15 populations distributed among all sampled regions (Table 1; Fig. 1). Two different substitutions at codon 197 (Pro197Gln and Pro197Ser) were each detected in one population, in a frequency of 1.0 and 2.4% respectively (Table 1). A Trp574Arg substitution was detected in low frequencies (1.6% and 2.1%) in two neighbouring populations. An Ala205Thr substitution was detected in eight populations in frequencies ranging from 1.2 to 11.5%. Seven of these populations formed a geographical cluster. Last, a Phe578Ile substitution was detected in three clustered populations in frequencies ranging from 1.1 to 4.9%. Overall, the frequencies of the mutant ALS alleles in each population were low, with values < 5% in 12 of the 15 populations where such alleles were detected, and a maximum value of 11.5%.

The random sampling was completed by a targeted sampling including 43 additional common ragweed populations collected in fields where treatment failures had been reported, and therefore occurrence of resistance could be suspected. All populations were subjected to ALS inhibitor sensitivity bioassays. Sanger sequencing of the ALS gene in the resistant plants identified by these bioassays detected a total of five amino-acid substitutions at four codons involved in TSR to ALS inhibitors (Table 2; Fig. 1). The Ala205Thr substitution detected in the random survey was also found in a geographical cluster of three populations. Four additional substitutions were identified in six populations. An Ala205Val substitution was detected in a geographical cluster of three populations. A Pro197Thr, an Asp376Glu and a Trp574Leu substitution were each detected in one population.

Phylogenetic analysis of mutant ALS alleles. The DNA sequences of all mutant ALS alleles detected in at least two populations (i.e., Thr205, Val205, Arg574 and Ile578) were aligned and a haplotype network established on the basis of the nucleotide polymorphisms observed (Fig. 2). The Val205, the Arg574 and the Ile578 haplotypes had one single evolutionary origin each. These haplotypes had been detected in populations clustered within relatively small regions (Fig. 1). The maximum distance as the crow flies between two populations in our sampling harbouring these haplotypes were 37 km, 18 km and 15 km for the Val205, Arg574 and Ile578 haplotype, respectively. Two different evolutionary origins corresponding to two distinct geographical areas were

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Population code	Mutant ALS allele detected	Mutant ALS allele frequency (%)
OCC20	Gln197	1.0
ARA9	Ser197	2.4
OCC14	Thr205	11.5
OCC16	Thr205	5.6
OCC17	Thr205	5.7
OCC21	Thr205	2.0
OCC22	Thr205	1.2
OCC23	Thr205	1.7
OCC24	Thr205	1.1
CVL6	Thr205	4.1
OCC18	Arg574	2.1
OCC19	Arg574	1.6
NAQ10	Ile578	1.1
NAQ11	Ile578	1.4
NAQ12	Ile578	4.9

Table 1. Mutant ALS alleles detected by Illumina Pool-seq and their estimated within-population frequencies in a random sampling of 213 populations. Only populations where mutant alleles were detected are listed in this table.

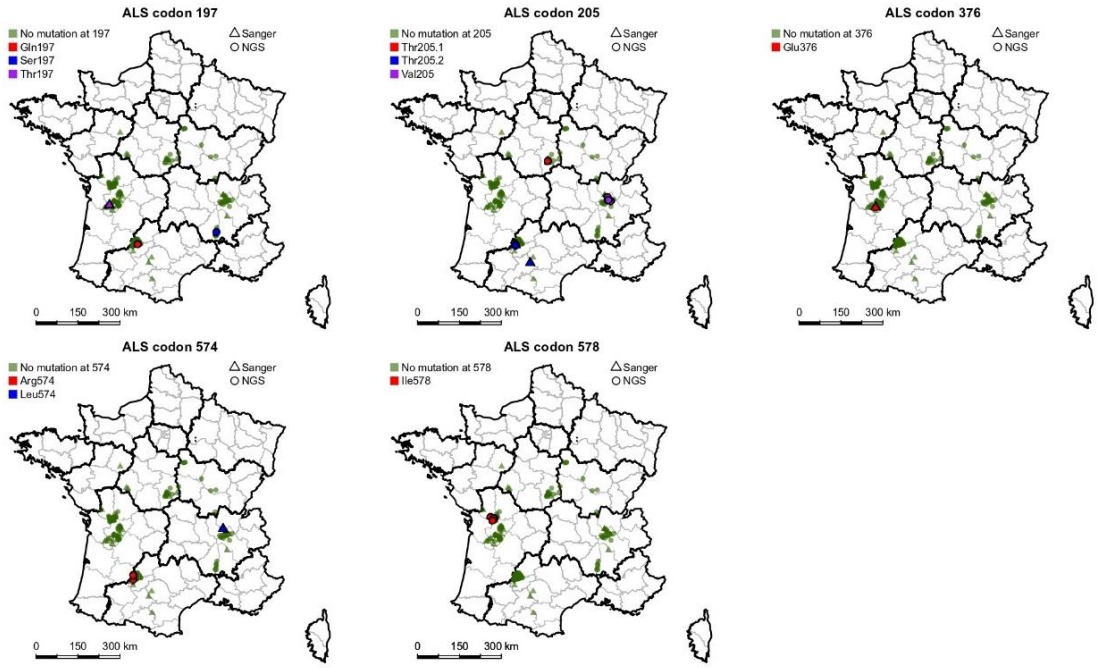


Figure 1. Geographical distribution of the nine mutant ALS alleles identified in this study among common ragweed populations. The results obtained by Pool-seq analysis of the random sampling of 213 populations and by Sanger sequencing of resistant plants from the targeted sampling of 43 additional populations are illustrated together. Green dots, populations where no allele mutant at the considered codon was detected. Coloured dots, populations where mutant ALS alleles were detected by pool-seq. Coloured triangles, populations where mutant ALS alleles were detected by Sanger sequencing. Maps generated using R software (v4.1.0, packages rgdal, rgeos and mapplots).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Population code	Imazamox				Tribenuron			
	% Resistant plants	% Resistant plants sequenced	Mutation detected	% Mutant, resistant plants	% Resistant plants	% Resistant plants sequenced	Mutation detected	% Mutant, resistant plants
ARA2	10	100	0		0			
ARA3	3	100	Leu574	100	NA			
NAQ4	3	100	0		0			
OCC4	3	100	0		0			
OCC5	3	100	Thr205	100	0			
ARA4	0				15	50	0	
CVL2	0				8	100	0	
CVL3	0				5	50	0	
CVL4	0				8	33	0	
CVL5	0				13	100	0	
NAQ10	0				10	100	Thr197	25
NAQ5	0				5	50	0	
NAQ6	0				16	100	0	
NAQ7	0				15	100	0	
NAQ8	0				43	100	0	
NAQ9	0				18	71	0	
OCC6	0				5	100	0	
OCC7	0				3	100	0	
OCC8	0				3	0	NA	
OCC9	NA				25	0	NA	
ARA5	70	20	Val205	100	70	25	Val205	100
ARA6	5	100	Val205	100	33	77	Val205	33
ARA7	65	20	Val205	100	58	9	Val205	100
ARA8	3	100	0		15	100	0	
NAQ11	3	100	0		03	100	0	
NAQ12	3	100	0		10	100	0	
NAQ13	3	100	Glu376	100	3	0	NA	
OCC10	16	100	Thr205	100	5	0	NA	
OCC11	3	100	0		5	100	Thr205	50
OCC12	5	100	0		5	100	0	
OCC13	5	100	0		10	100	0	

Table 2. Occurrence and frequencies of imazamox-resistant plants and of tribenuron-resistant plants in the 31 populations from the targeted sampling (43 populations in total) where at least one resistant plant was detected by herbicide sensitivity bioassays. Mutant ALS alleles were sought in resistant plants by Sanger sequencing. Populations are grouped according to the presence of resistance to imazamox only, to tribenuron only, or to both herbicides. NA not assayed.

observed for the Thr205 alleles. Haplotype Thr205.1 was detected in one single population located 327 km apart from the nearest sampled population harbouring a Thr205 allele. The 11 remaining populations all contained a second haplotype (Thr205.2). Of these populations, 10 were clustered within a 10 km radius. The last one was located 83 km apart from the nearest population in the cluster harbouring allele Thr205.2.

Resistance to the ALS inhibitors tribenuron and imazamox in common ragweed populations. The 43 populations in the targeted sampling were collected on the basis of a suspicion for resistance and assayed for sensitivity to the herbicides imazamox and tribenuron. Resistant plants were identified with at least one of the two herbicides assayed in 31 of the 43 populations. Only imazamox-resistant plants were detected in five populations (four populations tested with both herbicides and one with imazamox only), in frequencies ranging from 3 to 10% (Table 2). Conversely, only tribenuron-resistant plants were detected in 15 populations (14 tested with both herbicides and one with tribenuron only), in frequencies ranging from 3 to 28% (Table 2). Both imazamox-resistant plants and tribenuron-resistant plants were detected in 11 populations, in frequencies ranging from 3 to 10%. In the remaining 12 populations, no plants resistant to the herbicide(s) assayed were detected (seven populations were tested with both herbicides, four with imazamox only and one with tribenuron only) (Fig. 3).

Mechanisms underlying resistance: TSR. As detailed above and in Table 2, five mutant ALS alleles were detected in resistant plants in nine out of the 31 populations of the targeted sampling where resistance was

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

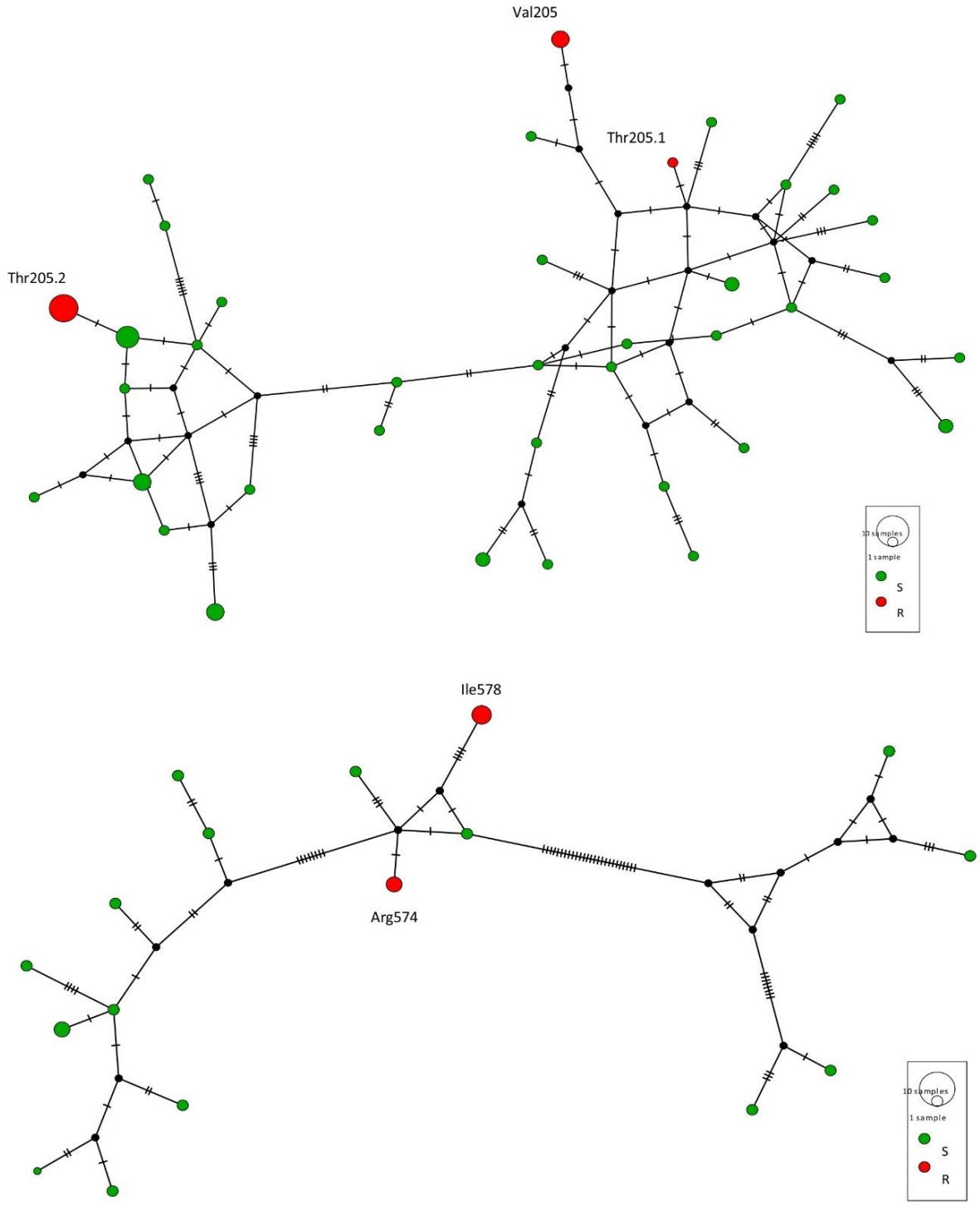


Figure 2. Haplotype network of the ALS haplotypes carrying a mutation at codon 205 (top), 574 or 578 (bottom) (red discs). Green discs, wild-type haplotypes (not carrying a mutation involved in herbicide resistance).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

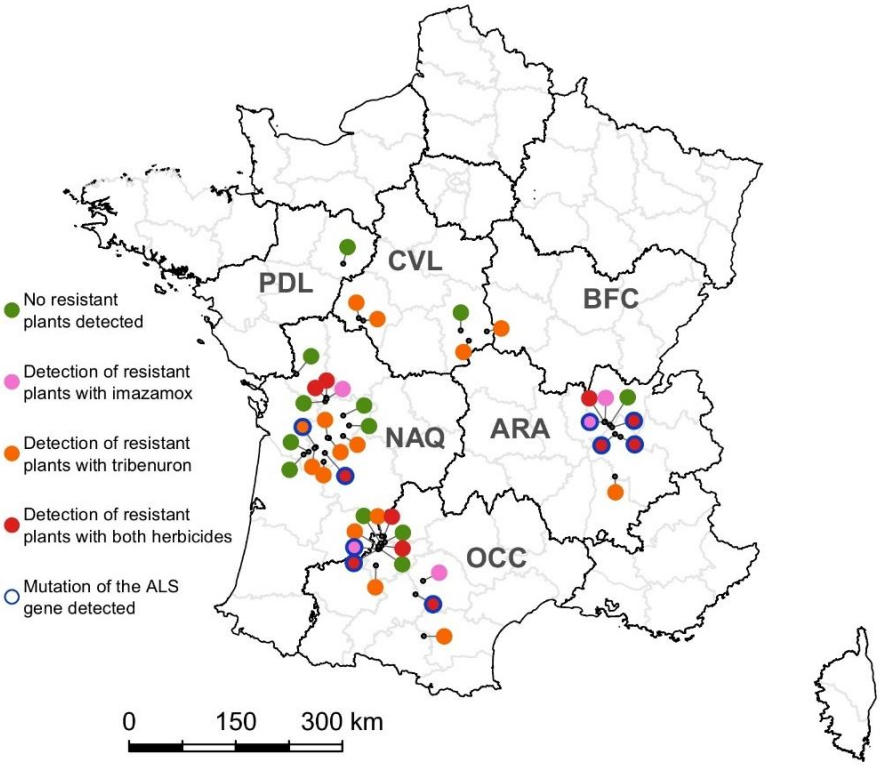


Figure 3. Occurrence of resistance to imazamox, tribenuron and both herbicides in the targeted sampling of 43 common ragweed populations. The presence or absence of resistant plants is indicated by coloured dots. The small grey dot connected to each coloured dot indicates the precise location of the corresponding population. French Région names are coded as follows: ARA, Auvergne Rhône-Alpes; BFC, Bourgogne Franche-Comté; CVL, Centre Val-de-Loire; NAQ, Nouvelle Aquitaine; OCC, Occitanie; PDL, Pays de la Loire. Map generated using R software (v4.1.0, packages rgdal, rgeos and mapplots).

observed. The resistance phenotype conferred by the two most commonly detected Val205 and Thr205 alleles was confirmed by conducting a combined genotyping-and-phenotyping approach on four populations. The results are summarised in Table 3. In all four populations tested, all homozygous wild-type plants were sensitive to imazamox and tribenuron. All plants with at least one mutant allele were resistant to both herbicides. Overall, Fisher's exact test showed a clear association of the genotype at ALS with resistance (p value $= 1.8 \times 10^{-61}$).

The remaining three mutant ALS alleles observed in the targeted population sampling could not be characterised as thoroughly as the Thr250 and Val205 alleles, because of their low frequencies (Table 2). All these alleles were observed in one single population each (Table 2). The Thr197 allele was observed in the heterozygous state in one single tribenuron-resistant plant in population NAQ10. The Glu376 allele was detected in the heterozygous state in the only plant resistant to imazamox sequenced in population NAQ13. The Leu574 allele was observed in the only imazamox-resistant plant identified in population ARA3. Plants from this population could not be assayed with tribenuron, due to poor seed germination.

Mechanisms underlying resistance: NTSR. Overall, the ALS gene was sequenced in 122 resistant plants from 31 populations, and mutant ALS alleles were identified in 36 plants from nine populations (Table 2). The 11 other resistant plants in these nine populations did not carry any mutant ALS allele. No resistant plant carrying a mutant ALS allele was detected in the remaining 22 populations where resistance was observed.

To confirm that no TSR mechanism was at play in the resistant plants carrying wild-type ALS alleles, ALS expression was compared between resistant plants and sensitive plants in four populations where no mutant ALS allele was detected. ALS expression was not significantly different between resistant and sensitive plants in any of the four populations analysed (Supplementary Figure S1). TSR due to ALS gene overexpression was thus not the mechanism involved in resistance in these plants (Table 2).

To sum up, the presence of NTSR (that is, occurrence of resistant plants not carrying TSR mechanisms) was established in 23 of the 31 populations where resistance was identified (Table 2): three populations where resistance to imazamox only was detected, 13 populations where resistance to tribenuron only was detected, and

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Population code	Genotype	Phenotype			
		Number of imazamox-resistant plants	Number of imazamox-sensitive plants	Number of tribenuron-resistant plants	Number of tribenuron-sensitive plants
ARA5	Ala/Ala205	0	9	0	17
	Val/Val205	9	0	7	0
	Ala/Val205	22	0	16	0
ARA7	Ala/Ala205	0	18	NA	NA
	Val/Val205	7	0	NA	NA
	Ala/Val205	15	0	NA	NA
OCC10-bulk1	Ala/Ala205	0	2	0	6
	Thr/Thr205	18	0	14	0
	Ala/Thr205	20	0	19	0
OCC10-bulk2	Ala/Ala205	0	5	0	9
	Thr/Thr205	11	0	16	0
	Ala/Thr205	23	0	15	0

Table 3. Genotype at ALS codon 205 and sensitivity to imazamox or tribenuron of common ragweed. Forty plants were assayed per population and per herbicide. *NA* not assayed.

seven populations with resistance to both herbicides was detected. Over all populations, NTSR mechanisms were estimated to underly resistance in 70.5% of the resistant ragweed plants (95% confidence interval 0.61–0.78).

Discussion

This is the first national-scale study investigating the occurrence of herbicide resistance in the major weed common ragweed and elucidating the diversity of mechanisms at the root of this resistance. Our study confirmed for the first time the occurrence of resistance to the ALS inhibitors imazamox and tribenuron in common ragweed in France. Resistance was present in several foci scattered across the regions investigated. Resistance was likely emerging in most of the populations where it was detected, with frequencies of resistant plants observed in bioassays in and around a few percent. However, resistance was much more firmly established in a few locations (33–70% resistant plants in three populations in Auvergne Rhône-Alpes, and 43% in one population in Nouvelle Aquitaine). While these rates do not reach those observed in Canada where resistance to ALS inhibitors is widespread and frequent (81% and 100% of ragweed populations uncontrolled by these herbicides in Quebec and in Ontario, respectively, contain substantial frequencies of resistant plants[23,24]), the emergence of resistance observed in our study could herald the beginning of a broad-scale resistance selection if the use of ALS inhibitors is maintained, or even increased to compensate for the decrease in efficacy caused by resistance. Thus, ragweed resistance to ALS inhibitors in France has now become an issue. In areas where common ragweed is widespread and frequent, most applications of ALS inhibitors specifically targeting this weed have been, and still are, performed in sunflower crops or in soybean crops. Indeed, sunflower cultivars resistant to ALS inhibitors were introduced in France in 2010 primarily to allow ragweed control in this crop. Herbicide-resistant sunflower is often included in short rotations including cereal crops, where ALS inhibitors are also used as a weed control solution, or soybean, where imazamox can be applied. As a result of intensive use of ALS inhibitors against common ragweed, resistance has been detected in the two samplings we performed between 2015 and 2019, i.e., half a dozen years after the release of the herbicide-resistant sunflower cultivars. This observation agrees with data from the literature. ALS inhibitors are the herbicide mode of action to which the highest number of resistance cases have been recorded (166 resistant weed species worldwide evolved resistance to these herbicides, and particularly to imazamox and tribenuron[3]). Moreover, common ragweed belongs to the *Asteraceae* taxonomic family, which ranks second in term of the number of species where resistance evolved (45 species so far[3]). Last, the introduction of herbicide-resistant crops has been reported to contribute to the development of herbicide resistance in weeds[25]. As a case in point, the evolution of common ragweed resistance to glyphosate, a low-resistance-risk herbicide[26], was associated to the use of glyphosate-resistant soybean in the USA[27].

So far, resistance to herbicides in common ragweed had only been reported in the species native range, i.e., North-America. Most studies published to date pertain to glyphosate, an herbicide inhibiting 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Among the studies reporting resistance to ALS inhibitors in common ragweed, only three investigated the mechanisms involved. The first two studies each identified a Leu574 ALS allele in one population[20,21]. The third study also reported the presence of a Leu574 ALS allele, in ten additional populations[22]. The presence of other TSR allele(s) was suspected in some populations on the basis of ALS enzyme assays, but the amino-acid substitutions involved were not identified. Thus, only TSR caused by Leu574 ALS allele had previously been reported in common ragweed. This is in contrast to our study, where the unprecedented combination of high-throughput TSR diagnosis, herbicide bioassays and ALS Sanger sequencing unravelled an unsuspected diversity of TSR alleles. We detected a total of nine amino-acid substitutions, of which two had never been reported before. The previously reported Leu574 allele was detected at a very low frequency in one single population (Table 2). It was not, and by far, the most frequent or widespread allele identified in French common ragweed populations (Tables 1, 2). Leu574 ALS allele has been characterised in numerous weeds and is known to confer a high level of resistance to most ALS inhibitors[18,28], including imazamox in common ragweed[22]. A second

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

allele carrying a substitution at the same codon (Trp574Arg) was detected in our work. This allele had only been reported before in the grass *Digitaria sanguinalis* (large crabgrass), where it also conferred a broad resistance pattern[29]. Three alleles carried a substitution at codon 197 (Gln197, Ser197 and Thr197), each previously shown in other species to confer a high resistance to sulfonylureas like tribenuron, and a variable resistance to imidazolinones like imazamox[19]. The same applies to the Glu376 allele identified in our work. Conversely, the Val205 allele was reported to confer a high resistance to imidazolinones and a variable resistance to sulfonylureas[19]. Herein, we demonstrated that this allele confers dominant resistance to both tribenuron and imazamox in common ragweed (Table 3). The last two alleles identified in our survey were both novelties. Characterisation of the resistance endowed by the Thr205 allele yielded results similar to those obtained for the Val205 allele, i.e., dominant resistance to tribenuron and imazamox (Table 3). The last ALS allele identified was a putative TSR allele. It carried a Phe-to-Ile substitution at codon 578. Seven amino-acid substitutions at codon 578 have been studied in yeast or in tobacco laboratory mutants, and shown to alter sensitivity or to confer resistance at least to sulfonylureas herbicides[30,31]. However, ALS alleles carrying a substitution at codon 578 had never been observed before in weed populations from the field. Furthermore, the Phe-to-Ile substitution we identified at position 578 is not among the seven amino-acid substitutions characterised at this codon[30,31]. Herbicide bioassays on plants from the originating fields will be necessary to confirm the novel Ile578 allele is actually a TSR ALS allele, and to characterise its associated resistance phenotype.

The diversity of the ALS alleles detected across common ragweed populations in our French sampling exceeds what had been previously described in most other weed species worldwide. Indeed, up to six variable amino-acid positions were previously recorded in a single species (*Amaranthus retroflexus*), while up to eight amino-acid changes at no more than four positions were described in each of the four species *Apera spica-venti*, *Descurainia sophia*, *Kochia scoparia* and *Schoenoplectus juncoides*[19]. The unprecedented diversity observed in our study is partly attributable to a methodological breakthrough. Indeed, our study is the first broad-scale resistance survey implementing high-throughput genotyping-by-sequencing to detect variants at all known resistance-associated positions within the ALS gene. In the future, applying this method to other pests that have evolved pesticide resistance will undoubtedly reveal more diverse genetic bases for TSR than presently recorded.

Our broad sampling enabled us to detect mutations and resistant plants in very low frequencies, and therefore to detect resistance at its emergence. Previous monitoring studies mostly considered resistance distribution or prevalence at a much more advanced stage[32,33]. In particular, we observed the appearance of TSR clusters, including two independent events of appearance of the Ala205Thr substitution in geographically distant areas. Redundant evolution of TSR by multiple, independent appearances of TSR alleles had been previously observed in other species (e.g.,[34,35]), including species that evolved TSR to ALS inhibitors (e.g., *Papaver rhoeas*[36] and *Amaranthus tuberculatus*[10]). Our results also suggest that once a TSR haplotype has evolved, its geographical spread in a region is rapid. In the 5–8 years that elapsed between the onset of ALS inhibitor selective pressure caused by herbicide-resistant sunflower release and our sampling, one TSR allele (Thr205.2) spread over a distance of c.a. 150 km (Fig. 1). Wind-borne pollen like that of common ragweed is a vector for herbicide resistance (e.g.,[35,37]). However, long-distance dispersal of common ragweed is mainly mediated by seeds moved by human activity, especially agricultural machinery[38]. It is likely that the dispersion of herbicide resistance in common ragweed over an agricultural production basin is promoted by agricultural activities.

While our work unravelled a surprisingly high diversity of TSR alleles in common ragweed, a major outcome of this study was the unexpected predominance of NTSR mechanisms. Indeed, the majority of common ragweed populations where resistance was detected using bioassay did not harbour TSR alleles (Table 2). Occurrence of TSR by increased ALS expression, be it due to enhanced transcription or ALS gene amplification, was ruled out using ALS expression measurement (Supplementary Figure S1). Our results agree with TSR to ALS inhibitors by increased target content being rare, with only one case reported to date in the literature in the grass weed *Hordeum leporinum*[39].

NTSR had already been reported in common ragweed to other herbicides modes of action, such as photosystem II inhibitors[40] and glyphosate[41] in Canada. Ours is the first report worldwide of NTSR to ALS inhibitors in common ragweed. NTSR to ALS inhibitors had already frequently been reported in grass weeds[7,42–44], but very seldom in dicotyledonous weeds, with four species concerned so far: *Amaranthus hybridus*[45], *Sinapis arvensis*[46,47], *P. rhoeas*[48] and *Amaranthus palmeri*[49]. Here, we observed that NTSR is largely distributed in French common ragweed populations and can cause alone high resistance frequencies. Resistance patterns varied with the population, and resistance to both herbicides assayed was not systematically associated. Rather, evolution of NTSR to imazamox alone or to tribenuron alone seemed to be the preferred pattern observed. This is consistent with imazamox-resistant sunflower and tribenuron-resistant sunflower being mutually exclusively grown on vast areas, as a result of the different requirements of the respective cultivars and of competition between agricultural cooperatives. This is also consistent with imazamox and tribenuron displaying different chemistries while acting at the same target site. This data combined to our results suggest that the metabolic pathways involved in imazamox or in tribenuron degradation are at least in part different, and that independent events of evolution of NTSR occurred across France.

Conclusions

In conclusion, our work unravelled an unexpected diversity of herbicide resistance mechanisms in common ragweed in France. Common ragweed is a striking example of multiple, parallel evolution where a diversity of TSR and/or NTSR mechanisms are selected for locally, and combined within populations as well as within individual plants. Common ragweed is a highly genetically variable species. Invasive populations of this weed have especially high levels of genetic diversity due to genetic admixture among different colonization sources[50,51]. This may be a reason why the diversity of resistance mechanisms observed in its invasive range appears greater

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

than reported from its native range. Given the detrimental impact of common ragweed on both agricultural production and human health, it is of high importance to be able to monitor herbicide resistance so as to adapt agricultural practices and keep common ragweed under control. High-throughput resistance diagnosis using massive genotyping-by-sequencing is certainly a tool of choice for this purpose. Yet, implementing such a tool requires genes and mutations at the root of resistance to be identified. While this is the case for TSR, the genetic determinants of NTSR to ALS inhibitors remains unresolved. This is all the more unfortunate that the bulk of resistance in common ragweed seems to be endowed by NTSR mechanisms. There is thus an urgent need to gain a better understanding on the genes and alleles driving common ragweed NTSR to ALS inhibitors.

Materials and methods

Ragweed samplings. Two samplings were conducted in this study (Supplementary Figure S2). To check whether TSR to ALS inhibitors was present in French ragweed populations, a total of 213 agricultural fields were randomly sampled in five regions faced at least locally with high levels of common ragweed infestation: Auvergne Rhône-Alpes (ARA), Bourgogne Franche-Comté (BFC), Centre Val de Loire (CVL), Nouvelle Aquitaine (NAQ) and Occitanie (OCC) (Supplementary Table S1). Areas of high ragweed presence were criss-crossed by car during summer, and fields were sampled on the sole basis of the presence of common ragweed, without any a priori information on the efficacy of herbicides. One leaf was collected on each of 50 different plants per field sampled prior to TSR diagnosis (see below). Populations were sampled between 2015 and 2018. Overall, 18 populations were sampled in 2015, 68 in 2016, 112 in 2017 and 15 in 2018.

In a second step, to assess the relative importance of TSR and NTSR in common ragweed resistance to ALS inhibitors in France, a second, targeted sampling was performed (Supplementary Table S1). Seeds were collected from 43 additional fields selected on the basis of farmers having reported a poor ALS-inhibitor-based control of common ragweed. This information was obtained through the channels of the national French monitoring system of the adverse effects of phytosanitary products. The fields sampled had in common a history of ALS-inhibiting herbicide applications against common ragweed, but the detail of this history could not be obtained. They were mostly cultivated with sunflower cultivars resistant to ALS inhibitors, with soybean or with maize. Tribenuron (a sulfonylurea) and imazamox (an imadazolinone) were largely the main ALS-inhibiting herbicides applied in these fields. In every field, ripe seeds were collected as a bulk from at least 30 different common ragweed plants. Seeds batches were stored at room temperature for at least 3 months to allow post-ripening before being used for resistance analysis. Populations were sampled between 2017 and 2019. Overall, 28 populations were sampled in 2017, 8 in 2018 and 7 in 2019.

This study complies with the French legislation and institutional guidelines. Permission for collection of ragweed leaves and seeds were obtained in the framework of the monitoring system of the adverse effects of phytosanitary products instituted by the French law of October 13, 2014 on the future of agriculture.

TSR detection using Illumina high-throughput sequencing technology. The 213 randomly sampled common ragweed populations were analysed following the protocol described in a previous study[52]. Briefly, discs were punched out of the 50 leaves representing each population, pooled in one tube per population and ground in liquid nitrogen. DNA extraction was performed following the rapid DNA extraction procedure described in a previous study[53]. DNA extracts were stored at − 20 °C. PCR were performed on diluted DNA extracts (1/10) and mixes prepared as described[52]. The PCR programs consisted of 3 min at 95 °C, followed by 37 cycles of 5 s at 95 °C, 10 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. Three regions of the ALS gene were amplified separately from each DNA extract with the primer pairs including overhang adapter sequences at their 5′ end described elsewhere[52]. These regions carried the eight codons involved in TSR to ALS inhibitors (codons 122, 197, 205, 376, 377, 574, 653 and 654, as standardised after *Arabidopsis* ALS sequence)[28] and seven additional codons potentially involved in TSR (codons 121, 124, 196, 199, 375, 571 and 578)[54]. All three amplicons were subsequently pooled in an equimolar mix for each population. Each of the 213 resulting mixes was tagged with one specific index. Tagged amplicons were purified and loaded onto one Illumina MiSeq V3 cartridge according to the manufacturer instructions. The 250-nucleotide pair-end sequences passing Illumina standard quality controls were assigned to their population of origin on the basis of the population-specific indexes. Nucleotide changes causing amino-acid substitutions at the 15 ALS codons targeted were sought in each population using the R-based pipeline described elsewhere[52]. Briefly, the reads were aligned to a reference sequence of common ragweed ALS (GenBank accession KX870184). Variant calling was performed at each of the nucleotide positions in the 15 targeted codons where nucleotide changes were predicted to cause amino-acid substitutions. To account for Illumina sequencing errors, we applied a frequency threshold of 1% for the detection of any such change. Then, frequencies of single-nucleotide substitutions at the 15 ALS codons implicated in herbicide resistance were calculated in every pool of 50 plants.

Resistance detection using herbicide sensitivity bioassays. Seeds were stratified at 4 °C during one month to break dormancy and transferred to a growth chamber for germination (photoperiod of 16 h, 20 °C/15 °C day/night). After germination, seedlings at the cotyledon stage were transplanted into plastic trays (17 × 12.5 × 5.5 cm) filled with 60% silt-loam soil, 15% sand, 15% perlite and 10% peat by volume and placed in a greenhouse (20 °C/15 °C day/night with a 16 h photoperiod). Plants were watered as needed until the two-to-four leaf stage, when they were subjected to herbicide treatment. Each tray contained 20 seedlings. Two trays per population (40 seedlings) were sprayed per herbicide dose, and one tray per population (20 seedlings) was sprayed with water and served as the untreated control. Herbicides were applied using a custom-built, single-nozzle (nozzle AXI 110°06; Albuz, France) sprayer delivering herbicide in 300 L ha^{-1} water at 400 kPa under a temperature of 23 °C and a relative humidity of 80%. The two major ALS inhibitors used to control com-

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

mon ragweed in France were sprayed as commercial formulations at their respective, maximum recommended French field rate. The commercial herbicides used were Express SX® (FMC, 50% w/w tribenuron, field rate of 30 g tribenuron ha^{-1}) with 1 L ha^{-1} surfactant (Actirob B®, Bayer CropScience), and Pulsar 40® (BASF, 40 g L^{-1} imazamox, field rate of 50 g imazamox ha^{-1}) with 1.25 L ha^{-1} surfactant (Dash®, BASF).

Every spraying experiment included one batch of 20 plants from the reference population P08 (100% plants sensitive to any herbicide used to control ragweed and applied at the recommended French field rate) for each of the herbicides and herbicide rates assayed, as a check for herbicide application efficiency. Phenotype rating based on visual injury was performed four weeks after treatment, when all plants from the reference population were clearly dead and plant phenotype rating could be performed without ambiguity. Preliminary experiments demonstrated that plants with visually estimated biomass ranging from unaffected by herbicide application (identical to the untreated control plants, 100%) down to ≥ 50% of that of the untreated control plants ultimately recovered and were able to produce viable seeds. They were thus considered resistant. Plants injured and with a visually estimated biomass < 50% of that of the untreated control plants ultimately died. These plants and the plants dead at the time of rating were thus considered sensitive. After phenotype rating, one leaf fragment was collected on plants rated resistant and stored at − 20 °C prior to ALS gene Sanger sequencing.

ALS gene Sanger sequencing and genotyping. DNA was extracted as before from the leaf fragments collected on the resistant plants. The ALS gene was amplified as two overlapping fragments encompassing the whole ALS coding sequence. A 1237-nucleotide amplicon was amplified using primers ALA5 (5′-IAICACACT CATTCAACAATGGC-3′ where I indicates an inosine base) and ALA4R (5′-CAAAATCTCGTTAAGCCCCTG TAAC-3′), and a 667-nucleotide amplicon was amplified using primers ALA6 (5′-GGGTCGGGCAGCATCAGA TG-3′) and ALA1R (5′-ACTGATCCATAACATTCATAACCAG-3′). PCR mixes were as before. For both PCRs, cycling programs consisted of 95 °C 3 min followed by 40 cycles of 95 °C 10 s, 60 °C 15 s and 72 °C 90 s. Both fragments were amplified from each individual plant in three independent PCRs and subsequently sequenced on both strands using Sanger sequencing. The 15 codons screened by Illumina genotyping-by-sequencing where visually checked from Sanger chromatograms using the BioEdit software.

Haplotype networks for mutant ALS alleles. All sequence reads obtained either from Sanger sequencing or from Illumina sequencing were aligned and compared within and among the populations where they had been detected. Common ragweed is a diploid species[15], and some of the plants carrying a mutant allele were heterozygous. In these cases, the Sanger sequence of the heterozygous plant was aligned with homozygous sequences obtained from the same population, and its mutant haplotype was deduced from the alignment. When mutant alleles had been identified by Illumina sequencing, the paired reads encompassing the mutant codon were merged before alignment. To account for Illumina sequencing errors, only polymorphisms present at a frequency > 1% of the total of the reads were considered. Haplotype networks were inferred with PopART[55] using the Median joining method.

Cross-resistance pattern of the two major ALS TSR alleles to imazamox and tribenuron. The most common and widespread TSR alleles identified carried an Ala205Val or an Ala205Thr substitution. To characterize their cross-resistance pattern to imazamox and tribenuron, common ragweed populations where these alleles were present in high frequencies were required. This criterion was fulfilled for the Val205 allele (populations ARA5 and ARA7, Table 2) but not for the Thr205 allele that was present with a maximum frequency of 16% in the populations sampled (population OCC10, Table 2). To overcome this issue, two populations segregating the Thr205 allele were obtained by separately bulk-crossing two batches of a dozen plants each from population OCC10. The presence of the Thr205 allele at the homozygous or heterozygous state in each of the parental plants had been ascertained beforehand by dCAPS genotyping (see below). The two field populations and the two bulked segregating progenies were subjected to herbicide sensitivity bioassays. To correlate plant phenotype and genotype at the ALS gene, plants were individually identified from their position in the growing tray (40 plants per population and per herbicide), and a piece of young leaf tissue was collected 24 h before herbicide application and stored at − 20 °C until ALS genotyping. Plants were individually genotyped at ALS codon 205 using the derived Cleaved Amplified Polymorphism Sequence technique (dCAPS[56]) and applying previously described guidelines[57]. The dCAPS primer ALAMwoI (5′-GCTATAACTGGTCAAGTTCCA AGAAGAATGATTGCAACAG-3′) introduces a *Mwo*I restriction site in ALS sequences encoding an alanine residue at codon 205 (wild-type). Any substitution at any of the 2 first nucleotides in codon 205 shall remove this restriction site (substitutions at the third nucleotide in codon 205 are silent). This primer was used in PCR with primer ALA7R (5′-GACAAATAACCCGGTAACCTCATAGG-3′). PCR mixes were as before. Cycling program consisted of 95 °C 5 min followed by 37 cycles of 95 °C 5 s, 65 °C 10 s and 72 °C 30 s. Digestion was performed at 37 °C for 3 h using 5 µL digestion mix of *Mwo*I isoschizomer *Hpy*F10VI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 5 µL of the PCR mix. dCAPS patterns were visualised by electrophoresis on 3% agarose gel in 0.5× TBE Buffer. The genotype of each plant was associated to its phenotype after herbicide bioassay rating.

Relative ALS gene expression between sensitive and resistant plants. A number of plants surviving ALS inhibitor application did not carry TSR allele(s). To investigate the possibility of these plants being resistant because of an increased content in ALS, the relative expression level of this gene was compared between resistant and sensitive plants in four populations. These populations were selected for their relatively high frequencies of plants resistant to at least one of the herbicides tested (imazamox for population ARA2, tribenuron for population NAQ8, and both herbicides for populations ARA8 and OCC13). Ninety-six individual plants per population were grown in 96-well trays to individualise each seedling, as well as eight plants from the reference

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

population P08. At the four-leaf stage, the apical bud of each plant was harvested in liquid nitrogen in 2 mL tubes containing steel beads and stored at − 80 °C. Twenty-four hours after bud collection, plants were sprayed with imazamox or tribenuron, as described previously. Plant phenotype was rated as previously.

Total RNA extraction of apical buds was performed using the Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo research) kit and following the manufacturer's instructions. Total RNA concentration and quality were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (LABTECH, Luton, UK). cDNA was synthesised from 1 µg total RNA of quality samples using the Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). qPCR was performed from eightfold diluted cDNA samples using the Viaa7 system (Applied Biosystem). A seven-point standard curve based on a two-fold dilution series (from 1:2 to 1:128) of a pool of cDNAs from resistant and sensitive plants was included in the experiment as a control for the efficiency of the qPCR. The relative expression level of the ALS gene was compared between resistant and sensitive plants using the $2\Delta\Delta C_t$ method[58] after normalisation with three reference genes validated beforehand following the recommendations of[59] (Supplementary Table S2). The plants from the reference population P08 were used as the reference sample for ALS expression normalisation. ALS relative expression levels of resistant and sensitive plants were compared within each of the four populations using a non-parametric Wilcoxon test.

Received: 21 June 2021; Accepted: 22 September 2021
Published online: 07 October 2021

References

1. Oerke, E.-C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* **144**, 31–43 (2006).
2. R4P Network. Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends Plant Sci.* **21**, 834–853 (2016).
3. Heap, I. M. The international herbicide-resistant weed database. http://www.weedscience.org/Home.aspx (2021).
4. Délye, C., Jasieniuk, M. & Le Corre, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet.* **29**, 649–658 (2013).
5. Gaines, T. A. *et al.* Mechanisms of evolved herbicide resistance. *J. Biol. Chem.* **295**, 10307–10330 (2020).
6. Murphy, B. P. & Tranel, P. J. Target-site mutations conferring herbicide resistance. *Plants* **8**, 382 (2019).
7. Beckie, H. J. & Tardif, F. J. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot.* **35**, 15–28 (2012).
8. Han, H. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. *Plant J.* **105**, 79–92 (2021).
9. Kreiner, J. M. *et al.* Multiple modes of convergent adaptation in the spread of glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 21076–21084 (2019).
10. Milani, A. *et al.* Population structure and evolution of resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibitors in *Amaranthus tuberculatus* in Italy. *Pest Manag. Sci.* **77**, 2971–2980 (2021).
11. Clements, D. R. *et al.* Adaptability of plants invading North American cropland. *Agric. Ecosyst. Environ.* **104**, 379–398 (2004).
12. Essl, F. *et al.* Biological flora of the British Isles: *Ambrosia artemisiifolia*. *J. Ecol.* **103**, 1069–1098 (2015).
13. Cowbrough, M. J., Brown, R. B. & Tardif, F. J. Impact of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) aggregation on economic thresholds in soybean. *Weed Sci.* **51**, 947–954 (2003).
14. Swinton, S. M., Buhler, D. D., Forcella, F., Gunsolus, J. L. & King, R. P. Estimation of crop yield loss due to interference by multiple weed species. *Weed Sci.* **42**, 103–109 (1994).
15. Bassett, I. J. & Crompton, C. W. The biology of Canadian weeds: *Ambrosia artemisiifolia* L. and *A. psilostachya* DC. *Can. J. Plant Sci.* **55**, 463–476 (1975).
16. Chauvel, B., Dessaint, F., Cardinal-Legrand, C. & Bretagnolle, F. The historical spread of *Ambrosia artemisiifolia* L. France from herbarium records. *J. Biogeogr.* **33**, 665–673 (2006).
17. Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E. & Ramos, M. L. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia* **35**, 57–69 (2012).
18. Yu, Q. & Powles, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Manag. Sci.* **70**, 1340–1350 (2014).
19. Tranel, P. J., Wright, T. R. & Heap, I. M. ALS mutations from resistant weeds. http://www.weedscience.com (2021).
20. Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Alexander, A. L. & Schmitzer, P. R. A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. *Weed Sci.* **49**, 485–490 (2001).
21. Rousonelos, S. L., Lee, R. M., Moreira, M. S., VanGessel, M. J. & Tranel, P. J. Characterization of a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) population resistant to ALS- and PPO-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* **60**, 335–344 (2012).
22. Zheng, D., Patzoldt, W. L. & Tranel, P. J. Association of the W574L ALS substitution with resistance to cloransulam and imazamox in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Sci.* **53**, 424–430 (2005).
23. Van Wely, A. C. *et al.* Glyphosate and acetolactate synthase inhibitor resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in southwestern Ontario. *Can. J. Plant Sci.* **95**, 335–338 (2015)
24. Marsan-Pelletier, F., Vanasse, A., Simard, M.-J. & Cuerrier, M.-E. Survey of imazethapyr-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Quebec. *Phytoprotection* **99**, 36–44 (2019).
25. Owen, M. D. & Zelaya, I. A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci.* **61**, 301–311 (2005).
26. Duke, S. O. & Powles, S. B. Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* **64**, 319–325 (2008).
27. Barnes, E. R., Knezevic, S. Z., Sikkema, P. H., Lindquist, J. L. & Jhala, A. J. Control of glyphosate-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in glufosinate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Front. Plant Sci.* **8**, 1455 (2017).
28. Tranel, P. J. & Wright, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned?. *Weed Sci.* **50**, 700–712 (2002).
29. Li, J., Li, M., Gao, X. & Fang, F. A novel amino acid substitution Trp574Arg in acetolactate synthase (ALS) confers broad resistance to ALS-inhibiting herbicides in crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Manag. Sci.* **73**, 2538–2543 (2017).
30. Duggleby, R. G., Pang, S. S., Yu, H. & Guddat, L. W. Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2895–2904 (2003).
31. Jung, S.-M. *et al.* Amino acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* **383**, 53–61 (2004).
32. Owen, M. J., Walsh, M. J., Llewellyn, R. S. & Powles, S. B. Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. *Aust. J. Agric. Res.* **58**, 711–718 (2007).
33. Owen, M. J., Martinez, N. J. & Powles, S. B. Multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* (annual ryegrass) now dominates across the Western Australian grain belt. *Weed Res.* **54**, 314–324 (2014).
34. Délye, C. Nucleotide variability at the acetyl coenzyme A carboxylase gene and the signature of herbicide selection in the grass weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.). *Mol. Biol. Evol.* **21**, 884–892 (2004).
35. Délye, C., Clément, J. A. J., Pernin, F., Chauvel, B. & Le Corre, V. High gene flow promotes the genetic homogeneity of arable weed populations at the landscape level. *Basic Appl. Ecol.* **11**, 504–512 (2010).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

36. Délye, C., Pernin, F. & Scarabel, L. Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Sci.* **180**, 333–342 (2011).
37. Sudheesh, M. An analysis of polygenic herbicide resistance evolution and its management based on a population genetics approach. *Basic Appl. Ecol.* **16**, 104–111 (2015).
38. Bullock, J. M. Assessing and controlling the spread and the effects of common ragweed in Europe. *Report, Contractor: Natural environment research Council UK* (2012).
39. Yu, Q., Nelson, J. K., Zheng, M. Q., Jackson, J. & Powles, S. B. Molecular characterisation of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. *Pest Manag. Sci.* **63**, 918–927 (2007).
40. Simard, M.-J., Laforest, M., Soufiane, B., Benoit, D. L. & Tardif, F. Linuron resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations in Quebec carrot fields: presence and distribution of target-site and non-target site resistant biotypes. *Can. J. Plant Sci.* **98**, 345–352 (2017).
41. Ganie, Z., Jugulam, M., Varanasi, V. & Jhala, A. J. Investigating mechanism of glyphosate resistance in a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) biotype from Nebraska. *Can. J. Plant Sci.* (2017). https://doi.org/10.1139/CJPS-2017-0036.
42. Duhoux, A., Carrère, S., Duhoux, A. & Délye, C. Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium* sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. *Plant Sci.* **257**, 22–36 (2017).
43. Gardin, J. A. C., Gouzy, J., Carrère, S. & Délye, C. ALOMYbase, a resource to investigate non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in the major grass weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *BMC Genomics* **16**, 590 (2015).
44. Torra, J. *et al.* Target-site and non-target-site resistance mechanisms confer multiple and cross- resistance to ALS and ACCase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* from Spain. *Front. Plant Sci.* **12**, 625138 (2021).
45. Manley, B. S., Hatzios, K. K. & Wilson, H. P. Absorption, translocation, and metabolism of chlorimuron and nicosulfuron in imidazolinone-resistant and susceptible smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). *Weed Technol.* **13**, 759–764 (1999).
46. Jeffers, G. M., O'Donovan, J. T. & Hall, L. M. Wild mustard (*Brassica kaber*) resistance to ethametsulfuron but not to other herbicides. *Weed Technol.* **10**, 847–850 (1996).
47. Veldhuis, L. J., Hall, L. M., O'Donovan, J. T., Dyer, W. & Hall, J. C. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2986–2990 (2000).
48. Scarabel, L., Pernin, F. & Délye, C. Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Sci.* **238**, 158–169 (2015).
49. Nakka, S., Thompson, C. R., Peterson, D. E. & Jugulam, M. Target site-based and non-target site based resistance to ALS Inhibitors in Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Sci.* **65**, 681–689 (2017).
50. Meyer, L. *et al.* New gSSR and EST-SSR markers reveal high genetic diversity in the invasive plant *Ambrosia artemisiifolia* L. and can be transferred to other invasive *Ambrosia* species. *PLOS ONE* **12**, e0176197 (2017).
51. Van Boheemen, L. A. *et al.* Multiple introductions, admixture and bridgehead invasion characterize the introduction history of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe and Australia. *Mol. Ecol.* **26**, 5421–5434 (2017).
52. Délye, C. *et al.* Harnessing the power of next-generation sequencing technologies to the purpose of high-throughput pesticide resistance diagnosis. *Pest Manag. Sci.* **76**, 543–552 (2020).
53. Délye, C., Matéjicek, A. & Gasquez, J. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Manag. Sci.* **58**, 474–478 (2002).
54. Duggleby, R. G., McCourt, J. A. & Guddat, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 309–324 (2008).
55. Leigh, J. W. & Bryant, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* **6**, 1110–1116 (2015).
56. Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. & Pepper, A. E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: Experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* **14**, 387–392 (1998).
57. Délye, C. & Boucansaud, K. A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Res.* **48**, 97–101 (2008).
58. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2ddCT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
59. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).

Acknowledgements

The authors acknowledge all the people in the field who contributed to seed and leaf collection. The high-throughput sequencing analyses performed at USC Casper and herbicide sensitivity assays were supported by Anses as part of the implementation of the monitoring system of the adverse effects of phytosanitary products instituted by the French law of October 13, 2014 on the future of agriculture (Phytopharmacovigilance). Ragweed sampling was funded by Phytopharmacovigilance and by the Direction Générale de l'Alimentation of the French Ministère de l'Agriculture within the framework of the Écophyto 2 national plan. The development of the high-throughput sequencing technique and the analyses carried out at INRAE Dijon were supported by the French Agency for Biodiversity, within the framework of the Écophyto 2 national plan (research project ENI-VTH), and by BASF France SAS. I.L. was supported by INRAE, Département Santé des Plantes et Environnement, and ACTA—Les instituts techniques agricoles.

Author contributions

I.L., B.B., V.L.C. and C.D. designed the experiments; I.L., L.C. S.F., S.M., F.P. performed the experiments; I.L., B.B., C.D., V.L.C. performed data analysis, I.L., B.B., V.L.C. generated figures, I.L., B.B., V.L.C., C.D. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-021-99306-9.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2021

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3.2. Détection et quantification, à l'aide d'outils de séquençage à haut débit, d'allèles impliqués dans la résistance aux fongicides chez l'agent de la cercosporiose de la betterave (*Cercospora beticola*)

VÉGÉPHYL – 13e CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
ORLÉANS – 6, 7 et 8 DÉCEMBRE 2022

Détection et quantification, à l'aide d'outils de séquençage haut débit, d'allèles impliqués dans la résistance aux fongicides chez l'agent de la cercosporiose de la betterave (*Cercospora beticola*)

S. FONTAINE[(1)], L. CADDOUX[(1)], P. LUCAS[(2)], Y. BLANCHARD[(2)], B. BARRÈS[(1)]
[(1)] Université de Lyon, Anses, INRAE, USC CASPER, Lyon, France –
[(2)] Anses, UGVB, Ploufragan, France –
Tél : 04.78.69.68.37 – email : severine.fontaine@anses.fr

Résumé: Un outil de séquençage haut débit pour quantifier les allèles de résistance à trois modes d'action fongicides chez *Cercospora beticola* a été validé sur des populations artificielles et du terrain.
Mots-clés : Séquençage haut débit, résistance de cible, fongicide, détection, surveillance.
Keywords: Next Generation Sequencing, target site resistance, fungicide, detection, surveillance

INTRODUCTION

Dans un contexte où la diversité des modes d'action autorisés se restreint et où une réduction de l'utilisation des produits de protection des plantes (PPP) est souhaitée, la surveillance des résistances des bioagresseurs des cultures aux PPP est primordial pour préserver l'efficacité des produits. Les outils de séquençage haut débit (SHD) représentent une solution pour détecter et quantifier au niveau populationnel des allèles connus comme impliqués dans la résistance aux fongicides. Ils offrent de plus l'avantage de détecter de nouveaux variants qui nécessiteront toutefois d'être caractérisés par tests biologiques afin de déterminer leur implication potentielle dans la résistance. Notre étude présente une validation d'un outil de SHD pour quantifier simultanément les différents allèles de gènes cibles de trois familles de fongicides chez *Cercospora beticola*, l'agent de la cercosporiose de la betterave.

APPROCHE METHODOLOGIQUE

Deux types d'échantillons ont été analysés : des populations artificielles (aux proportions connues d'allèles sensibles et résistants) et des prélèvements de terrain. Les populations artificielles, réalisées à partir d'ADN de souches monospores de phénotypes et de génotypes connus de *C. beticola* (Tableau 1), ont été analysées en triplicatas afin de vérifier la répétabilité de la méthode de SHD. A l'exception de la souche sensible, ces souches étaient porteuses d'au moins une des mutations suivantes : G143A sur le cytochrome *b* (résistance vis-à-vis des QoI), E198A sur la *β*-tubuline (résistance vis-à-vis des benzimidazoles) et L144F, E460Q et Y464S sur *Cyp51* (substitutions identifiées chez des souches résistantes aux triazoles, Tableau 1). Une extraction d'ADN a été réalisée indépendamment pour chaque souche. Les populations artificielles ont ensuite été constituées par mélange des solutions d'ADN individuelles pour obtenir des fréquences d'allèles mutés s'étendant de 1 à 50%.

Tableau 1 : Caractéristiques des souches utilisées pour la constitution des populations artificielles
Table 1: Characteristics of strains used for constitution of artificial populations

Références isolats	Cytochrome *b*	*β*-tubuline	*Cyp51*			Remarques
	codon 143	codon 198	codon 144	codon 460	codon 464	
19-0330-001	G	E	L	E	S	sensible
19-0247-002	A	E	F	Q	S	Résistante aux QoI et aux triazoles (avec 2 mutations /*Cyp51*)
19-0327-009	A	E	L	E	Y	Résistante aux QoI et aux triazoles
20-0226-003	G	A	F	E	S	Résistante aux inhibiteurs de la *β*-tubuline et au triazoles

Cinq prélèvements de terrain, réalisés par l'Institut Technique de la Betterave et constitués de 50 feuilles ont été échantillonnés au laboratoire en prélevant à l'emporte-pièce 50 lésions isolées de cercosporiose (une par feuille). Les ADN des 50 lésions mélangées ont été extraits.
Pour les deux types de prélèvement, l'analyse consiste en une étape d'amplification par PCR des 3 gènes étudiés, puis après purification, d'une étape de SHD des produits PCR mélangés et étiquetés par population. Après alignement, sur des séquences de référence (*i.e.* non mutées) des séquences

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

obtenues en SHD, la fréquence nucléotidique de chacune des bases a été calculée pour toutes les positions de chacun des gènes et pour chacune des populations étudiées.

PRINCIPAUX RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats du SHD réalisé sur les populations artificielles ont montré une bonne adéquation entre les pourcentages d'allèles attendus et ceux mesurés (Tableau 2), à l'exception d'une mutation dont les fréquences mesurées sont plus faibles qu'attendues (E198A). Une moins bonne estimation de la concentration d'ADN de la souche porteuse de cette mutation est suspectée.

Tableau 2 : Fréquences des allèles attendues et mesurées en SHD pour les populations artificielles
Table 2: Allele frequencies expected and assayed by NGS for artificial populations analysed

% d'allèle attendu	Cytochrome *b*		*β*-tubuline		*Cyp51*					
	% G143A	Ecart type % G143A	% E198A	Ecart Type % E198A	% L144F	Ecart type % L144F	% E460Q	Ecart type % E460Q	% Y464S	Ecart type % Y464S
1	n.t.	n.t.	n.d	-	1,12	0,96	1,06	0,06	n.d	-
2	1,40	0,34	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
5	n.t.	n.t.	1,87	0,56	7,89	1,60	4,43	0,72	3,08	0,27
10	8,15	0,36	3,55	0,23	16,0	1,95	9,83	0,50	6,68	0,86
20	17,6	0,88	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
25	n.t.	n.t.	12,0	1,10	n.t.	n.t.	27,1	0,24	22,7	2,51
50	53,6	2,59	n.t.	n.t.	42,20	2,25	43,1	5,60	n.t.	n.t.
R^2 attendu vs mesuré	0,995		0,988		0,999		0,982		0,995	

n.t. : non testé ; n.d. : non détecté, n.t.: not tested ; n.d.: not detected

Pour les cinq populations de terrain, les résultats ont mis en évidence (i) l'omniprésence de la substitution G143A affectant le cytochrome *b* (résistance aux QoI, Figure 1A) (ii) une fréquence variable selon les populations de la mutation E198A (résistance aux inhibiteurs de la *β*-tubuline, Figure 1B) et (iii) une fréquence élevée de la mutation L144F dans toutes les populations (impliquée dans la résistance aux triazoles, Figure 1C). D'autres mutations affectant *Cyp51* ont été identifiées dont I309T, dans 3 populations, mutation déjà trouvée en association avec L144F chez *C. beticola*. Enfin 5 autres mutations, dont une inédite chez *C. beticola* (M145L), ont été détectées à de faibles fréquences dans une ou deux populations (I387M, E460Q, D461E et Y464S). L'effet de M145L devra être validé par test biologique mais elle a déjà été décrite comme impliquée dans une perte de sensibilité vis-à-vis des triazoles chez *Venturia inaequalis* et *Mycosphaerella graminicola*. La distribution de ces résistances est cohérente avec les résultats des tests biologiques d'une étude antérieure (projet RECIFE).

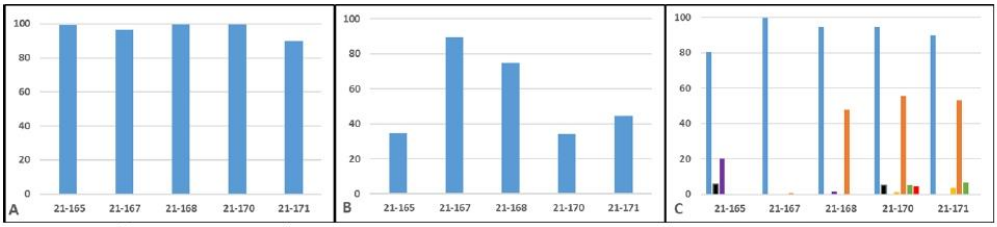


Figure 1 : Fréquences mesurées pour les populations de terrain pour G143A (cytochrome *b*, A), E198A (*β*-tubuline, B) et pour L144F en bleu, M145L en jaune, I309T en orange, I387M en vert, E460Q en noir D461E en rouge et Y464S en violet (*Cyp51*, C)

Figure 1: Assayed frequencies in field populations for G143A (cytochrome *b*, A), E198A (*β*-tubulin, B) and L144F in blue, M145L in yellow, I309T in orange, I387M in green, E460Q in black, D461E in red and Y464S in purple (*Cyp51*, C)

CONCLUSION

Le SHD apparait comme une technique performante pour étudier au niveau populationnel les résistances liées à la modification de la cible, lorsque la ou les mutation(s) impliquée(s) ont été au préalable caractérisée(s). Il est cependant essentiel de garder à l'esprit que d'autres mécanismes non liés à la cible peuvent induire des résistances aux PPP et que la caractérisation ainsi que le suivi à l'aide de tests biologiques resteront donc indispensables.

FINANCEMENT : Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet QUANTALL qui a été financé via un Appel à Manifestation d'Intérêt Transversalités inter-laboratoires ANSES impliquant l'USC CASPER, la Plateforme de génomique de Ploufragan et la DER.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'évolution de résistances aux PPP chez les bioagresseurs des cultures est un processus micro-évolutif commun et récurrent. Au cours de ma carrière, j'ai pu étudier plusieurs phénomènes de résistances sur différents bioagresseurs à l'aide d'une diversité d'approches moléculaires en vue de mieux surveiller et de mieux comprendre leurs mécanismes sous-jacents. Les publications présentées dans la partie précédente illustrent la complexité et la diversité des mécanismes qui peuvent évoluer au sein des populations d'une espèce de bioagresseur, voire au sein même d'un bioagresseur. Les résultats présentés dans chacun de ces articles ont déjà été discutés dans leur section respective. J'ai donc choisi d'orienter la discussion générale en abordant des thématiques transversales et communes à mes travaux tout en tenant compte des différentes avancées en lien avec ceux-ci. Ainsi, je tenterai d'apporter des éléments de réponses aux questions suivantes : 1) Quels sont les nouveaux défis afférant à la caractérisation et à la surveillance des résistances impliquant divers mécanismes, qu'ils soient ou non liés à la cible ? 2) Quels sont les enjeux et limites associés à l'évaluation des coûts biologiques relatifs à la résistance ? 3) En quoi une connaissance approfondie de la biologie des bioagresseurs contribue-t-elle à la compréhension des phénomènes de résistance et à la surveillance de leur évolution ?

- *Quels sont les nouveaux défis afférant à la caractérisation et à la surveillance des résistances impliquant divers mécanismes, qu'ils soient ou non liés à la cible ?*

Dans la présentation de mes travaux, j'ai pu montrer que les résistances mises en évidence par les approches phénotypiques ne sont que rarement dues à un unique mécanisme. Aux mécanismes de résistance reposant sur des modifications de la cible, principalement des mutations, facilement caractérisables et identifiables, coexistent des mécanismes de résistance non liés à la cible dont les mécanismes sous-jacents sont beaucoup plus complexes à identifier. Ces derniers peuvent être, d'une part, responsables de niveaux de résistance moindres et, d'autre part, du fait de l'existence concomitante de mécanismes liés à la cible il peut être plus difficile de démêler leurs contributions respectives. Dans ces conditions, comment évaluer la contribution du ou des mécanisme(s) non lié(s) à la cible dans le phénotype résistant observé ?

Dans mes publications sur la résistance aux fongicides inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire, les résultats montrent la coexistence de mécanismes impliquant la modification de la cible cellulaire avec d'autres mécanismes, tels qu'une voie alternative reposant sur une oxydase alternative (AOX). Ce mécanisme, bien que non lié à la cible, reste assez facilement identifiable en l'absence de résistance liée à la cible vis-à-vis de l'amisulbrom. Le rôle de l'AOX et son implication dans la résistance a initialement fait débat. Moins productrice en ATP (40%) (Fernández-Ortuño et al, 2008), elle a été considérée comme insuffisante pour les processus qui demandent le plus d'énergie, comme la germination des spores et la pénétration de l'hôte. Cependant, chez *P. viticola,* une augmentation régulière de l'AOX en occurrence et en fréquence a clairement été mise en évidence dans les données présentées dans ce manuscrit et issues de la surveillance de la résistance aux PPP organisée

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

dans le cadre de la surveillance biologique du territoire. Cet accroissement s'est poursuivi ensuite puisque, lors du dernier monitoring réalisé dans l'unité CASPER en 2024, 95% des populations analysées présentaient des souches avec une résistance AOX (données non encore publiées). L'augmentation continue des phénotypes AOX soulève la question de l'impact de ces mécanismes sur les efficacités au champ des substances actives inhibitrices du cytochrome *b* pour lesquelles les mutations de la cible n'existent pas ou sont peu fréquentes. Les rares essais d'efficacité menés au champ avec des inocula contrôlés composés d'une proportion variable de souches avec un phénotype résistant AOX ont d'ailleurs montré que les efficacités de molécules QiI et QioI étaient impactées dès 10% de phénotypes AOX-résistants (Panon et al, 2018). Au-delà de son implication dans la résistance aux inhibiteurs du complexe III chez des champignons pathogènes des plantes (Steinfeld et al, 2001 ; Küng Färber et al, 2002 ; Miguez et al, 2004 ; Xu et al, 2013 ; Thomazella et al, 2012), des recherches se sont également intéressées aux fonctions biologiques de l'AOX que cela soit chez les champignons pathogènes des plantes et des humains (Lin et al 2019 ; Avila-Adame et al, 2002 ; Tian et al, 2020). Elles ont montré que cette enzyme jouait également un rôle dans la réponse à un stress oxydatif ou osmotique et dans la pathogénicité. Concernant la résistance aux fongicides, l'AOX contribuerait également à une sensibilité réduite aux fongicides IDM chez *Candida albicans*, en diminuant la production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène lors de l'exposition au fluconazole, une triazole antifongique (Yan et al, 2009). La littérature récente semble témoigner d'un regain d'intérêt porté à l'AOX en tant que cible potentielle de molécules inhibitrices, comme en témoignent les publications sur ce sujet ces dernières années (Misselbrook, 2019 ; Tian et al, 2020 ; Rosell-Hidalgo et al, 2021 ; Szibor et al, 2022 ; Edrich et al, 2024 ; Li et al, 2024). Pour ces raisons, mieux caractériser cette voie alternative et son implication tant dans des fonctions biologiques, que dans la RNLC aux inhibiteurs du complexe III, à l'aide des approches invalidant le gène (mutants) ou son expression (RNAi) chez un plus grand nombre d'agents phytopathogènes, dont *P. viticola* serait intéressant.

Les RNLC sont également souvent plus complexes à caractériser du fait de leur caractère couramment polygénique. Ainsi, l'identification des déterminants génétiques de ces mécanismes peut parfois devenir un véritable défi. Les travaux présentés et auxquels j'ai contribué sur *M. persicae* et *A. artemisiifolia* soulignent également l'existence de mécanismes non liés à la cible. Chez *M. persicae*, au mécanisme de résistance aux néonicotinoïdes impliquant la mutation de la cible affectant la sous unité *β* du récepteur (R81T), s'ajoute un mécanisme impliquant la surexpression de cytochromes P450 appartenant à la famille des CYP6 (Puinean et al, 2010). La surexpression est liée à la duplication de gènes codant ces cytochromes P450 et plus précisément à leur surexpression. Ce mécanisme est donc assez aisément caractérisable par des approches de biologie moléculaire quantitative. Néanmoins, ces deux mécanismes (mutation R81T et surexpression de certains CYP6), ainsi que leurs interactions, n'expliquent que partiellement la variabilité de sensibilité aux néonicotinoïdes observée chez les différentes phénotypes R81T, comme cela a été montré dans les travaux publiés par Mottet et al (2024). Cette diversité de sensibilité est en faveur de l'existence de mécanismes de résistance additionnels liés à la cible ou non. Par exemple, on ne peut exclure l'existence d'autres mutations qui pourraient affecter le récepteur nicotinique à l'acétylcholine. L'existence d'une seconde mutation (V101I) affectant également la sous unité *β* du récepteur nicotinique et impliquée dans une baisse de sensibilité aux néonicotinoïdes a d'ailleurs été identifiée récemment en Chine (Xu et al, 2022). Absente de nos clones (Mottet

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

et al, 2024), cette dernière n'explique donc pas la variabilité observée. D'autres mécanismes additionnels n'affectant pas la cible pourraient par exemple impliquer une modulation du niveau d'expression du récepteur nicotinique, une variabilité de l'activité intrinsèque des cytochromes P450 impliqués dans la résistance, ou encore d'autres enzymes de détoxication. De plus amples investigations seraient donc nécessaires pour identifier ces mécanismes additionnels et pour évaluer leur contribution réelle dans la variabilité des phénotypes résistants et permettre éventuellement le développement d'autres outils de diagnostic.

Dans le cas des inhibiteurs du complexe III et de la résistance aux néonicotinoïdes, les mécanismes de RLC apparaissent comme les mécanismes les plus répandus dans les populations. Au contraire, chez *A. artemisiifolia,* la résistance aux inhibiteurs de l'ALS non liée à la cible est le mécanisme majoritaire qui a évolué dans les populations présentes dans le paysage agricole français (Loubet et al, 2021). Des travaux menés par l'INRAE de Dijon, visant à identifier, *via* des approches transcriptomiques, les gènes impliqués dans la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS, ont montré l'existence dans les populations d'ambroisie de divers mécanismes de RNLC reposant sur la surexpression constitutive ou induite d'une grande diversité de gènes (Loubet et al, 2023). Ces travaux ont mis en évidence une faible redondance entre les gènes surexprimés dans les populations et au sein même d'une population pour des plantes phénotypiquement résistantes à une même substance active. Ceci illustre le déterminisme génétique multiple de la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS chez cette espèce et la difficulté à développer des outils de diagnostic autres que ceux reposant sur des approches phénotypiques.

Ces quelques exemples liés directement à mes travaux, illustrent la complexité des mécanismes de résistances qui évoluent continuellement ainsi que les difficultés pour les appréhender et les caractériser de manière exhaustive. Chez de nombreuses espèces d'organismes phytopathogènes (*B. tabaci, Lolium spp, C. pomonella*) l'existence d'une diversité de mécanismes de RNLC pose des difficultés pour développer des outils d'analyse à moyen et à haut débit utilisables dans le cadre de la surveillance. Récemment, Chen et al (2020) ont mis au point un pipeline d'analyse, nommé FastD, qui permet, à partir des données de RNA-seq, de détecter : 1) les mutations affectant les quatre protéines ciblées par de grandes familles d'insecticides (le canal sodium voltage dépendant, le récepteur nicotinique, l'acétylcholinestérase et le récepteur de la ryanodine) et 2) la surexpression des gènes codant trois grandes familles d'enzymes de détoxication (les cytochromes P450, les glutathion-S-transférases et les carboxylestérases). Cet outil, accessible en ligne, permet d'identifier à la fois des mécanismes de RLC et ceux RNLC à partir d'un même échantillon. Il a été validé à la fois sur des données simulées de RNA-seq, afin d'évaluer les performances du pipeline (sensibilité et spécificité) puis sur données de RNA-seq de populations d'insectes sensibles et résistantes présentes sur la base de données SRA ("Sequence Read Archive") du NBCI ("National Center for Biotechnology Information"). FastD a été ainsi appliqué à quinze populations appartenant à six espèces différentes. Des résultats cohérents ont été obtenus entre les observations phénotypiques et les données issues du "pipeline" d'analyse. FastD a permis la détection et la quantification de mutations affectant le gène codant la protéine cible de l'insecticide dans les populations classées résistantes à cet insecticide. Il a également été observé la surexpression de nombreux gènes de détoxification dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles, notamment de gènes appartenant à la famille des CYP6. Cette approche présente néanmoins certains biais et limites. Ainsi, pour la

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

quantification des mutations de la cible, l'exactitude des fréquences des mutations peut être faussée par le fait qu'elles sont déterminées à partir de l'ARN issu d'un mélange d'individus dont la contribution respective en ARN pourrait être variable. De plus, l'étude de l'expression des gènes se concentre sur ceux codant les familles d'enzymes les plus décrites dans la littérature et dont les données sont disponibles dans les bases de données. Ce type d'approche apparait néanmoins intéressant pour identifier simultanément des RLC et des RNLC avec une approche populationnelle. Développer et éprouver ce genre de "pipeline" d'analyse sur d'autres règnes de bioagresseurs en tenant compte de leurs spécificités respectives, notamment pour les mécanismes de RNLC, pourrait représenter une voie intéressante dans la mise au point d'outils permettant d'identifier la diversité des mécanismes présents au niveau populationnel.

Pour les RLC, les technologies de séquençage à haut débit tels que le séquençage Illumina™ facilitent assurément le développement d'outils utilisables dans le cadre d'une surveillance à plus large échelle comme illustré dans la dernière partie consacrée à la présentation de mes travaux. Cependant, la diversité des mutations qui peuvent parfois affecter la cible, complexifie la caractérisation et la compréhension fine de ces mécanismes. Les résistances de cible aux inhibiteurs de l'ALS chez *A. artemisifolia*, aux IDM chez *C. beticola* et aux inhibiteurs du complexe III chez *P. viticola* montrent une multiplicité des mutations qui peuvent évoluer et s'accumuler sur une même protéine essentielle à la survie du bioagresseur. Cette diversité de variants pour une protéine impliquée dans des fonctions vitales pose de nombreuses questions. Comment émerge une telle diversité de variants ? Comment expliquer les taux de mutation *a priori* élevés de ces gènes aux fonctions pourtant essentielles ? Comment les différents variants assurent un compromis entre maintien de la fonction de la protéine et perte d'affinité vis-à-vis d'un, voire de plusieurs, ligand(s) toxique(s) ? Cette diversité de mutations affectant certains gènes suggère que les mutations ne se produisent pas forcément de manière aléatoire (Martincorena et Seshasayee, 2012) : plus fréquemment là où elles sont le plus souvent avantageuses et moins fréquemment là où elles sont le plus délétères. Ces mutations résultent de divers mécanismes (dommages fait à l'ADN, des mécanismes de réplication, de réparation, d'activation et d'insertion d'éléments transposables), dépendent de l'environnement (Quiroz et al, 2023 ; Ackerman et Horton, 2018) et du génotype des individus dont certains seraient plus enclins à muter que d'autres (Bottery et al, 2024). L'étude de l'impact des pressions exercées par les PPP sur ces différents mécanismes pouvant potentiellement affecter les taux de mutation semble être un axe intéressant de recherche pour mieux comprendre ces phénomènes et leurs conséquences en termes de trajectoire micro-évolutive.

La diversité des mutations qui affectent la cible d'un PPP pose également la question de la contribution de chacune de ces mutations à un phénotype résistant. La caractérisation de l'impact d'une mutation ou deux sur la sensibilité vis-à-vis d'une substance active chez une espèce donnée peut être assez facilement évaluée à l'aide de tests biologiques et du calcul de facteur de résistance observé (Eleftherianos et al 2008). Mais, lorsque de nombreuses mutations sont présentes sur un même gène, évaluer leur contribution respective dans la diminution de sensibilité à une ou plusieurs substances actives est plus complexe. Certaines familles d'antifongiques tels les SDHI ou les IDMs sont plus particulièrement concernées par l'existence d'une variété de mutations qui seules ou associées peuvent moduler les niveaux de résistances de façon variable selon les substances actives. Les récents apports de

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

l'intelligence artificielle pour prédire *in silico* la structure tridimensionnelle d'une protéine (Alphafold 2 - Jumper et al, 2021 ; Alphafold 3 – Abramson et al, 2024) offrent, associés aux méthodes de "docking" moléculaire, l'opportunité d'appréhender plus précisément les conséquences des différentes mutations au niveau des interactions moléculaires. Ces approches permettent de modéliser assez rapidement les répercussions d'une diversité de mutations sur l'affinité et la force de liaison entre la protéine et différentes molécules chimiques. Elles ont été déjà appliquées, par exemple, pour mieux comprendre les conséquences sur les interactions avec les pyréthrinoïdes des mutations qui affectent les canaux sodiques (Zhorov et al, 2022) ou celles qui affectent trois des quatre sous unités du complexe protéique de la succinate deshydrogénase (SDHB, SDHC OU SDHD) vis-à-vis de différents SDHI (Liu et al., 2024). Ce type d'outil offre l'opportunité de mieux comprendre l'impact de mutations sur la structure d'une protéine et sur les interactions avec les différentes substances actives inhibitrices de cette enzyme. Ces analyses *in silico* contribuent à une plus fine compréhension du mécanisme de RLC au niveau moléculaire. Elles peuvent également permettre d'identifier *a priori* les résidus dont les mutations auront des répercussions sur les interactions protéine – substance active et apportent des outils supplémentaires d'études des RLC pour des bioagresseurs qui ne sont pas ou peu adaptables aux conditions de laboratoire. Il s'agit néanmoins d'outils prédictifs basés sur des modélisations, qui peuvent parfois donner des résultats qui ne sont pas en totale cohérence avec les données biologiques (Liu et al, 2024). Ceci peut s'expliquer par une prédiction qui ne correspond pas suffisamment à la structure protéique réelle, notamment lorsque les cibles sont formées de complexes protéiques comme dans le cas de la succinate deshydrogénase. Relativement accessible grâce au développement de plateformes en ligne avec des interfaces conviviales, ces outils nécessitent néanmoins de disposer d'une expertise fine afin d'être en mesure d'exploiter correctement les résultats produits et de pouvoir les appréhender avec un regard critique. Ces avancées dans le domaine de la bio-informatique, couplées aux avancées technologiques au laboratoire telles que l'édition des génomes (CRISPR-Cas9), complètent les approches envisageables pour étudier et comprendre les mécanismes de résistance aux PPP, plus particulièrement ceux impliquant des mutations de la cible.

Les nouveaux outils offrent de nouvelles possibilités de caractérisation et de surveillance avec des gains évidents en termes de rapidité et de compréhension plus fine des mécanismes de résistance qui peuvent être multiples. Mais, cela ne doit pas nous détourner entièrement de la caractérisation biologique des individus. Les approches biologiques offrent toujours des avantages en termes d'identification des phénotypes de résistance sans *a priori* et de possibilités de mesure de leur fitness. L'étude de cette valeur sélective demeure essentielle dans la compréhension des dynamiques spatiales et temporelles des individus résistants dans les populations

- Quels sont les enjeux et limites associés à l'évaluation des coûts biologiques relatifs à la résistance ?

Appréhender le risque de dispersion d'une résistance émergente et comprendre la dynamique évolutive des résistances sont des aspects importants de nos travaux. L'étude du coût biologique lié à une résistance peut apporter des éléments de compréhension de cette dynamique voire permet d'anticiper le risque de propagation. Ainsi, la résistance de cible aux

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

inhibiteurs du complexe III au site Qo (QoI) impliquant la mutation G143A, a été détectée en France après seulement deux ans d'utilisation des QoI (Chen et al, 2007). Elle s'est rapidement dispersée dans les populations. La dynamique évolutive de cette mutation G143A est certainement la résultante d'une pression de sélection élevée, du fort niveau de résistance qu'elle engendre et de l'absence de coût biologique associée à cette mutation (Corio-Costet et al, 2010). Pour l'amétoctradine, un autre inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire, plus de 10 ans après l'homologation, la fréquence et l'occurrence de la mutation S34L sont restées relativement faibles en France jusqu'en 2023 (données non encore publiées). En progression ces deux dernières années (note commune 2024), elle a été détectée dans près de la moitié des prélèvements analysés en 2024 et ce conjointement à la suspicion d'émergence d'un autre mécanisme de résistance à l'amétoctradine n'impliquant ni l'AOX, ni la mutation S34L (données non encore publiées). Cette émergence d'un mécanisme de résistance n'impliquant pas la mutation originellement identifiée, illustre l'intérêt d'avoir poursuivi une surveillance combinant des phénotypage et génotypage. Concernant la mutation S34L détectée initialement dans les populations, celle-ci est donc restée à relativement bas bruit pendant 8 ans. Dans le premier chapitre consacré à la présentation de mes travaux sur la résistance aux inhibiteurs du complexe III de la chaîne respiratoire, il est évoqué un potentiel coût biologique associé à cette mutation du fait de sa faible fréquence au champ lors du suivi et de la disparition des souches au laboratoire au cours de cycle de repiquage. Dans la cadre d'un stage de Master intitulé « Occurrence et coût biologique de la résistance à l'amétoctradine chez *P. viticola*, agent pathogène responsable du mildiou de la vigne », au cours duquel j'ai encadré Lucile Gonnon, nous avons essayé d'identifier le potentiel coût biologique associé à la mutation S34L. Cette étude comparait la valeur sélective de différentes souches résistantes à l'amétoctradine porteuses de la mutation S34L à celle de souches sensibles. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative sur les trois traits biologiques importants et généralement utilisés pour l'évaluation de la valeur sélective des agents phytopathogènes : la période de latence, la production de spores et la fréquence d'infection. En revanche, lors de tests de compétitivité avec différents mélanges contrôlés et composés de 50% d'une souche sensible (non mutée) et de 50% d'une souche résistante (mutée S34L), les souches sensibles ont montré une meilleure compétitivité. Après cinq cycles de reproduction asexuée sans pression de sélection fongique, la mutation S34L n'a jamais été détectée seule dans aucune des lésions contrairement à l'allèle sensible présent seul dans 20% à 80% des lésions selon les mélanges. L'absence de lésions présentant uniquement l'allèle muté semble en faveur de l'hypothèse d'une moins bonne valeur sélective des souches mutées, bien que l'existence de souches hétéroplasmiques (*i.e.* de souches dans lesquelles coexistence des ADN mitochondriaux muté et non muté) n'ait pu être totalement exclue. Cette moins bonne performance observée en compétition avec des souches non mutées explique certainement le fait que la mutation S34L ait évolué lentement dans les populations françaises.

Cet exemple illustre le fait qu'identifier et estimer le réel coût biologique d'une résistance à partir de quelques critères de performances, qui ne concernent souvent qu'une partie du cycle biologique du bioagresseur, reste très délicat. Ceci est d'autant plus complexe que les performances sont évaluées dans des conditions très contrôlées, très loin des conditions du terrain. Ce genre d'étude sur le coût biologique associée à une résistance en laboratoire serait à compléter par des expérimentations plus proches du terrain afin d'évaluer, par exemple, la survie hivernale des génotypes résistants, leur adaptation aux différentes

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

conditions climatiques (températures plus ou moins extrêmes, sècheresse) et nécessiterait idéalement d'être investiguée avec des individus résistants et sensibles présentant des fonds génétiques les plus proches possibles.

- En quoi une connaissance approfondie de la biologie des bioagresseurs contribue-t-elle à la compréhension des phénomènes de résistance et à la surveillance de leur évolution ?

En plus de l'étude des mécanismes sous-jacents et des valeurs sélectives relatives des individus résistants, une compréhension de la biologie des bioagresseurs permet bien souvent de mieux comprendre les dynamiques spatiales ou temporelles que l'on peut observer sur le terrain. Développer nos connaissances de la biologie des organismes bioagresseurs des cultures (cycle biologique, mode de reproduction, gamme de plantes hôtes ou cultures colonisées, diversité et structure génétique des populations) est donc essentiel à l'étude des résistances. Pour illustrer ce propos, je m'appuierai en partie sur les études menées chez *M. persicae* qui est un bioagresseur pour lequel j'ai étudié tout au long de ma carrière les RLC vis-à-vis de diverses familles d'insecticides dans des populations provenant de différentes cultures hôtes. Pour rappel, les publications sur *M. persicae,* présentées dans la seconde partie consacrée à la présentation de mes travaux, soutiennent l'hypothèse de l'émergence rapide, en culture de colza, d'individus combinant deux RLC (une mutation affectant l'acétylcholinestérase (S431F), impliquée dans la résistance aux carbamates, et une mutation du canal sodium (M918L), responsable de résistance aux pyréthrinoïdes). Ce travail a été poursuivi sur un plus large échantillonnage et, en combinant à la recherche des marqueurs de résistance (mutations), le génotypage des individus par des marqueurs neutres (microsatellites). Il a donné lieu à une publication (Roy et al, 2013), dont je suis co-autrice, qui a permis de confirmer la forte occurrence à des fréquences très élevées, du génotype combinant l'allèle de résistance de cible aux carbamates (431F) et l'allèle de résistance aux pyréthrinoïdes (918L) mais également de constater une importante modification de la structure des populations de *M. persicae* en culture de colza entre 2001 (Zamoum et al, 2005) et 2009-2010. Ce bouleversement s'est traduit par la présence très répandue de deux lignées clonales (ou MLG "Multi Locus Genotype") appartenant à deux groupes génétiques distincts au lieu d'un seul ultra majoritaire observé en 2001 (Zamoum et al, 2005). Des travaux dans le cadre d'un stage d'assistant ingénieur, au cours duquel j'ai encadré Axel Ghalmi, ont également permis de compléter une cartographie des allèles de résistances aux pyréthrinoïdes et aux néonicotinoïdes dans des populations issues des cultures colza et pêcher. Ces travaux ont montré que les allèles de résistances aux insecticides sont très différents entre les populations issues de ces deux cultures. Nous avons également montré une omniprésence de la résistance de cible aux pyréthrinoïdes dans toutes les populations, avec une spécificité des allèles impliqués dans cette résistance selon la culture hôte. En culture pêcher la résistance aux pyréthrinoïdes implique une grande diversité de mutations avec la présence des mutations L1014F (kdr) associée ou non à M918T (skdr) et de M918L. Pour cette dernière la mutation résulte d'une autre substitution au niveau du codon que celle identifiée en culture de colza (CTG *vs* TTG en colza). Initialement restreinte au bassin méditerranéen (Pandini et al, 2013, Singh et al, 2021), son occurrence semble s'étendre vers l'Europe centrale (Stará et al, 2024). Cette diversité de substitutions affectant un même codon illustre la

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

diversité des solutions adaptatives qui peuvent évoluer chez une espèce polyphage en réponse à de fortes pressions de sélection exercées par l'application d'insecticides d'une même famille. Ces travaux ont également montré une forte fréquence et occurrence de la mutation R81T, responsable de la résistance aux néonicotinoïdes en culture de pêcher et son absence dans les populations issues des cultures colza. Ces génotypes de résistance différents entre les populations de cultures hôtes distinctes s'expliquent, d'une part, par les pressions insecticides exercées et, d'autre part, par la différenciation génétique des populations de *M. persicae* en fonction des cultures hôtes (Roy et al, 2022, Singh et al, 2021) résultant des faibles flux génétiques entre les populations provenant de l'hôte primaire (le pêcher) et les hôtes secondaires herbacées.

Chez des espèces phytopathogènes, l'existence de faibles flux de gènes entre des groupes génétiques distincts au sein d'une même espèce a également des implications sur la compréhension des phénomènes de résistance observés. Par exemple, chez l'agent de l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*), deux groupes génétiques distincts (A et B) ont été identifiés en Europe. Ces groupes ont des agressivités, des temporalités épidémiques et une répartition géographique différentes. L'un de ces groupes (A) présente une prépondérance à engendrer certains symptômes dit « drapeaux » en début de saison épidémique, un cycle de reproduction sexuée à l'automne rare voire absent en France ainsi qu'une plus grande sensibilité de base à certains fongicides (Delye et al, 1997 ; Miazzy et al, 2003 ; Armani et Corio-Costet, 2006 ; Montarry et al, 2009 ; Miazzi et al, 2003 ; Miazzi et al, 2011). Dans le cadre de travaux réalisés par INRAE de Bordeaux et auxquels j'ai participé (Corio-Costet et al, 2010), des outils de quantification des biotypes et des allèles de résistance à deux familles de fongicides ont permis de contribuer à mieux comprendre la répartition spatio-temporelle différente de ces deux biotypes dans les vignobles français. Des travaux plus récents, menés dans les vignobles hongrois, semblent en faveur d'un moindre cloisonnement entre les deux groupes. Les populations européennes d'*E. necator* pourraient être génétiquement plus complexes et leur structuration serait fonction de l'isolement par la distance géographique, la temporalité de l'épidémie et le cépage hôte (Pintye et al, 2023). Les connaissances sur la composition des populations en termes de biotypes et des facteurs influençant la structuration des populations s'avèrent donc essentielles pour adapter les stratégies de lutte et de gestion des résistances.

L'existence de complexes d'espèces de bioagresseurs responsables de dégâts identiques peut également contribuer à rendre plus difficile la caractérisation et la compréhension des phénomènes de résistance. C'est le cas des monilioses chez les arbres fruitiers à noyaux. Le terme moniliose recouvre en fait un complexe de maladie causée par plusieurs espèces phytopathogènes distinctes (*Monilia laxa*, *Monilia fructigena*, *Monilia fructicola*) dont les symptômes et les dégâts sont sensiblement similaires dans les cultures. Ces espèces peuvent présenter des sensibilités de base aux fongicides différentes (Spiegel et Stammler, 2006 ; Abate et al, 2018). Elles sont difficilement différenciables d'un point vue phénotypique, que cela soit par leurs spores ou les cultures mycéliennes *in vitro*. Le recours à une identification d'espèces, par des approches de biologie moléculaire est donc nécessaire pour compléter et interpréter les analyses liées à l'étude et à la surveillance des résistances chez ces monilioses. Connaître l'occurrence de chacune des espèces ou leur co-occurrence au niveau spatial, les évolutions temporelles respectives dans la dynamique épidémique de ce complexe de maladie apportent des informations primordiales.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les connaissances sur la biologie du bioagresseur, la diversité des complexes d'espèces ou des biotypes d'une espèce et la compréhension de la structuration des populations à l'aide de marqueurs neutres permettent d'adapter au mieux la surveillance des phénomènes d'évolution des résistances, de raisonner au mieux la lutte et contribuent à la mise en place de mesures de gestion des résistances adaptées. Ces connaissances sont, selon moi, d'autant plus essentielles à considérer et à poursuivre que le dérèglement climatique à l'œuvre affecte directement la biologie des bioagresseurs. Son impact sur les cycles de développement des bioagresseurs, l'augmentation du voltinisme (Maino et al, 2015 ; Stoeckli, 2012) ou la survie hivernale (Ma et al, 2021) a déjà été démontré. Ces évolutions pourraient contribuer à accélérer l'émergence des résistances (Subedi et al, 2023), à faire évoluer les profils de résistance et potentiellement favoriser le développement des mécanismes de résistance non liés à la cible (Matzrafi et al, 2016).

A travers cette discussion je voulais montrer les contributions multiples des outils de biologie moléculaire dans l'étude des phénomènes de résistance et de leur complexité (compréhension des mécanismes au niveau moléculaire, suivi spatio-temporel à différentes échelles, contribution à la compréhension des dynamiques de dispersion, évaluation du coût biologique de la résistance, …). Dans le contexte actuel, où la diminution du nombre de PPP de synthèse devrait se poursuivre et une réduction de leur emploi est attendu d'un point vue sociétal et nécessaire d'un point vue environnemental, la problématique des résistances aux PPP pourrait apparaitre peu appropriée. Néanmoins, la diminution (voire l'arrêt) de l'utilisation des pesticides dits de synthèse ne se traduira pas par l'arrêt de tous les moyens de lutte mais par le recours aux méthodes de lutte de biocontrôle telles que les substances d'origine naturelle, les médiateurs chimiques, les micro-organismes ou la lutte physique. Ces méthodes de lutte peuvent également conduire à l'évolution d'adaptations des populations des bioagresseurs visés dont les mécanismes sous-jacents seront à étudier et à comprendre. L'ensemble des connaissances acquises sur les phénomènes de résistances aux PPP chimiques seront utiles pour contribuer à préserver les autres moyens de lutte et leur durabilité.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Récemment, mes travaux de recherche se sont orientés vers *C. beticola*, l'agent de la cercosporiose de la betterave, et sa résistance aux fongicides. Ce phytopathogène de par ses caractéristiques est un modèle intéressant dans le cadre de l'étude des résistances aux PPP. *C. beticola* a évolué des résistances vis-à-vis de multiples familles de fongicides et fait donc preuve de bonne capacité évolutive. Ce modèle est aisément isolable et cultivable *in vitro* en milieu solide ou liquide. Il est également possible d'induire des cycles de reproduction asexuée, ce qui permet d'envisager des approches d'évolution expérimentale afin, par exemple, d'étudier les conséquences évolutives (d'un point phénotypique, génotypique et/ou transcriptomique) d'une exposition à une substance fongicide sur plusieurs générations. Enfin de nombreuses données génomiques et protéomiques sont également disponibles sur ce phytopathogène. Mes perspectives de recherche s'articulent en deux grands groupes : d'une part, les recherches en lien avec le terrain et la surveillance, et d'autre part, les recherches qui visent à mieux comprendre les mécanismes de résistances au niveau moléculaire.

- *Mes perspectives de recherches en lien avec le terrain et la surveillance*

Mes travaux plus en lien avec des problématiques du terrain, visent à suivre l'évolution dans le temps des fréquences des différentes mutations impliquées dans la résistance aux triazoles par des approches haut débit et de tenter de faire le lien entre fréquence des allèles de résistances et perte d'efficacité au champ. Ce suivi est réalisé en lien avec l'Institut Technique de la Betterave dans le cadre d'essais d'efficacité au champ. Il permettra donc, en tenant compte de l'inoculum initial présent au moment du traitement, d'évaluer l'efficacité des traitements et de déterminer si certaines mutations sont sélectionnées ou contre sélectionnées en fonction des substances actives appliquées. À terme j'envisage de mettre en place ce genre de suivi à plus large échelle avec une collecte des spores aériennes de *C. beticola* à l'aide de pièges à spores. Ce type d'échantillonnage sans à priori permettrait une meilleure connaissance de la dynamique de l'évolution des marqueurs de résistance aux fongicides intra- et inter-saison épidémique. Cela apporterait une source de données additionnelles à celles obtenues par les échantillonnages de lésions au champ réalisés le plus souvent en fin de saison épidémique, d'appréhender l'évolution de la diversité génotypique de l'inoculum aérien et d'étudier les liens entre l'évolution des génotypes et les pratiques culturales. Ce type de travaux concourrait à une meilleure connaissance et compréhension des potentiels facteurs qui contribuent à la dynamique d'évolution des résistances.

De plus, plusieurs substances actives importantes dans la gestion de la cercosporiose pourraient être retirées du marché très prochainement[3], engendrant un report sur les substances actives homologuées restantes. Dans le cadre d'un projet de recherche ASAP (Anticipation et Surveillance de l'Adaptation des bioagresseurs aux méthodes de lutte en période de diminution du nombre de substances actives Pesticides) porté par le réseau R4P

[3] https://www.agra.fr/agra-presse/ecophyto-75-substances-pesticides-menacees-de-retrait

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

et les différents instituts techniques des filières agricoles et financé par l'appel projets PARSADA (plan d'action stratégique pour l'anticipation du potentiel retrait européen des substances actives et le développement de techniques alternatives pour la protection des cultures), je suis plus particulièrement impliquée dans l'action « Surveillance des résistances chez les bioagresseurs cibles ». *C. beticola* fera certainement partie des bioagresseurs importants pour la filière « betterave-sucrière ». J'aurai en charge le développement de méthodes pour le suivi de la sensibilité des populations pour ce bioagresseur par des approches biologiques et moléculaires vis-à-vis des substances actives antifongiques restantes.

- *Mes perspectives de recherches en lien avec l'étude des mécanismes de résistances*

Un second aspect de mes travaux menés sur *C. beticola* vise à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la résistance aux triazoles. La résistance aux triazoles, des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, est complexe et médiée par différents processus dont certains impliquent des mécanismes affectant la cible, l'14*α*-déméthylase. Des mutations sens et non-sens affectant gène *Cyp51* codant la protéine cible, ainsi que la surexpression de ce gène, sont associées à une baisse de sensibilité aux triazoles. La surexpression pourrait contribuer à la résistance en renforçant la membrane en ergostérol des cellules et participer ainsi à la baisse de sensibilité. Mes premiers travaux montrent chez des souches collectées en France, une surexpression constitutive du gène *Cyp51* assez réduite par rapport à ce qui été rapporté chez des souches résistantes collectées dans d'autres pays, ainsi qu'une surexpression inductible chez les phénotypes sensibles et résistants (Fontaine et al, 2023). Il n'a donc pas été établi de relation claire entre le niveau de sensibilité observé chez les souches françaises et les niveaux d'expressions de *Cyp51* chez les souches mutantes. La surexpression constitutive du gène *Cyp51* observée chez les souches mutantes pourrait être un phénomène compensatoire développé par les souches pour palier une moins bonne activité des 14*α*-déméthylases mutées. Peu de travaux se sont intéressés à l'impact des modifications de la séquence de Cyp51 et/ou de son expression constitutive et inductible sur richesse en ergostérol chez *C. beticola*. J'envisage de poursuivre ce travail en étudiant la composition en stérols chez des souches de *C. beticola* dont le génotype et le niveau d'expression de *Cyp51* sont connus à l'aide d'approches basées sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en développant une collaboration avec d'autres laboratoires Anses dans le cadre d'un projet interne à l'Anses ou via des partenaires extérieurs à l'Anses. Étudier les stérols de différents génotypes de souches en présence et en absence de triazoles apporterait un éclairage sur leur composition en stérols, et éventuellement sur le rôle des stérols dans le niveau de sensibilité au triazoles. De plus, afin de mieux comprendre la contribution des différentes mutations affectant l'14*α*-déméthylase dans les phénotypes résistants, l'obtention de transformants mutés à partir de souches sensibles est envisagée. Ceci permettrait de caractériser l'implication des différentes mutations dans la perte de sensibilité aux différentes triazoles chez des souches ayant des fonds génétiques semblables.

Dans le cadre de ces perspectives de recherche, l'obtention d'un diplôme de doctorat me permettra de gagner en visibilité et de poursuivre une montée en compétences et de m'impliquer davantage dans la proposition, l'élaboration et la gestion de projets ainsi que dans le co-encadrement de doctorants.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, W. (1925) Formula for correction of observed mortality due to natural mortality. *Econ. Entomol,* **18,** 265-267.

Abramson, J., Adler, J., Dunger, J.*, et al.* (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature,* **630,** 493-500.

Ackerman, S. and Horton, W. (2018) Effects of environmental factors on DNA: damage and mutations. In: *Green chemistry.* Elsevier, pp. 109-128.

Adkisson, P. L., Niles, G. A., Walker, J. K.*, et al.* (1982) Controlling cotton's insect pests: a new system. *Science,* **216,** 19-22.

Ahmad, M., Denholm, I. and Bromilow, R. H. (2006) Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science,* **62,** 805-810.

Ahmadian, A., Ehn, M. and Hober, S. (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta,* **363,** 83-94.

Aktar, M. W., Sengupta, D. and Chowdhury, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology,* **2,** 1.

Anstead, J. A., Williamson, M. S., Eleftherianos, I.*, et al.* (2004) High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochemistry and Molecular Biology,* **34,** 871-877.

Armes, J., Jadhav, D. R., Bond, G. S.*, et al.* (1992) Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. *Pesticide science,* **34,** 355-364.

Avila-Adame, C. and Köller, W. (2002) Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Molecular plant-microbe interactions,* **15,** 493-500.

Azeddine, S. (2014) Résistance au fenhexamid dans le complexe d'espèces *Botrytis cinerea/Botrytis pseudocinerea*: Etudes génétiques et moléculaires. In: *Thèse de doctorat.* Paris 11.

Bai, L.-S., Zhao, C.-X., Xu, J.-J.*, et al.* (2019) Identification and biochemical characterization of carboxylesterase 001G associated with insecticide detoxification in *Helicoverpa armigera*. *Pesticide biochemistry and physiology,* **157,** 69-79.

Barbosa, S., Black IV, W. C. and Hastings, I. (2011) Challenges in estimating insecticide selection pressures from mosquito field data. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* **5,** e1387.

Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R.*, et al.* (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Management Science,* **58,** 649-662.

Bass, C. (2017) Does resistance really carry a fitness cost? *Current opinion in insect science,* **21,** 39-46.

Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T.*, et al.* (2014) The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect biochemistry and molecular biology,* **51,** 41-51.

Beckie, H. J., Heap, I. M., Smeda, R. J.*, et al.* (2000) Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed technology,* **14,** 428-445.

Bergelson, J. and Purrington, C. B. (1996) Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist,* **148,** 536-558.

Blackman, R. (1974) Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.)(Hom., *Aphididae*) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bulletin of Entomological Research,* **63,** 595-607.

Bloomquist, J. R. and Miller, T. A. (1985) A simple bioassay for detecting and characterising insecticide resistance. *Pesticide science,* **16,** 611-614.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Blouquy, L., Mottet, C., Olivares, J.*, et al.* (2021) How varying parameters impact insecticide resistance bioassay: An example on the worldwide invasive pest *Drosophila suzukii*. *PLoS One,* **16,** e0247756.

Bock, K. W. (2016) The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal□ plant arms-race and co-evolution. *Biochemical pharmacology,* **99,** 11-17.

Bottery, M. J., van Rhijn, N., Chown, H.*, et al.* (2024) Elevated mutation rates in multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* drive rapid evolution of antifungal resistance. *Nature Communications,* **15,** 1-12.

Boutsalis, P. (2001) Syngenta quick-test: a rapid whole-plant test for herbicide resistance. *Weed Technology,* **15,** 257-263.

Brevik, K., Bueno, E. M., McKay, S.*, et al.* (2021) Insecticide exposure affects intergenerational patterns of DNA methylation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Evolutionary Applications,* **14,** 746-757.

Brogdon, W. G. (1989) Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitology today,* **5,** 56-60.

Broomfield, P. E. and Hargreaves, J. A. (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current genetics,* **22,** 117-121.

Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C.*, et al.* (2013) Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science,* **61,** 4-20.

Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A.*, et al.* (2012) Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant pathology,* **7,** 151-202.

Cassman, K. G. and Grassini, P. (2020) A global perspective on sustainable intensification research. *Nature Sustainability,* **3,** 262-268.

Charlesworth, D. and Wright, S. I. (2001) Breeding systems and genome evolution. *Current opinion in genetics & development,* **11,** 685-690.

Chateauraynaud, F., Darmency, H., Gauvrit, C.*, et al.* (2020) Utilisation des variétés rendues tolérantes aux herbicides cultivées en France. Rapport d'expertise Anses. Saisine n° 2015-SA-0063. mars 2020.

Chatzidimopoulos, M., Ganopoulos, I., Vellios, E.*, et al.* (2014) Development of a two-step high-resolution melting (HRM) analysis for screening sequence variants associated with resistance to the QoIs, benzimidazoles and dicarboximides in airborne inoculum of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters,* **360,** 126-131.

Chatzidimopoulos, M., Zambounis, A., Lioliopoulou, F.*, et al.* (2022) Detection of *Venturia inaequalis* isolates with multiple resistance in Greece. *Microorganisms,* **10,** 2354.

Chen, F., Everhart, S. E., Bryson, P. K.*, et al.* (2015) Fungicide-induced transposon movement in *Monilinia fructicola*. *Fungal Genetics and Biology,* **85,** 38-44.

Chen, L., Lang, K., Mei, Y.*, et al.* (2020) FastD: Fast detection of insecticide target-site mutations and overexpressed detoxification genes in insect populations from RNA-Seq data. *Ecology and Evolution,* **10,** 14346-14358.

Chen, W., Hasegawa, D. K., Kaur, N.*, et al.* (2016) The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. *BMC biology,* **14,** 1-15.

Cherrad, S., Hernandes, C., Steva, H., et al. (2018). Resistance de *Plasmopara viticola* aux inhibiteurs du complexe III : Un point sur la caracterisation phenotypique et genotypique des souches. *Plant Disease*, **7**, 11-12.

Cherrad, S., Gillet, B., Dellinger, J.*, et al.* (2023) New insights from short and long reads sequencing to explore cytochrome b variants in *Plasmopara viticola* populations collected from vineyards and related to resistance to complex III inhibitors. *PLOS ONE,* **18,** e0268385.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Clay, S. A., Kreutner, B., Clay, D. E.*, et al.* (2006) Spatial distribution, temporal stability, and yield loss estimates for annual grasses and common ragweed (*Ambrosia artimisiifolia*) in a corn/soybean production field over nine years. *Weed Science,* **54,** 380-390.

Collotta, M., Bertazzi, P. and Bollati, V. (2013) Epigenetics and pesticides. *Toxicology,* **307,** 35-41.

Comins, H. N. (1977) The management of pesticide resistance. *Journal of Theoretical Biology,* **65,** 399-420.

Consortium, R. (2013) Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. *Trends in ecology & evolution,* **28,** 110-118.

Cools, H. J., Bayon, C., Atkins, S.*, et al.* (2012) Overexpression of the sterol 14α-demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest management science,* **68,** 1034-1040.

Corio-Costet, M.-F., Dufour, M.-C., Cigna, J.*, et al.* (2010) Diversity and fitness of Plasmopara viticola isolates resistant to QoI fungicides. In: *The Downy Mildews-Biology, Mechanisms of Resistance and Population Ecology.* Springer, pp. 183-197.

Corio-Costet, M., Delmotte, F., Martinez, F.*, et al.* (2006) Resistance of *Plasmopara viticola* to fungicides QoI: origin and diversity.

Courvalin, P. (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy,* **38,** 1447-1451.

Crow, J. F. (1994) Advantages of sexual reproduction. *Developmental genetics,* **15,** 205-213.

Cui, L., Rui, C., Yang, D.*, et al.* (2017) De novo transcriptome and expression profile analyses of the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) reveals relevant flubendiamide response genes. *BMC genomics,* **18,** 1-14.

Darmency, H., Colbach, N. and Le Corre, V. (2017) Relationship between weed dormancy and herbicide rotations: implications in resistance evolution. *Pest management science,* **73,** 1994-1999.

Davies, T. E., O'Reilly, A. O., Field, L. M.*, et al.* (2008) Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science,* **64,** 1126-1130.

De Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K.*, et al.* (2006) Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science,* **62,** 195-207.

Delahaye, C. and Nicolas, J. (2021) Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PloS one,* **16,** e0257521.

Délye, C., Deulvot, C. and Chauvel, B. (2013) DNA analysis of herbarium specimens of the grass weed Alopecurus myosuroides reveals herbicide resistance pre-dated herbicides. *PloS one,* **8,** e75117.

Délye, C., Laigret, F. and Corio-Costet, M.-F. (1997) RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of Uncinula necator. *Phytopathology,* **87,** 670-677.

Delye, C., Meyer, L., Causse, R.*, et al.* (2015) Résistances aux herbicides: les estivales en force! *Phytoma*.

Délye, C., Michel, S., Pernin, F.*, et al.* (2020) Harnessing the power of next-generation sequencing technologies to the purpose of high-throughput pesticide resistance diagnosis. *Pest management science,* **76,** 543-552.

Délye, C., Wang, T. and Darmency, H. (2002) An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis L*. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta,* **214,** 421-427.

Denholm, I. (1990) Monitoring and interpreting changes in insecticide resistance. *Functional Ecology***,** 601-608.

Denholm, I., Devine, G. and Williamson, M. (2002) Insecticide resistance on the move. *Science,* **297,** 2222-2223.

Dennehy, T., Granett, J., Leigh, T.*, et al.* (1987) Laboratory and field investigations of spider mite (*Acari: Tetranychidae*) resistance to the selective acaricide propargite. *Journal of economic Entomology,* **80,** 565-574.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Després, L., David, J.-P. and Gallet, C. (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in ecology & evolution,* **22,** 298-307.

Devonshire, A., Moores, G. and Ffrench-Constant, R. (1986) Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with Phorodon humuli (Schrank)(Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research,* **76,** 97-107.

Devonshire, A. L. and Moores, G. D. (1982) A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **18,** 235-246.

Dowling, M. E., Bryson, P. K., Boatwright, H. G.*, et al.* (2016) Effect of fungicide applications on *Monilinia fructicola* population diversity and transposon movement. *Phytopathology,* **106,** 1504-1512.

Dreinert, A., Wolf, A., Mentzel, T.*, et al.* (2018) The cytochrome bc1 complex inhibitor Ametoctradin has an unusual binding mode. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics,* **1859,** 567-576.

Duan, Y., Yang, Y., Li, T.*, et al.* (2016) Development of a rapid and high-throughput molecular method for detecting the F200Y mutant genotype in benzimidazole-resistant isolates of *Fusarium asiaticum*. *Pest management science,* **72,** 2128-2135.

Duan, Y., Zhang, X., Ge, C.*, et al.* (2014) Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports,* **4,** 7094.

Dufour, M. C., Fontaine, S., Montarry, J.*, et al.* (2011) Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science,* **67,** 60-69.

Edrich, E. S., Duvenage, L. and Gourlay, C. W. (2024) Alternative Oxidase–Aid or obstacle to combat the rise of fungal pathogens? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics,* **1865,** 149031.

Eleftherianos, I., Foster, S., Williamson, M.*, et al.* (2008) Characterization of the M918T sodium channel gene mutation associated with strong resistance to pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research,* **98,** 183-191.

Ellegren, H. and Galtier, N. (2016) Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics,* **17,** 422-433.

Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, N.*, et al.* (2013) Pyrosequencing: A next generation sequencing technology. *World Appl Sci J,* **24,** 1558-1571.

Fehr, M., Wolf, A. and Stammler, G. (2016) Binding of the respiratory chain inhibitor ametoctradin to the mitochondrial bc 1 complex. *Pest Management Science,* **72,** 591-602.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A.*, et al.* (2008) Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology,* **11,** 1.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A.*, et al.* (2010) *The QoI fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides*. InTech Rijeka, Croatia.

Ffrench-Constant, R. H. (2013) The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics,* **194,** 807-815.

Field, L. M., Blackman, R. L., Tyler-Smith, C.*, et al.* (1999) Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical journal,* **339,** 737-742.

Fisher, N. and Meunier, B. (2008) Molecular basis of resistance to cytochrome bc 1 inhibitors. *FEMS yeast research,* **8,** 183-192.

Fontaine, S., Caddoux, L., Brazier, C.*, et al.* (2011) Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. *Pest management science,* **67,** 881-885.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Fontaine, S., Remuson, F., Caddoux, L*., et al.* (2019) Investigation of the sensitivity of *Plasmopara viticola* to amisulbrom and ametoctradin in French vineyards using bioassays and molecular tools. *Pest management science,* **75,** 2115-2123.

Fontaine, S., Remuson, F., Caddoux, L*., et al.* (2018) La résistance aux fongicides chez l'agent du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola)* - résultats des plans de surveillance de la DGAL-SDQSPV de 2015 à 2017. *12e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes.* (Végéphyl, ed.). Tours.

Fontaine, S., Remuson, F., Fraissinet-Tachet, L*., et al.* (2009) Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science,* **65,** 74-81.

Fraaije, B., Cools, H., Fountaine, J*., et al.* (2005) Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology,* **95,** 933-941.

Frąc, M., Gryta, A., Oszust, K*., et al.* (2016) Fast and accurate microplate method (Biolog MT2) for detection of *Fusarium* fungicides resistance/sensitivity. *Frontiers in microbiology,* **7,** 191440.

Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z*., et al.* (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature genetics,* **38,** 953-956.

Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S*., et al.* (2020) Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry,* **295,** 10307-10330.

Gao, C., Ren, X., Mason, A. S*., et al.* (2014) Horizontal gene transfer in plants. *Functional & integrative genomics,* **14,** 23-29.

Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J*., et al.* (2010) Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science,* **66,** 345-348.

Genet, J., Steva, H., Vincent, O*., et al.* (1997) A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *EPPO bulletin,* **27,** 217-225.

Gilbert, C., Peccoud, J. and Cordaux, R. (2021) Transposable elements and the evolution of insects. *Annual Review of Entomology,* **66,** 355-372.

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A*., et al.* (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest management science,* **58,** 859-867.

Glass, E. and Fiori, B. (1955) Codling Moth Resistance to DDT in New York.

Glenn, T. C. (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources,* **11,** 759-769.

Glickman, B. W., Burns, P. A. and Fix, D. F. (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: clues from altered mutational specificity in DNA repair-defective strains. *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms***,** 259-281.

Gobeil-Richard, M., Tremblay, D. M., Beaulieu, C*., et al.* (2016) A pyrosequencing-based method to quantify genetic substitutions associated with resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botrytis spp*. populations. *Pest Management Science,* **72,** 566-573.

Golan, D. and Medvedev, P. (2013) Using state machines to model the Ion Torrent sequencing process and to improve read error rates. *Bioinformatics,* **29,** i344-i351.

Grabke, A., Fernández-Ortuño, D. and Schnabel, G. (2013) Fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in the Carolinas is associated with four target gene mutations. *Plant disease,* **97,** 271-276.

Grimmer, M. K., van den Bosch, F., Powers, S. J*., et al.* (2014) Evaluation of a matrix to calculate fungicide resistance risk. *Pest management science,* **70,** 1008-1016.

Grimmer, M. K., van den Bosch, F., Powers, S. J*., et al.* (2015) Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest management science,* **71,** 207-215.

Hallmann, C. A., Foppen, R. P., Van Turnhout, C. A*., et al.* (2014) Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature,* **511,** 341-343.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Han, H., Yu, Q., Beffa, R.*, et al.* (2021) Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. *The Plant Journal,* **105,** 79-92.

Hartley, C., Newcomb, R., Russell, R.*, 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,** 8757-8762.

Haubruge, É. and Amichot, M. (1998) Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *BASE*.

Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A.*, et al.* (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews,* **94,** 135-155.

Hellin, P., King, R., Urban, M.*, et al.* (2018) The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (FcABC1). *Frontiers in Microbiology,* **9,** 1385.

Herron, G. A. and James, T. M. (2005) Monitoring insecticide resistance in Australian *Frankliniella occidentalis* Pergande (*Thysanoptera: Thripidae*) detects fipronil and spinosad resistance. *Australian Journal of Entomology,* **44,** 299-303.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G.*, et al.* (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology,* **11,** 1026-1030.

Hlaoui, A., Chiesa, O., Figueroa, C. C.*, et al.* (2022) Target site mutations underlying insecticide resistance in Tunisian populations of *Myzus persicae* (Sulzer) on peach orchards and potato crops. *Pest Management Science,* **78,** 1594-1604.

Hoffmeister, M., Schorer, J., Hinson, A.*, et al.* (2024) Alterations in CYP51 of *Cercospora beticola* and their effects on DMI sensitivity. *Journal of Plant Diseases and Protection***,** 1-8.

Homem, R. A. and Davies, T. G. E. (2018) An overview of functional genomic tools in deciphering insecticide resistance. *Current opinion in insect science,* **27,** 103-110.

Hough, W. S. (1928) Relative resistance to arsenical poisoning of two codling moth strains. *Journal of Economic Entomology,* **21,** 325-329.

Hu, M. and Chen, S. (2021) Non-target site mechanisms of fungicide resistance in crop pathogens: A review. *Microorganisms,* **9,** 502.

Hu, T., Chitnis, N., Monos, D.*, et al.* (2021) Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology,* **82,** 801-811.

Huggett, J. F., Cowen, S. and Foy, C. A. (2015) Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical chemistry,* **61,** 79-88.

Hugues, R. and Hasunuma, N. (2006) Amisulbrom: a new fungicide against oomycetes.

Hunte, C., Koepke, J., Lange, C.*, et al.* (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure,* **8,** 669-684.

Ingles, P. J., Adams, P. M., Knipple, D. C.*, 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.

Jabs, T., Cronshaw, K. and Freund, A. (2001) New Strobilurin Resistance Mechanism in Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Phytomedizin,* **31,** 15-16.

Jones, A. and Walker, R. (1976) Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. *Plant Dis. Rep,* **60,** 40-44.

Jordan, B. (2017) Séquençage d'ADN: l'offensive des nanopores-Chroniques génomiques. *médecine/sciences,* **33,** 801-804.

Jouzel, j.-N. and Prete, G. (2022) Pesticide et santé humaine. *Revue Etudes,* **10,** 45-56.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A.*, et al.* (2020) AlphaFold 2. *Fourteenth Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction***,** 13.

Jung, S.-M., Le, D. T., Yoon, S.-S.*, et al.* (2004) Amino acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxy acid synthase. *Biochemical Journal,* **383,** 53-61.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Jutsum, A. R., Heaney, S. P., Perrin, B. M.*, et al.* (1998) Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science,* **54,** 435-446.

Kasianowicz, J. J. and Bezrukov, S. M. (2016) On'three decades of nanopore sequencing'. *Nature biotechnology,* **34,** 481-482.

Kiebacher, H. and Hoffmann, G. (1976) Resistance against benzimidazole fungicides in *Venturia inaequalis*. *Journal of Plant Diseases and Protection***,** 352-358.

Kirkland, L. S., Chirgwin, E., Ward, S. E.*, et al.* (2023) P450-mediated resistance in *Myzus persicae* (Sulzer)(*Hemiptera: Aphididae*) reduces the efficacy of neonicotinoid seed treatments in *Brassica napus*. *Pest Management Science,* **79,** 1851-1859.

Kivioja, T., Vähärautio, A., Karlsson, K.*, et al.* (2011) Counting absolute number of molecules using unique molecular identifiers. *Nature Precedings***,** 1-1.

Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P.*, et al.* (1997) Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy,* **41,** 2540-2543.

Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A. I., Metaxakis, A.*, et al.* (2001) The role of glutathione S-transferases in the detoxification of some organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science,* **57,** 501-508.

Kraiczy, P., Haase, U., Gencic, S.*, et al.* (1996) The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1 complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center QP inhibitors. *European journal of biochemistry,* **235,** 54-63.

Kreuz, K., Tommasini, R. and Martinoia, E. (1996) Old enzymes for a new job (herbicide detoxification in plants). *Plant physiology,* **111,** 349.

Kumar, R., Mazakova, J., Ali, A.*, et al.* (2021) Characterization of the molecular mechanisms of resistance against DMI fungicides in *Cercospora beticola* populations from the Czech Republic. *Journal of Fungi,* **7,** 1062.

Küng Färber, R. B., Chin, K. M. and Leadbitter, N. (2002) Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Management Science,* **58,** 261-267.

Kwon, D. H., Yoon, K. S., Clark, J. M.*, et al.* (2010) A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology,* **19,** 583-591.

Laine, A.-L., Barrès, B., Numminen, E.*, et al.* (2019) Variable opportunities for outcrossing result in hotspots of novel genetic variation in a pathogen metapopulation. *Elife,* **8,** e47091.

Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.-C.*, et al.* (2008) Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée,* **23,** 260-279.

Lebeda, A. and Cohen, Y. (2012) Fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis,* the causal pathogen of cucurbit downy mildew. *Fungicide resistance in crop protection: risk and management***,** 44-63.

Lebeda, A., McGrath, M. T. and Sedláková, B. (2010) Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew fungi. *Fungicides,* **11,** 221-246.

Leonova, I. and Slynko, N. (2004) Life stage variations in insecticidal susceptibility and detoxification capacity of the beet webworm, *Pyrausta sticticalis* L.(Lep., *Pyralidae*). *Journal of applied entomology,* **128,** 419-425.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D.*, et al.* (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science,* **58,** 876-888.

Leroux, P. and Walker, A. S. (2011) Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14α-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest management science,* **67,** 44-59.

Li, J., Yang, S., Wu, Y.*, et al.* (2024) Alternative oxidase: from molecule and function to future inhibitors. *ACS omega,* **9,** 12478-12499.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Li, X., Schuler, M. A. and Berenbaum, M. R. (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.,* **52,** 231-253.
Lin, Z., Wu, J., Jamieson, P. A.*, et al.* (2019) Alternative oxidase is involved in the pathogenicity, development, and oxygen stress response of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology,* **109,** 1679-1688.
Liu, H., Lee, G. and Sang, H. (2024) Exploring SDHI fungicide resistance in Botrytis cinerea through genetic transformation system and AlphaFold model-based molecular docking. *Pest Management Science,* **80,** 5954-5964.
Lonhienne, T., Cheng, Y., Garcia, M. D.*, et al.* (2022) Structural basis of resistance to herbicides that target acetohydroxyacid synthase. *Nature communications,* **13,** 3368.
Lorraine-Colwill, D., Powles, S., Hawkes, T.*, et al.* (2002) Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **74,** 62-72.
Loubet, I., Caddoux, L., Fontaine, S.*, et al.* (2021) A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia L.*). *Scientific Reports,* **11,** 19904.
Loubet, I., Meyer, L., Michel, S.*, et al.* (2023) A high diversity of non-target site resistance mechanisms to acetolactate-synthase (ALS) inhibiting herbicides has evolved within and among field populations of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia L.*). *BMC Plant Biology,* **23,** 510.
Loubet, I., Pernin, F., Fontaine, S.*, et al.* (2020) Résistance aux phytos : le diagnostic passe au haut débit. *Phytoma,* **735**.
Lucas, J. A., Hawkins, N. J. and Fraaije, B. A. (2015) The evolution of fungicide resistance. *Advances in applied microbiology,* **90,** 29-92.
Luo, C.-X., Cox, K. D., Amiri, A.*, et al.* (2008) Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona'in *Monilinia fructicola*. *Plant disease,* **92,** 1099-1103.
Luo, C.-X. and Schnabel, G. (2008) The cytochrome P450 lanosterol 14α-demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology,* **74,** 359-366.
Luong, T. T., Zalucki, M. P., Perkins, L. E.*, et al.* (2018) Feeding behaviour and survival of *Bacillus thuringiensis*-resistant and *Bacillus thuringiensis*-susceptible larvae of *Helicoverpa armigera* (*Lepidoptera*: *Noctuidae*) exposed to a diet with Bacillus thuringiensis toxin. *Austral Entomology,* **57,** 1-8.
Ma, C.-S., Zhang, W., Peng, Y.*, et al.* (2021) Climate warming promotes pesticide resistance through expanding overwintering range of a global pest. *Nature communications,* **12,** 5351.
Ma, Z. and Michailides, T. J. (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection,* **24,** 853-863.
Ma, Z., Yoshimura, M. A. and Michailides, T. J. (2003) Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and environmental microbiology,* **69,** 7145-7152.
Maino, J. L., Umina, P. A. and Hoffmann, A. A. (2018) Climate contributes to the evolution of pesticide resistance. *Global Ecology and Biogeography,* **27,** 223-232.
Mair, W., Lopez-Ruiz, F., Stammler, G.*, et al.* (2016) Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. *Pest management science,* **72,** 1449-1459.
Margaritopoulos, J., Tsitsipis, J., Goudoudaki, S.*, et al.* (2002) Life cycle variation of *Myzus persicae* (*Hemiptera*: *Aphididae*) in Greece. *Bulletin of Entomological Research,* **92,** 309-319.
Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E.*, et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature,* **437,** 376-380.
Martincorena, I., Seshasayee, A. S. and Luscombe, N. M. (2012) Evidence of non-random mutation rates suggests an evolutionary risk management strategy. *Nature,* **485,** 95-98.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Martinez-Torres, D., Foster, S., Field, L.*, et al.* (1999) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulzer)(*Hemiptera: Aphididae*). *Insect Molecular Biology,* **8,** 339-346.

Massi, F., Torriani, S. F., Borghi, L.*, et al.* (2021) Fungicide resistance evolution and detection in plant pathogens: *Plasmopara viticola* as a case study. *Microorganisms,* **9,** 119.

Matsuzaki, Y., Uda, Y., Kurahashi, M.*, et al.* (2021) Microtiter plate test using liquid medium is an alternative method for monitoring metyltetraprole sensitivity in *Cercospora beticola*. *Pest Management Science,* **77,** 1226-1234.

Matthews, G. A. (2018) *A history of pesticides*. Cabi.

Matzrafi, M. (2019) Climate change exacerbates pest damage through reduced pesticide efficacy. *Pest management science,* **75,** 9-13.

Matzrafi, M., Seiwert, B., Reemtsma, T.*, et al.* (2016) Climate change increases the risk of herbicide-resistant weeds due to enhanced detoxification. *Planta,* **244,** 1217-1227.

Mavridis, K., Papapostolou, K. M., Ilias, A.*, et al.* (2022a) Next-generation molecular diagnostics (TaqMan qPCR and ddPCR) for monitoring insecticide resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science,* **78,** 4994-5001.

Mavridis, K., Papapostolou, K. M., Riga, M.*, et al.* (2022b) Multiple TaqMan qPCR and droplet digital PCR (ddPCR) diagnostics for pesticide resistance monitoring and management, in the major agricultural pest *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science,* **78,** 263-273.

McKenzie, J. A. and Batterham, P. (1994) The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends in Ecology & Evolution,* **9,** 166-169.

Melander, A. L. (1914) Can Insects Become Resistant to Sprays? *Journal of Economic Entomology,* **7,** 167-173.

Merriman, B., D Team, I. T. and Rothberg, J. M. (2012) Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis,* **33,** 3397-3417.

Meyer, L., Aumont, C., Stammler, G.*, et al.* (2018) New findings on the ametoctradin mode of action and grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola)* resistance to complex III inhibitors.

Miazzi, M. and Hajjeh, H. (2011) Differential sensitivity to triadimenol of *Erysiphe necator* isolates belonging to different genetic groups. *Journal of Plant Pathology***,** 729-735.

Miazzi, M., Hajjeh, H. and Faretra, F. (2003) Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. *Journal of plant pathology***,** 123-129.

Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N.*, et al.* (2007) Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science,* **55,** 435-440.

Micoud, A. and Remuson, F. (2006) la tavelure du pommier comment gérer les résistances. . *Phytoma, la défense des végétaux,* **590,** 20-23.

Miguez, M., Reeve, C., Wood, P. M.*, et al.* (2004) Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science,* **60,** 3-7.

Mikaberidze, A., Paveley, N., Bonhoeffer, S.*, et al.* (2017) Emergence of resistance to fungicides: the role of fungicide dose. *Phytopathology,* **107,** 545-560.

Mikheyev, A. S. and Tin, M. M. (2014) A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Molecular ecology resources,* **14,** 1097-1102.

Milgroom, M. G. (2015) *Population biology of plant pathogens: genetics, ecology, and evolution*. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, MN, USA.

Miller, N. J. and Sappington, T. W. (2017) Role of dispersal in resistance evolution and spread. *Current opinion in insect science,* **21,** 68-74.

Mingeot, D., Hautier, L. and Jansen, J. P. (2021) Structuration of multilocus genotypes associated with insecticide resistance of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in potato fields in southern Belgium. *Pest Management Science,* **77,** 482-491.

Misselbrook, J. (2019) The Design and Synthesis of Novel AOX and cytochrome bc1 complex inhibitors which act as Phytopathogenic Fungicides. University of Sussex.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Mitani, S., Araki, S., Yamaguchi, T.*, et al.* (2001) Antifungal activity of the novel fungicide cyazofamid against *Phytophthora infestans* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide biochemistry and physiology,* **70,** 92-99.

Moffit, H., Westigard, P., Mantey, K.*, et al.* (1988) Resistance to diflubenzuron in the codling moth (*Lepidoptera: Tortricidae*). *Journal of economic entomology,* **81,** 1511-1515.

Mogilicherla, K. and Roy, A. (2023) Epigenetic regulations as drivers of insecticide resistance and resilience to climate change in arthropod pests. *Frontiers in Genetics,* **13,** 1044980.

Mohamadi, F., Valade, R., Bonin, L.*, et al.* (2022) DIY-LOL-Prototypage d'un outil de diagnostic moléculaire démocratisable pour une gestion durable des adventices.

Montarry, J., Cartolaro, P., Richard-Cervera, S.*, et al.* (2009) Spatio-temporal distribution of Erysiphe necator genetic groups and their relationship with disease levels in vineyards. *European Journal of Plant Pathology,* **123,** 61-70.

Moss, S., Ulber, L. and den Hoed, I. (2019) A herbicide resistance risk matrix. *Crop Protection,* **115,** 13-19.

Mottet, C., Caddoux, L., Fontaine, S.*, et al.* (2024) *Myzus persicae* resistance to neonicotinoids—unravelling the contribution of different mechanisms to phenotype. *Pest Management Science*.

Mottet, C., Fontaine, S., Caddoux, L.*, et al.* (2016) Assessment of the dominance level of the R81T target resistance to two neonicotinoid insecticides in *Myzus persicae* (*Hemiptera: Aphididae*). *Journal of economic entomology,* **109,** 2182-2189.

Muellender, M. M., Mahlein, A. K., Stammler, G.*, et al.* (2021) Evidence for the association of target-site resistance in *cyp51* with reduced DMI sensitivity in European *Cercospora beticola* field isolates. *Pest Management Science,* **77,** 1765-1774.

Murphy, B. P. and Tranel, P. J. (2019) Target-site mutations conferring herbicide resistance. *Plants,* **8,** 382.

Mutch, D. R., Martin, T. E. and Kosola, K. R. (2003) Red clover (*Trifolium pratense*) suppression of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in winter wheat (*Triticum aestivum*). *Weed Technology,* **17,** 181-185.

Nabeshima, T., Kozaki, T., Tomita, T.*, et al.* (2003) An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* **307,** 15-22.

Nandula, V. K., Reddy, K. N., Poston, D. H.*, et al.* (2008) Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Science,* **56,** 344-349.

Nauen, R. and Elbert, A. (2003) European monitoring of resistance to insecticides in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special reference to imidacloprid. *Bulletin of Entomological Research,* **93,** 47-54.

Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T.*, et al.* (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological reviews,* **55,** 597-606.

Neve, P., Busi, R., Renton, M.*, et al.* (2014) Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. *Pest management science,* **70,** 1385-1393.

Neve, P. and Powles, S. (2005) Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics,* **110,** 1154-1166.

Noble, M., Macgarvie, Q., Hams, A.*, et al.* (1966) Resistance to mercury of *Pyrenophora avenae* in Scottish seed Oats. *Plant Pathology,* **15,** 23-28.

Nofiani, R., de Mattos-Shipley, K., Lebe, K. E.*, et al.* (2018) Strobilurin biosynthesis in Basidiomycete fungi. *Nature communications,* **9,** 3940.

Norris, L. C., Main, B. J., Lee, Y.*, 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,** 815-820.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H.*, et al.* (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research,* **28,** e63-e63.

Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C.*, et al.* (2015) Fungicide efflux and the MgMFS 1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental microbiology,* **17,** 2805-2823.

Orr, H. A. and Betancourt, A. J. (2001) Haldane's sieve and adaptation from the standing genetic variation. *Genetics,* **157,** 875-884.

Owen, W. J., Yao, C., Myung, K.*, et al.* (2017) Biological characterization of fenpicoxamid, a new fungicide with utility in cereals and other crops. *Pest management science,* **73,** 2005-2016.

Ozaslan, C., Onen, H., Farooq, S.*, et al.* (2016) Common ragweed: An emerging threat for sunflower production and human health in Turkey. *Weed Biology and Management,* **16,** 42-55.

Palumbi, S. R. (2001) Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science,* **293,** 1786-1790.

Panini, M., Manicardi, G. C., Moores, G.*, et al.* (2016) An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal,* **13,** 326-335.

Panon, M., Steva, H., Debuisson, S.*, et al.* (2018) Efficacy in the vineyard of several fungicide preparations in the presence of different percentages of aox resistant phenotypes of *Plasmopara viticola*, *12e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes.* (Végéphyl, ed.). Tours.

Panozzo, S., Farinati, S., Sattin, M.*, et al.* (2023) Can allele-specific loop-mediated isothermal amplification be used for rapid detection of target-site herbicide resistance in *Lolium spp*.? *Plant Methods,* **19,** 14.

Pavlidi, N., Vontas, J. and Van Leeuwen, T. (2018) The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science,* **27,** 97-102.

Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C.*, et al.* (2011) Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip,* **11,** 2156-2166.

Perez, M. B., Beckie, H. J., Cawthray, G. R.*, et al.* (2021) Rapid on-farm testing of resistance in *Lolium rigidum* to key pre-and post-emergence herbicides. *Plants,* **10,** 1879.

Petsikos-Panayotarou, N., Markellou, E., Kalamarakis, A.*, et al.* (2003) In vitro and in vivo activity of cyprodinil and pyrimethanil on Botrytis cinerea isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European journal of plant pathology,* **109,** 173-182.

Pieczul, K. and Wąsowska, A. (2017) The application of next-generation sequencing (NGS) for monitoring of *Zymoseptoria tritici* QoI resistance. *Crop Protection,* **92,** 143-147.

Pintye, A., Németh, M. Z., Molnár, O.*, et al.* (2023) Comprehensive analyses of the occurrence of a fungicide resistance marker and the genetic structure in *Erysiphe necator* populations. *Scientific Reports,* **13,** 15172.

Plantamp, C., Caddoux, L., Lucas, P.*, et al.* (2022) Projet QUANTALL: QUANTification haut débit d'ALLèles liés à la résistance des bioagresseurs aux produits de protection des plantes. In: *13e Conférence Internationale sur les Maladies des plantes.* (Végéphyl, ed.). Orléans.

Poitras, E. and Houde, A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology,* **2,** 2-11.

Pollastro, S., Faretra, F., Santomauro, A.*, et al.* (1996) Studies on pleiotropic effects of mating type, benzimidazole-resistance and dicarboximide-resistance genes in near-isogenic strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Phytopathologia Mediterranea***,** 48-57.

Prabhaker, N., Toscano, N. and Coudriet, D. (1989) Susceptibility of the immature and adult stages of the sweetpotato whitefly (*Homoptera*: *Aleyrodidae*) to selected insecticides. *Journal of Economic Entomology,* **82,** 953-958.

Preston, C. and Wakelin, A. M. (2008) Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Management Science,* **64,** 372-376.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Puinean, A. M., Foster, S. P., Oliphant, L*., et al.* (2010) Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLOS genetics,* **6,** e1000999.

Qi, P.-F., Zhang, Y.-Z., Liu, C.-H*., et al.* (2018) Fusarium graminearum ATP-binding cassette transporter gene FgABCC9 is required for its transportation of salicylic acid, fungicide resistance, mycelial growth and pathogenicity towards wheat. *International journal of molecular sciences,* **19,** 2351.

R4P-network: Barrès, B., Corio-Costet, M.-F., Debieu, D*., et al.* (2021) Monitoring systems for resistance to plant protection products across the world: Between redundancy and complementarity. *bioRxiv***,** 2020.2007.2030.228239.

R4P-network: Barres, B., Corio-Costet, M.-F., Debieu, D. D*., et al.* (2016) Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends in Plant Science,* **21,** 834–853.

Rachel, C. (1962) *Silent spring*. Penguin Books London.

Rad, S. M., Ray, A. K. and Barghi, S. (2022) Water pollution and agriculture pesticide. *Clean Technologies,* **4,** 1088-1102.

Radman, M. (1999) Enzymes of evolutionary change. *Nature,* **401,** 866-869.

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N*., et al.* (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of cleaner production,* **283,** 124657.

Rauch, N. and Nauen, R. (2003) Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (*Hemiptera*: *Aleyrodidae*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology,* **54,** 165-176.

Reade, J. P. H. and Cobb, A. H. (2002) New, quick tests for herbicide resistance in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) based on increased glutathione S-transferase activity and abundance. *Pest Management Science,* **58,** 26-32.

Rees, D. C., Johnson, E. and Lewinson, O. (2009) ABC transporters: the power to change. *Nature reviews Molecular cell biology,* **10,** 218-227.

Reimann, S. and Deising, H. B. (2005) Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Applied and Environmental Microbiology,* **71,** 3269-3275.

Remuson, F., Fontaine, S., Micoud, A*., et al.* (2007) Tavelure du pommier sa résistance aux strobilurines en France-Tests biologiques et moléculaires 2004-2006. *Phytoma***,** 41-45.

Renton, M., Diggle, A., Manalil, S*., et al.* (2011) Does cutting herbicide rates threaten the sustainability of weed management in cropping systems? *Journal of theoretical biology,* **283,** 14-27.

Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P. J*., et al.* (2007) Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science,* **63,** 890-902.

Roditakis, E., Steinbach, D., Moritz, G*., et al.* (2017) Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (*Lepidoptera*: *Gelechiidae*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology,* **80,** 11-20.

Rodríguez, M. A., Marques, T., Bosch, D*., et al.* (2011) Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (*Lepidoptera: Tortricidae)*. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **100,** 151-159.

Rose, R. L., Barbhaiya, L., Roe, R. M*., et al.* (1995) Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **51,** 178-191.

Rosell-Hidalgo, A., Young, L., Moore, A. L*., et al.* (2021) QSAR and molecular docking for the search of AOX inhibitors: a rational drug discovery approach. *Journal of Computer-Aided Molecular Design,* **35,** 245-260.

Rosenzweig, N., Hanson, L., Clark, G*., et al.* (2015) Use of PCR-RFLP analysis to monitor fungicide resistance in *Cercospora beticola* populations from sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. *Plant Disease,* **99,** 355-362.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Roy, L., Barrès, B., Capderrey, C.*, et al.* (2022) Host plants and insecticides shape the evolution of genetic and clonal diversity in a major aphid crop pest. *Evolutionary Applications,* **15,** 1653-1669.

Roy, L., Fontaine, S., Caddoux, L.*, et al.* (2013) Dramatic changes in the genotypic frequencies of target insecticide resistance in French populations of *Myzus persicae* (*Hemiptera*: *Aphididae*) over the last decade. *Journal of Economic Entomology,* **106,** 1838-1847.

Russell, P. (2001) Resistance management and the registration of pesticide products in Europe. *Pesticide Outlook,* **12,** 56-59.

Ryan, G. (1970) Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed science,* **18,** 614-616.

Roy, L., Fontaine, S., Caddoux, L.*, et al.* (2013) Dramatic changes in the genotypic frequencies of target insecticide resistance in French populations of *Myzus persicae* (*Hemiptera*: *Aphididae*) over the last decade. *Journal of Economic Entomology,* **106,** 1838-1847.

Russell, P. (2001) Resistance management and the registration of pesticide products in Europe. *Pesticide Outlook,* **12,** 56-59.

Ryan, G. (1970) Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed science,* **18,** 614-616.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F.*, et al.* (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science,* **230,** 1350-1354.

Samaras, A., Madesis, P. and Karaoglanidis, G. S. (2016) Detection of sdhB gene mutations in SDHI-resistant isolates of *Botrytis cinerea* using high resolution melting (HRM) analysis. *Frontiers in microbiology,* **7,** 228992.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences,* **74,** 5463-5467.

Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, J.-F.*, et al.* (2006) Carpocapse de pommes Cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques. *Phytoma, la défense des végétaux,* **590,** 24-27.

Sauphanor, B. and Bouvier, J. C. (1995) Cross-resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pesticide Science,* **45,** 369-375.

Sauphanor, B., Cuany, A., Bouvier, J.*, et al.* (1997) Mechanism of Resistance to Deltamethrin in *Cydia pomonella* (L.)(*Lepidoptera*: *Tortricidae*). *Pesticide biochemistry and physiology,* **58,** 109-117.

Schlipalius, D. I., Tuck, A. G., Pavic, H.*, et al.* (2019) A high-throughput system used to determine frequency and distribution of phosphine resistance across large geographical regions. *Pest management science,* **75,** 1091-1098.

Schneider, E. and Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS microbiology reviews,* **22,** 1-20.

Sebaugh, J. (2011) Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics,* **10,** 128-134.

Secor, G. A. and Rivera, V. V. (2012) Fungicide resistance assays for fungal plant pathogens. *Plant fungal pathogens: Methods and protocols***,** 385-392.

Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C.*, et al.* (2022) Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: A mini-review. *The Science of Nature,* **109,** 17.

Shetty, P. J., Amirtharaj, F. and Shaik, N. A. (2019) Introduction to nucleic acid sequencing. *Essentials of Bioinformatics, Volume I: Understanding Bioinformatics: Genes to Proteins***,** 97-126.

Sial, M. U., Zhao, Z., Zhang, L.*, et al.* (2020) Loop-mediated isothermal amplification for the detection of R81T mutation in nAChR with crude genomic DNA extracted from individual *Myzus persicae*. *Journal of pest science,* **93,** 531-541.

Sieber, K. B., Bromley, R. E. and Hotopp, J. C. D. (2017) Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes. *Experimental cell research,* **358,** 421-426.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Sierotzki, H., Kraus, N., Assemat, P.*, et al.* (2005) Evolution of resistance to QoI fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe.
Sierotzki, H., Wullschleger, J. and Gisi, U. (2000) Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis f. sp. tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **68,** 107-112.
Silva, V., Mol, H. G., Zomer, P.*, et al.* (2019) Pesticide residues in European agricultural soils–A hidden reality unfolded. *Science of the Total Environment,* **653,** 1532-1545.
Sindhu, T., Venkatesan, T., Gracy, G. R.*, et al.* (2017) Exploring the resistance-developing mutations on Ryanodine receptor in diamondback moth and binding mechanism of its activators using computational study. *Biochemical Engineering Journal,* **121,** 59-72.
Singh, K. S., Cordeiro, E. M., Troczka, B. J.*, et al.* (2021) Global patterns in genomic diversity underpinning the evolution of insecticide resistance in the aphid crop pest *Myzus persicae*. *Communications biology,* **4,** 847.
Spanner, R. E. (2020) The Molecular Basis of Demethylation Inhibitor Fungicide Resistance in *Cercospora beticola* and the Role of Seed Inoculum in Cercospora Leaf Spot Disease of Sugar Beet. North Dakota State University.
Sparks, T. C., Lockwood, J. A., Byford, R. L.*, et al.* (1989) The role of behavior in insecticide resistance. *Pesticide Science,* **26,** 383-399.
Sparks, T. C. and Nauen, R. (2015) IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide biochemistry and physiology,* **121,** 122-128.
Spiegel, J. and Stammler, G. (2006) Baseline-Sensitivität von *Monilinia laxa* und *M. fructigena* gegenüber Pyraclostrobin und Boscalid. *Journal of Plant Diseases and Protection,* **113,** 199-206.
Stanis, V. and Jones, A. (1985) Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology,* **75,** 1098-1101.
Stará, J., Hovorka, T., Horská, T.*, et al.* (2024) Pyrethroid and carbamate resistance in Czech populations of *Myzus persicae* (Sulzer) from oilseed rape. *Pest Management Science,* **80,** 2342-2352.
Staub, T. and Sozzi, D. (1984) Fungicide resistance. *Plant Dis,* **68,** 1026-1031.
Steinfeld, U., Sierotzki, H., Parisi, S.*, et al.* (2001) Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science,* **57,** 787-796.
Stergiopoulos, I., Van Nistelrooy, J. G., Kema, G. H.*, et al.* (2003) Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science,* **59,** 1333-1343.
Stoeckli, S., Hirschi, M., Spirig, C.*, et al.* (2012) Impact of climate change on voltinism and prospective diapause induction of a global pest insect–*Cydia pomonella* (L.). *PloS one,* **7,** e35723.
Stumpf, N., Zebitz, C. P., Kraus, W.*, et al.* (2001) Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (*Acari: Tetranychidae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology,* **69,** 131-142.
Subedi, B., Poudel, A. and Aryal, S. (2023) The impact of climate change on insect pest biology and ecology: Implications for pest management strategies, crop production, and food security. *Journal of Agriculture and Food Research,* **14,** 100733.
Suckling, D., Chapman, R. and Penman, D. (1984) Insecticide Resistance in the Light Brown Apple Moth, *Epiphyas postvittana* (Walker)(*Lepidoptera*: *Tortricidae*): Larval Response to Azinphosnlethyl. *Journal of economic entomology,* **77,** 579-582.
Szibor, M., Schenkl, C., Barsottini, M. R.*, et al.* (2022) Targeting the alternative oxidase (AOX) for human health and food security, a pharmaceutical and agrochemical target or a rescue mechanism? *Biochemical Journal,* **479,** 1337-1359.
Szkolnik, M. and Gilpatrick, J. (1973) Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine in relation to the history of dodine usage in apple orchards. *Plant Disease Reporter,* **57,** 817-821.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thomazella, D. P., Teixeira, P. J. P., Oliveira, H. C*., et al.* (2012) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist,* **194,** 1025-1034.

Tian, F., Lee, S. Y., Woo, S. Y*., et al.* (2020) Alternative oxidase: a potential target for controlling aflatoxin contamination and propagation of Aspergillus flavus. *Frontiers in Microbiology,* **11,** 419.

Tibola, C. M., Silva, L., Sgubin, F*., et al.* (2021) Monitoring resistance of *Euschistus heros* (*Fabricius*)(*Hemiptera*: *Pentatomidae*) to insecticides by using encapsulated artificial diet bioassay. *Insects,* **12,** 599.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H*., et al.* (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols,* **3,** 877-882.

Trkulja, N. R., Milosavljević, A. G., Mitrović, M. S*., et al.* (2017) Molecular and experimental evidence of multi-resistance of *Cercospora beticola* field populations to MBC, DMI and QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology,* **149,** 895-910.

Troczka, B. J., Singh, K. S., Zimmer, C. T*., et al.* (2021) Molecular innovations underlying resistance to nicotine and neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science,* **77,** 5311-5320.

Turo, C., Mair, W., Martin, A*., et al.* (2021) Species hybridisation and clonal expansion as a new fungicide resistance evolutionary mechanism in *Pyrenophora teres spp*. *bioRxiv***,** 2021.2007. 2030.454422.

Tymon, L. and Johnson, D. A. (2014) Fungicide resistance of two species of *Alternaria* from potato in the Columbia Basin of Washington. *Plant Disease,* **98,** 1648-1653.

Uchibori-Asano, M., Uchiyama, T., Jouraku, A*., et al.* (2022) Development of allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) to detect the tebufenozide-resistant allele in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (*Lepidoptera*: *Tortricidae*). *Applied entomology and zoology***,** 1-7.

Van Den Bosch, F., Paveley, N., Shaw, M*., et al.* (2011) The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology,* **60,** 597-606.

Varela, L., Welter, S., Jones, V*., et al.* (1993) Monitoring and characterization of insecticide resistance Codling moth (*Lepidoptera: Tortricidae)* in four Western States. *Journal of Economic Entomology,* **86,** 1-10.

Voelkerding, K. V., Dames, S. A. and Durtschi, J. D. (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry,* **55,** 641-658.

Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1999) Digital pcr. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* **96,** 9236-9241.

Wang, J., Wang, X., Lansdell, S. J*., et al.* (2016) A three amino acid deletion in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor α6 subunit confers high-level resistance to spinosad in *Plutella xylostella*. *Insect biochemistry and molecular biology,* **71,** 29-36.

Wang, L., Zhu, J., Cui, L*., et al.* (2021a) Overexpression of ATP-binding cassette transporters associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* glover. *Pest Management Science,* **77,** 4064-4072.

Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A*., et al.* (2021b) Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature biotechnology,* **39,** 1348-1365.

Wei, N., Zhong, Y., Lin, L*., et al.* (2019) Transcriptome analysis and identification of insecticide tolerance-related genes after exposure to insecticide in *Sitobion avenae*. *Genes,* **10,** 951.

Wei, Y.-H. and Lee, H.-C. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental biology and medicine,* **227,** 671-682.

Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome biology,* **1,** 1-9.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Wood, P. M. and Hollomon, D. W. (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest management science,* **59,** 499-511.

Wu, C., Chakrabarty, S., Jin, M.*, et al.* (2019a) Insect ATP-binding cassette (ABC) transporters: roles in xenobiotic detoxification and Bt insecticidal activity. *International journal of molecular sciences,* **20,** 2829.

Wu, C., Varanasi, V. and Perez-Jones, A. (2021) A nondestructive leaf-disk assay for rapid diagnosis of weed resistance to multiple herbicides. *Weed Science,* **69,** 274-283.

Wu, J., Hu, X. and Zhang, C. (2019b) Molecular detection of QoI resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose based on loop-mediated isothermal amplification assay. *Plant disease,* **103,** 1319-1325.

Xu, T., Wang, Y.-T., Liang, W.-S.*, et al.* (2013) Involvement of alternative oxidase in the regulation of sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to the fungicides azoxystrobin and procymidone. *Journal of Microbiology,* **51,** 352-358.

Xu, X., Ding, Q., Wang, X.*, et al.* (2022) V101I and R81T mutations in the nicotinic acetylcholine receptor β1 subunit are associated with neonicotinoid resistance in *Myzus persicae*. *Pest Management Science,* **78,** 1500-1507.

Yan, L., Li, M., Cao, Y.*, et al.* (2009) The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* **64,** 764-773.

Yu, Q., Abdallah, I., Han, H.*, et al.* (2009) Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta,* **230,** 713-723.

Yu, Q. and Powles, S. (2014) Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant physiology,* **166,** 1106-1118.

Yuan, J. S., Tranel, P. J. and Stewart, C. N. (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in plant science,* **12,** 6-13.

Zalucki, M. and Furlong, M. (2017) Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Current opinion in insect science,* **21,** 19-25.

Zamoum, T., Simon, J.-C., Crochard, D.*, et al.* (2005) Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*? *Heredity,* **94,** 630-639.

Zhang, J. J. and Yang, H. (2021) Metabolism and detoxification of pesticides in plants. *Science of the Total Environment,* **790,** 148034.

Zheng, Z., Liu, H., Shi, Y.*, et al.* (2022) Comparative transcriptome analysis reveals the resistance regulation mechanism and fungicidal activity of the fungicide phenamacril in *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports,* **12,** 11081.

Zhorov, B. S. and Dong, K. (2022) Pyrethroids in an AlphaFold2 model of the insect sodium channel. *Insects,* **13,** 745.

Ziogas, B. N., Baldwin, B. C. and Young, J. E. (1997) Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science,* **50,** 28-34.

Zulak, K. G., Farfan-Caceres, L., Knight, N. L.*, et al.* (2024) Exploiting long read sequencing to detect azole fungicide resistance mutations in *Pyrenophora teres* using unique molecular identifiers. *Scientific Reports,* **14,** 6285.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'INSA LYON, MEMBRE DE L'UNIVERSITE DE LYON

NOM : FONTAINE DATE de SOUTENANCE : 07-07-2025

Prénoms : Séverine - Julie

TITRE : Développement d'outils moléculaires de détection des résistances aux produits de protection des plantes et leurs utilisations en surveillance

NATURE : Doctorat Numéro d'ordre : 2025ISAL0061

Ecole doctorale : Ecole doctorale : Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité : Biologie Evolutive, Biologie des Populations, Ecophysiologie

RESUME :
La résistance aux produits de protection des plantes (PPP) est définie comme la capacité héritable d'un bioagresseur des cultures (insecte ravageur, champignon phytopathogène ou adventice) à survivre à une dose létale de produit correctement appliqué. C'est un phénomène micro-évolutif en réponse à une pression de sélection exercée par l'activité humaine. La surveillance et l'étude des résistances aux PPP ont pour ambition une détection la plus précoce possible des individus résistants, leur suivi spatio-temporel et la caractérisation du ou des mécanisme(s) biologique(s) impliqué(s) dans ce phénomène. Ces études passent par l'analyse en laboratoire d'individus issus du terrain à l'aide de diverses approches analytiques telles que des tests biologiques de sensibilité aux PPP et l'utilisation d'outils de biologie moléculaire.
À travers mes travaux, je discuterai des opportunités offertes par le développement d'outils de biologie moléculaire traditionnels et de nouvelle génération dans la détection, la surveillance et la caractérisation des phénomènes de résistance aux PPP. Mes études portent notamment sur trois bioagresseurs majeurs qui ont démontré de fortes capacités d'adaptations par l'évolution de résistances à de nombreux PPP : *Venturia inaequalis*, l'agent de la tavelure du pommier, *Plasmopara viticola*, l'agent du mildiou de la vigne et *Myzus persicae*, un puceron dommageable pour de nombreuses cultures.
La complémentarité des analyses par biologie moléculaire et par tests biologiques sera illustrée par l'étude et le suivi des résistances à des fongicides chez deux biotrophes obligatoires : *V. inaequalis* et *P. viticola*. L'ensemble des approches analytiques déployées ont permis d'identifier les mutations impliquées dans des résistances de cible à des inhibiteurs du complexe III de la respiration cellulaire et de suspecter l'existence de résistances non liées à la cible. Cela a également permis de montrer que les méthodes moléculaires permettent de s'affranchir des biais induits par l'adaptation au laboratoire des populations lors de leur multiplication.
L'intérêt de l'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour la caractérisation génotypique liée aux modifications des protéines cibles de familles d'insecticides neurotoxiques sera illustré à travers mes travaux sur le modèle *M. persicae*. Ces travaux ont permis d'identifier l'omniprésence d'un génotype combinant une résistance aux carbamates et aux pyréthrinoïdes dans les populations vivant sur colza. Nous avons également pu démontrer le caractère semi-récessif de la résistance de cible aux néonicotinoïdes.
La diversité des populations de bioagresseurs et la complexité des bases génétiques des mécanismes de résistance vis-à-vis des PPP sont deux défis majeurs pour la surveillance des résistances. Les approches de séquençage à haut débit apportent de nouvelles opportunités de multiplexage aussi bien en termes de populations qu'en termes de nombre de gènes ciblés. La contribution de ces techniques dans la surveillance des résistances aux PPP sera présentée et discutée à travers deux cas d'études portant sur des résistances liées à la modification de la cible impliquant divers loci : une adventice, *Ambrosia artemisiifolia*, et un agent phytopathogène de la betterave, *Cercospora beticola*.
Les défis à relever pour la caractérisation, la surveillance et la compréhension des dynamiques évolutives en œuvre chez ces mécanismes de résistance sont également discutés. Dans un contexte européen où le nombre de substances actives approuvées devrait continuer à diminuer en raison de profils toxicologiques et écotoxicologiques défavorables, la gestion des résistances aux PPP restants sera un des enjeux clefs dans la lutte contre les bioagresseurs des plantes. Les outils moléculaires seront certainement essentiels pour l'élaboration des futures stratégies anti-résistances aux PPP.

MOTS-CLÉS : Bioagresseurs, cultures, produits de protection des plantes, mécanismes de résistance, bases génétiques, diagnostic

Laboratoire de recherche : UMR 0203 INRA / INSA de Lyon BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions)

Directrice de thèse : Federica Calevro

Président de jury : Pedro Da Silva

Composition du jury :

Rapporteures : Gaëlle Le-Goff, Valerie Raymond, Anne-Sophie Walker
Examinatrice : Laurence Mouton
Directrice : Federica Calevro

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0061/these.pdf © [S. Fontaine], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés