

**RÉSISTANCE AUX PESTICIDES CHEZ LE DORYPHORE DE LA POMME DE TERRE : VALIDATION DE TESTS GÉNÉTIQUES POUR
LA DÉTECTION**

21-002-2.2-CIMDEC-IRDA

DURÉE DU PROJET : MARS 2021 / FÉVRIER 2025

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Célia Bordier (IRDA), Élisabeth Ménard (IRDA), Kim Ostiguy (IRDA), Enock Omakele (IRDA) et Mick Wu (IRDA)

Avec la participation de :

Pier Morin (Université de Moncton)
Yves Auger (MAPAQ)
Marie-Pascale Beaudoin (MAPAQ)
Isabelle Dubé (PleineTerre)
Karl-José Aristide Eyebiyi (MAPAQ)
Mélicca Gagnon (MAPAQ)
Sophie Guimont (PleineTerre)
Jean-Philippe Légaré (MAPAQ)
Joëlle Ouellet (MAPAQ)
Nadia Surdek (PleineTerre)

1^{er} février 2025

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

RÉSUMÉ DU PROJET

Le doryphore de la pomme de terre (DPT ; *Leptinotarsa decemlineata*), en provoquant une défoliation des plants, peut entraîner jusqu'à 80 % de perte de rendement dans les champs touchés, affectant de manière significative le secteur de la production de pommes de terre. Ce ravageur constitue une menace majeure pour une culture qui génère à elle seule des recettes annuelles de 245 millions de dollars dans la province (Gouvernement du Québec, 2024). Différentes méthodes ont été testées pour contrôler les populations de DPT, cependant les producteurs dépendent encore largement des insecticides chimiques. L'utilisation de produits phytosanitaires pour lutter contre ce ravageur figure d'ailleurs parmi les plus importantes au monde (Kromann et al., 2014). Selon l'Arthropod Pesticide Resistance Database, 57 matières actives ont déjà fait l'objet de résistances documentées chez le DPT (<https://www.pesticideresistance.org>), ce qui en fait l'un des dix insectes les plus résistants au monde et rend sa gestion particulièrement complexe. Afin de rationaliser l'utilisation d'insecticides et de limiter l'accélération du phénomène de résistance au Québec, le présent projet visait à i) Établir la concentration permettant de discriminer 90 % (DC90) de la population et valider la méthodologie des bioessais sur les individus de la population sensible de DPT, ii) Échantillonner sur le terrain des populations sauvages de DPT pour évaluer la résistance, iii) Valider la méthodologie moléculaire pour détecter la résistance des populations de DPT, et iv) Transférer la méthodologie au laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection (LEDP) du MAPAQ. Pour ce faire, l'élevage d'une population sensible aux insecticides a été mis en place en 2021, et les DC90 ont été déterminées pour neuf insecticides (Objectif 1). En 2022 et 2023, des bioessais réalisés sur 14 populations sauvages québécoises différentes ont permis d'évaluer leurs niveaux de résistance à neuf insecticides (Objectif 2). Par la suite, l'identification de gènes impliqués dans les mécanismes de résistance à l'Actara®, au Delegate™, à l'Entrust™, au Titan® et au Verimark® a été réalisée à l'aide d'analyses biochimiques, puis confirmée par des bioessais (Objectif 3). Les transcrits d'intérêt identifiés appartenaient à la famille des cytochromes P450s. Après validation, l'ensemble des protocoles développés au cours du projet a été transféré au LEDP (Objectif 4). Ce projet a ainsi permis de démontrer que la résistance du DPT aux insecticides est bel et bien présente dans les populations québécoises. De nouveaux outils de diagnostic moléculaire sont désormais disponibles et pourront soutenir la mise en œuvre de programmes de gestion de la résistance de ce ravageur.

Objectif 1 - Établir la concentration permettant de discriminer 90 % de la population et valider la méthodologie des bioessais sur les individus de la population sensible de DPT

1.1 Établir une population d'élevage sensible de DPT

Méthodologie

Environ 400 œufs de DPT, issus d'une population sensible aux insecticides élevée depuis plus de 200 générations dans les laboratoires d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à London (Ontario), ont été reçus le 6 juillet 2021 à l'IRDA de Saint-Bruno-de-Montarville, dans le but d'établir une nouvelle population. Cet élevage a été maintenu jusqu'à l'automne 2024, correspondant à la fin des essais réalisés dans le cadre de ce projet. Les DPT étaient élevés en cages dans des conditions contrôlées de laboratoire (25 ± 2 °C, 50 ± 5 % HR et 16L:8N). Des plants de pommes de terre (*Solanum tuberosum*, variété Kennebec) étaient mis à disposition des adultes de DPT à la fois pour l'alimentation et la ponte, tous les deux jours. En parallèle, les masses d'œufs étaient récoltées, à la fois pour assurer le maintien de l'élevage et obtenir des larves de deuxième stade (L2) nécessaires aux bioessais.

Résultats

Au cours du projet, 22 générations de la population sensible de DPT se sont succédé en élevage entre 2021 et 2024. De manière générale, le pic de ponte d'une génération survenait entre la deuxième et la cinquième semaine de vie des adultes. Ces périodes représentaient donc des moments clés pour la planification des bioessais, afin de disposer d'un nombre suffisant de larves L2. Cette dynamique reproductive nécessitait un suivi rigoureux et continu de l'élevage, de façon à garantir la disponibilité de larves vigoureuses en quantité adéquate pour la réalisation des bioessais.

1.2 Établir les concentrations discriminantes à 90 % (DC90) sur la population sensible de DPT

Méthodologie

Un minimum de trois blocs temporels de quatre répétitions a été réalisé pour établir les DC90 de neuf insecticides: Actara®, Coragen®, Delegate™, Entrust™, Matador®, Sivanto^{MD}Prime, Titan®, Vayego® et Verimark®. Ces essais ont permis de totaliser 12 répétitions par insecticide. Chaque répétition comprenait huit concentrations d'insecticides différentes ainsi qu'un témoin négatif avec de l'eau distillée (Tableau 1). Afin de limiter les biais expérimentaux, une solution mère de 1000 ppm de matière active était utilisée à chaque répétition pour réaliser les différentes dilutions. La méthodologie utilisée pour les bioessais a été inspirée des protocoles décrits par Scott et al. (2014) et Krolilowski et al. (2018). Pour déterminer la DC90 d'un insecticide, des larves L2 issues de la population sensible ont été exposées aux huit concentrations testées. Des disques foliaires de pomme de terre de 42 mm de diamètre ont été immergés dans la solution d'insecticide à la concentration désirée pendant cinq secondes, puis séchés sur des grilles durant au moins 30 minutes. Une fois la solution insecticide sèche, les disques foliaires étaient déposés individuellement dans des boîtes de Pétri de 47 mm de diamètre contenant un papier filtre. Cinq larves L2 étaient ensuite placées sur chaque disque foliaire. Les Pétri étaient conservés en chambre de croissance (27 ± 1 °C, 65 ± 5 % HR et 16L:8N) jusqu'aux observations de la mortalité des individus, 24 h, 48 h et 72 h post-exposition. La majorité du feuillage ayant été consommé après 48 h, les larves ont été transférées sur de nouveaux disques foliaires afin que l'alimentation ne soit pas limitante. Ces disques foliaires de remplacement avaient été préparés en même temps que les premiers et conservés individuellement en chambre de croissance, dans les mêmes conditions afin d'éviter leur flétrissement.

Tableau 1. Insecticides testés selon leur groupe et famille chimique, leur nom commercial, leur matière active et l'intervalle de dilutions testées (ppm).

Groupe	Famille chimique	Nom commercial	Matière active	Intervalle de dilutions testées (ppm)
3A	Pyréthroïdes	Matador®	Lambda-cyhalothrine	0,001 - 0,2
4A	Néonicotinoïdes	Actara®	Thiaméthoxame	0,010 - 0,2
		Titan®	Clothianidine	0,010 - 4,0
4D	Buténolides	Sivanto ^{MD} Prime	Flupyradifurone	0,100 - 30,0
5	Spinosynes	Delegate™	Spinetoram	0,010 - 2,5
		Entrust™	Spinosad	0,010 - 2,5
28	Diamides	Coragen®	Chlorantraniliprole	0,010 - 10,0
		Vayego®	Tétraniliprole	0,010 - 10,0
		Verimark®	Cyantraniliprole	0,010 - 10,0

À chaque observation, les larves étaient classées en trois catégories selon la méthode de Scott et al. (2023) : *i*) Vivantes, lorsqu'elles se déplaçaient et pouvaient se redresser après avoir été placées sur le dos à l'aide d'un pinceau; *ii*) Moribondes, lorsqu'elles bougeaient lentement mais étaient incapables de se redresser; *iii*) Mortes, lorsqu'elles demeuraient immobiles même lorsqu'elles étaient touchées. Étant donné que les larves moribondes ne sont plus en mesure de causer des dommages aux plants,

elles ont été regroupées avec les mortes pour l'analyse des données. Les valeurs de DC90 pour chaque insecticide ont ensuite été estimées, tout en considérant le temps post-exposition.

Analyse des données

L'ensemble des analyses statistiques du projet a été réalisé à l'aide du logiciel R (version 4.2.1). Afin de minimiser les effets de possibles contaminants ou de mauvaises manipulations, un seuil de rejet à 20 % de mortalité pour les individus témoins a été appliqué (moyenne de la journée). Dans le cas où ce seuil a été dépassé, le bloc temporel entier a été retiré du jeu de données. Des essais ont été ajoutés au besoin pour avoir un nombre minimal de répétitions suffisant. La correction d'Abbott a été appliquée en utilisant la mortalité de tous les témoins de la journée comme suit : $m_{\text{Abbott}} = (m - m_{\text{Témoin}}) / (1 - m_{\text{Témoin}})$. Les courbes dose-réponse ont été estimées à partir d'un modèle log-logistique simple en spécifiant une distribution binomiale. La mortalité témoin a été fixée à 0 % et la mortalité à une dose assez élevée proche de 100 %; la courbe était symétrique autour de 50 %. Une courbe de réponse a été ajustée pour chaque pseudo-réplication (jusqu'à quatre par jour) à l'aide de la librairie *drc* (Ritz et al., 2019). La valeur de DC90 a ensuite été obtenue par régression inverse. Les DC90 des pseudo-réplications ont par la suite été combinées par méta-analyse (moyenne pondérée par leur degré d'incertitude) avec la librairie *metafor* (Viechtbauer, 2010).

Résultats

La concentration discriminante à 90 % (DC90) a été déterminée avec succès pour chacun des neuf insecticides homologués utilisés dans la lutte contre le DPT et ciblés dans le cadre de ce projet (Tableau 2). Les DC90 ont été déterminées à partir des courbes dose-réponse réalisées pour chacun des insecticides (Figure 1).

Tableau 2. Insecticides testés, selon leur groupe et famille chimique, leur nom commercial et leur matière active, leur DC90 (avec intervalle de confiance à 95 %) et leur délai post exposition.

Groupe	Famille chimique	Nom commercial	Matière active (%)	DC90 (ppm)	Délai post-exposition (h)
3A	Pyréthrinoïdes	Matador®	Lambda-cyhalothrin (12 %)	0,06 [0,05-0,08]	48
4A	Néonicotinoïdes	Actara®	Thiaméthoxame (21,6 %)	0,82 [0,61-1,03]	48
4A	Néonicotinoïdes	Titan®	Clothianidine (48 %)	1,51 [0,86-2,15]	48
4D	Buténolides	Sivanto ^{MD} Prime	Flupyradifurone (20 %)	17,71 [13,45-21,96]	72
5	Spinosynes	Delegate TM	Spinétoram (25 %)	0,06 [0,04-0,09]	48
5	Spinosynes	Entrust TM	Spinosad (22,5 %)	0,21 [0,14-0,28]	48
28	Diamides	Coragen®	Chlorantraniliprole (18,4 %)	0,98 [0,36-1,60]	48
28	Diamides	Vayego®	Tétraniliprole (20 %)	1,01 [0,13-1,90]	48
28	Diamides	Verimark®	Cyantraniliprole (18,7 %)	0,10 [0,08-0,12]	72

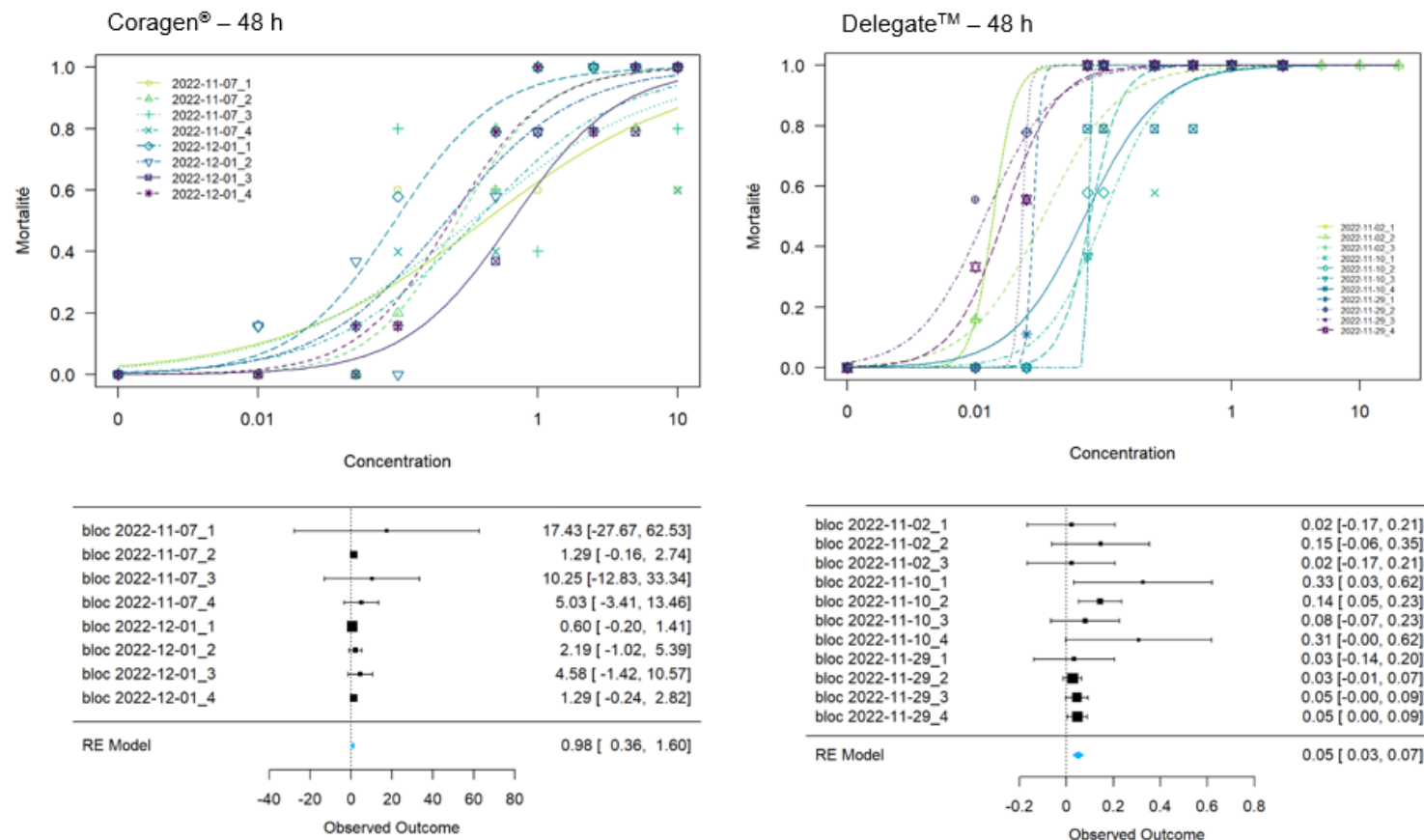


Figure 1. Modélisation graphique pour la détermination des DC90. Exemple présenté pour le Coragen®, à gauche et le Delegate™ à droite. Le panneau du haut présente les courbes dose-réponse, soit la mortalité en fonction de la concentration en insecticide, pour chaque répétition. Le panneau du bas présente la variabilité des données, en fonction de la répétition, par rapport à la valeur de DC90 estimée par le modèle. Chaque courbe sur les graphiques et chaque ligne dans le tableau, indique les données pour une répétition donnée lors d'une journée donnée, dans le cas où les valeurs étaient exploitables. Les courbes dose-réponse ont été estimées à partir d'un modèle log-logistique simple en spécifiant une distribution binomiale. Les DC90 ont été estimées ensuite par une méta-analyse.

Objectif 2 - Échantillonner sur le terrain des populations sauvages de DPT pour évaluer la résistance

2.1 Échantillonnage sur le terrain et élevage des populations sauvages de DPT

Méthodologie

Afin d'assurer un élevage optimal et d'obtenir un nombre suffisant de larves destinées aux bioessais, 150 adultes hivernants sauvages (première génération de la nouvelle année, G0) par population ont été prélevés sur le terrain. Le transport des individus vivants a été optimisé en les plaçant dans des pots aérés contenant des feuilles fraîches de pomme de terre. Ces pots ont ensuite été placés dans des boîtes d'expédition réfrigérées. À leur réception, les DPT ont été comptabilisés puis placés en cages avec des plants de pommes de terre afin de constituer les élevages. Ces élevages de populations sauvages ont été maintenus dans des tentes de croissance dans des conditions contrôlées (24 ± 2 °C, 65 ± 5 % HR, 16L:8N). Afin d'éviter une éventuelle perte de résistance liée à la succession des générations, les bioessais ont été réalisés dès que suffisamment de larves L2 issues de la génération G0 étaient disponibles. L'évaluation de la résistance des populations sauvages a été réalisée en 2022 et 2023 sur dix et 11 populations, respectivement. Afin d'évaluer l'évolution de la résistance, mais également de maximiser les chances d'identifier des populations résistantes et les gènes associés, sept des fermes échantillonnées en 2022 ont été de nouveau échantillonnées en 2023. En réponse à la demande de producteurs et d'agronomes, trois fermes en régie biologique ont été ajoutées à l'échantillonnage de 2023. En 2024, sept populations, dont une issue d'une ferme en régie biologique, ont été échantillonnées pour effectuer la validation des gènes ciblés. Pour chaque insecticide, les trois populations les plus résistantes identifiées lors des bioessais de 2023 ont été sélectionnées pour les tests de 2024.

Résultats

Au total, des échantillons ont été collectés dans 14 fermes différentes, réparties dans 12 régions administratives du Québec : Bas-Saint-Laurent, Capitale-Nationale, Chaudière-Appalaches, Centre-du-Québec, Lanaudière, Laurentides, Laval, Mauricie, Montérégie, Montréal, Outaouais et Saguenay–Lac-Saint-Jean. Sur ces 14 populations échantillonnées au cours des trois années du projet, certaines ont été échantillonnées plusieurs fois afin de répondre aux différents objectifs (Tableau 3). L'ensemble de ces populations a été mis en élevage afin de pouvoir réaliser les bioessais. Les élevages ont globalement été bien maintenus grâce à un suivi rigoureux. Les individus adultes sortis d'hibernation ont eu tendance à manger beaucoup de feuillage, ce qui a eu pour conséquence de réduire les surfaces disponibles pour la ponte. Pour pallier cette problématique et augmenter la ponte, les adultes d'une même population ont été répartis dans deux cages d'élevage et les œufs ont été récoltés tous les jours. Ce suivi rigoureux a permis un succès des élevages de ces différentes populations. Au pic d'une saison, une vingtaine de cages d'élevage nécessitant une production de près de 800 plants de pommes de terre étaient à gérer simultanément.

Tableau 3. Récapitulatif des 14 populations utilisées pour les trois années du projet avec le nombre total de populations par année. Les populations en vert sont les populations en régie biologique.

Années	Populations														Total
2022						F				J				N	10
2023	A	B	C	D	E		G	H	I		K	L	M		11
2024															7

2.2 Évaluation de la résistance des populations sauvages aux insecticides par bioessais

Méthodologie

Réalisation des bioessais

L'effet des concentrations discriminantes à 90 % (DC90) a été testé sur des populations sauvages selon le protocole suivant : pour chaque insecticide, l'expérimentation a été répétée quotidiennement pendant six jours consécutifs, avec l'exposition de dix nouvelles larves de deuxième stade (L2) par jour, selon la même méthodologie que celle utilisée pour la détermination des DC90 (Objectif 1.2). Afin de limiter la variabilité expérimentale, une quantité suffisante de solution mère a été préparée en début de saison, puis divisée en aliquots conservés au réfrigérateur, à l'abri de la lumière. Un nouvel aliquot était utilisé chaque jour de test pour préparer la dilution correspondant à la DC90. Des disques foliaires de 42 mm de diamètre ont été immergés pendant cinq secondes dans la solution d'insecticide (DC90), puis séchés sur des grilles durant au moins 30 minutes. Ces disques foliaires ont ensuite été disposés dans des boîtes de Pétri de 47 mm de diamètre contenant un papier filtre. Pour chaque population et insecticide, les dix larves testées simultanément, étaient réparties en deux groupes de cinq larves L2, chacun placé dans une boîte de Pétri. Cela étant répété pendant six jours, 12 répétitions ont été réalisées au total. Les boîtes étaient ensuite déposées en chambre de croissance (27 ± 1 °C, 65 ± 5 % HR, 16L:8N). Les neuf insecticides ont été testés simultanément sur des individus issus d'une à quatre populations sauvages différentes ainsi que sur la population sensible. Pour chaque population, trois boîtes de Pétri supplémentaires ont servi de témoins, les disques foliaires ayant été trempés uniquement dans de l'eau distillée. Les observations de mortalité ont été réalisées en fonction du temps post-exposition déterminé pour chaque insecticide dans l'objectif précédent, soit après 48 h (Actara®, Coragen®, Delegate™, Entrust™, Matador®, Titan® et Vayego®) ou après 72 h (Sivanto^{MD}Prime et Verimark®). Afin de garantir une alimentation suffisante, les disques foliaires ont été remplacés après 48 h pour les insecticides nécessitant une observation à 72 h. Lors de chaque observation, les larves étaient classées en trois catégories : vivantes, moribondes ou mortes. De plus, l'évolution de la résistance a pu être évaluée en comparant les sept populations échantillonnées sur les mêmes fermes entre 2022 et 2023, exposées à trois insecticides : Actara®, Matador® et Vayego®.

Caractérisation de la résistance

Dans un principe de parcimonie, la catégorisation des populations a été faite en se basant sur les intervalles de confiance à 95 % (IC) plutôt que sur la mortalité moyenne. D'après les travaux d'Ellis (1989), les populations sauvages ont été classées selon les seuils suivants :

- Résistante : IC haut ≤ 30 % (rouge)
- Tolérante forte : moyenne < 30 % et IC > 30 % (orange)
- Tolérante moyenne : moyenne comprise entre 30 et 70 % (jaune)
- Tolérante faible : moyenne > 70 % et IC < 70 % (vert pâle)
- Sensible : IC bas ≥ 70 % (vert foncé)

Lorsque la population sensible exposée aux DC90 ne présentait pas une mortalité de 90 %, de nouveaux seuils ont été calculés afin de caractériser la résistance des populations sauvages en fonction de la mortalité observée dans la population sensible.

Conservation, sélection et envoi des individus d'intérêt pour analyses moléculaires

En 2023, les larves des populations sauvages encore vivantes à l'issue des tests ont été plongées dans de l'azote liquide afin d'arrêter toute activité physiologique. Les larves issues d'un même Pétri (même population et même insecticide) ont été regroupées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, puis conservées à -80 °C (congélateur Isotemp – Fisherbrand). À la fin des expérimentations, 15 adultes et 20 larves L2, issus de chaque population sauvage et non exposés aux insecticides, ont également été collectés et conservés dans les mêmes conditions. Ces individus ont servi à la fois à la mise au point de

la méthode de biologie moléculaire et de témoin pour comparaison avec les larves exposées aux insecticides. À l'issue de la caractérisation de toutes les populations, les individus provenant de la population la plus résistante et de la plus sensible, exposés à un même insecticide, ont été expédiés sur glace sèche à Pier Morin de l'Université de Moncton (Nouveau-Brunswick), en vue de l'identification des gènes impliqués dans la résistance aux insecticides.

Analyse des données

La correction d'Abbott a été appliquée en utilisant la mortalité observée dans l'ensemble des témoins pour chaque journée d'essai. La mortalité des différentes populations a ensuite été estimée à l'aide d'un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM), ajusté séparément pour chaque insecticide (bibliothèque *glmmTMB* ; Brooks et al., 2017). Cette approche a permis de modéliser la mortalité selon une distribution binomiale, tout en tenant compte du nombre total d'individus testés dans chaque essai. Le modèle comprenait un facteur fixe, correspondant à la différence entre la population sensible et chacune des populations sauvages, ainsi qu'un facteur aléatoire, représentant les blocs temporels. La validité des modèles a été vérifiée par l'examen de la correspondance entre la distribution des résidus observés et attendus, à l'aide de la bibliothèque *DHARMA* (Hartig, 2022). Des comparaisons post hoc ont ensuite été réalisées afin de déterminer si la mortalité observée pour chaque population sauvage différait significativement de celle de la population sensible.

Résultats

La population sensible, pour laquelle les DC90 avaient été déterminées, n'a atteint les pourcentages de mortalité attendus que lors des bioessais de 2023 mais pas lors des bioessais de 2024. Des tests réalisés hors projet ont montré que la sensibilité de cette souche de DPT variait selon la saisonnalité. Ainsi, les DC90 établies à l'automne ou en hiver étaient difficilement atteignables lors de tests effectués en été. Cette variabilité explique pourquoi, lors de la saison 2023, la population sensible exposée au DC90 n'a pas toujours présenté une mortalité de 90 %. Une autre explication possible réside dans l'utilisation d'insecticides conservés pendant plus d'un an : malgré le respect des conditions de stockage, leur efficacité pourrait avoir été affectée. Pour contourner ce problème et caractériser la résistance des populations sauvages, un nouveau seuil de caractérisation, équivalent à un intervalle de mortalité de 30 à 70 %, a été calculé en fonction de la mortalité de la population sensible en 2023 (Tableau 4).

Sur les 129 caractérisations de résistance réalisées, 47 cas de résistance, 80 cas de tolérance et 2 cas de sensibilité ont été observés (Tableau 4). Seules deux populations en régie biologique (A et L) et une population en régie conventionnelle (N) ont présenté une sensibilité ou une tolérance faible aux insecticides. Concernant les résistances, 13 des 14 populations se sont révélées résistantes à au moins un insecticide. Deux populations seulement ont montré une résistance simple, c'est-à-dire sans résistance multiple. La résistance multiple, définie comme la capacité d'une population à survivre à plusieurs insecticides appartenant à des familles chimiques distinctes, grâce à un ou plusieurs mécanismes de défense (par exemple, une dégradation enzymatique des insecticides ou une modification de leurs cibles moléculaires), a été observée chez neuf populations. La résistance croisée, quant à elle, correspond à la capacité d'une population à résister à plusieurs insecticides d'une même famille chimique partageant un mode d'action ou une cible moléculaire similaire (Mishra et al., 2021). La résistance croisée a été détectée chez sept populations pour le groupe chimique 4 et chez une population en régie biologique pour le groupe 5. Certaines populations présentaient à la fois de la résistance croisée et multiple. Fait notable, une population en régie biologique a montré une résistance au Delegate™, un produit pourtant non autorisé en production biologique. Cela illustre la capacité du DPT à développer des mécanismes de résistance lorsqu'il est exposé à des insecticides d'un même groupe chimique, soulignant ainsi la complexité de la gestion de ses populations.

Aucune résistance n'a été détectée pour le Coragen® et le Vayego®, et une seule pour l'Entrust™ et le Verimark®. À l'inverse, les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour le Sivanto^{MD}Prime (72 % des populations), suivis de l'Actara® et du Matador® (64 % chacun). Ainsi, les insecticides pour lesquels les niveaux de résistance étaient les moins élevés, étaient ceux du groupe 5 (spinosynes) et du groupe 28 (diamides). À l'inverse, les insecticides pour lesquels les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés appartiennent principalement au groupe 4, regroupant les néonicotinoïdes et les buténolides, ainsi qu'au groupe 3, comprenant les pyréthri-noïdes et les pyréthrines. Cette différence pourrait être due à la date d'homologation et de mise en marché des produits ou à une moindre utilisation (répétition et large échelle paysagère). Il serait donc pertinent de gérer prudemment l'utilisation de ces groupes de familles chimiques, pour lesquelles peu ou pas de résistance n'a encore été observée, afin d'en préserver l'efficacité à long terme.

À l'exception de la population H, qui s'est révélée significativement moins affectée par une exposition au Vayego® en 2023 qu'en 2022 (Annexe 1), aucune différence significative de mortalité n'a été observée entre les deux années pour les autres populations (B, C, E, I, K, M) et les trois insecticides testés (Actara®, Matador® et Vayego®). Toutefois, une tendance générale à une diminution des mortalités, traduisant une tolérance ou une résistance accrue, a été constatée après une année. Ces résultats suggèrent que les populations ne retrouvent pas rapidement leur sensibilité aux insecticides évalués.

Tableau 4. Catégorisation des populations en fonction de leur résistance aux insecticides. Les informations générales comme le nom commercial de l'insecticide et son année d'homologation sont indiquées. Trois populations testées étaient en régie biologique (A, D et L), les 11 autres populations étaient en régie conventionnelle. Selon les seuils calculés à partir de la population sensible de chaque année, le code couleur indique si une population a été caractérisée comme étant résistante (rouge), tolérante forte (orange), tolérante moyenne (jaune), tolérante faible (vert pâle) ou sensible (vert foncé). Les valeurs indiquées dans les cases sont les moyennes et les intervalles de confiance à 95 %, issus des modèles.

Nom commercial		Actara®	Coragen®	Delegate™	Entrust™	Matador®	Sivanto ^{MD} Prime	Titan®	Vayego®	Verimark®
Année d'homologation		2006	2008	2007	2004	1997	2015	2003	2020	2013
Seuil de catégorisation (2022)		0,30-0,70								
Nouveaux seuils (2023)		0,14-0,33	0,17-0,39	0,24-0,55	0,24-0,56	0,27-0,62	0,26-0,60	0,25-0,58	0,23-0,54	0,23-0,54
A (bio)	2023	0,56 [0,43-0,69]	0,31 [0,20-0,44]	0 [0-0,01]	0,05 [0,01-0,13]	0,29 [0,18-0,42]	0,45 [0,31-0,59]	0,73 [0,61-0,83]	0,29 [0,18-0,42]	0,21 [0,11-0,34]
B	2022	0,19 [0,08-0,37]				0,07 [0,02-0,23]			0,55 [0,34-0,73]	
B	2023	0,05 [0,01-0,13]	0,12 [0,05-0,23]	0,38 [0,26-0,51]	0,23 [0,13-0,36]	0,01 [0-0,07]	0 [0-0,01]	0,07 [0,02-0,15]	0,47 [0,34-0,60]	0,14 [0,06-0,26]
C	2022	0,07 [0,02-0,18]				0,09 [0,03-0,25]			0,61 [0,42-0,77]	
C	2023	0,03 [0-0,09]	0,21 [0,12-0,33]	0,08 [0,03-0,16]	0,28 [0,18-0,40]	0,01 [0-0,06]	0,05 [0,01-0,14]	0,03 [0-0,09]	0,38 [0,27-0,51]	0,07 [0,02-0,16]
D (bio)	2023	0,05 [0,01-0,13]	0,14 [0,07-0,25]	0,09 [0,03-0,18]	0,34 [0,23-0,48]	0,10 [0,04-0,20]	0 [0-0,01]	0,18 [0,09-0,29]	0,49 [0,36-0,62]	0,17 [0,08-0,29]
E	2022	0,04 [0,01-0,16]				0,1 [0,03-0,27]			0,50 [0,31-0,69]	
E	2023	0,01 [0-0,06]	0,20 [0,11-0,32]	0,24 [0,14-0,36]	0,20 [0,11-0,32]	0,06 [0,02-0,15]	0,08 [0,02-0,17]	0,06 [0,02-0,15]	0,40 [0,28-0,53]	0,20 [0,11-0,33]
F	2022	0,01 [0-0,13]				0,01 [0-0,09]			0,75 [0,56-0,87]	
G	2023	0,08 [0,02-0,17]	0,12 [0,05-0,23]	0,28 [0,17-0,42]	0,43 [0,30-0,57]	0,10 [0,04-0,20]	0,22 [0,11-0,35]	0,41 [0,28-0,55]	0,32 [0,20-0,46]	0,33 [0,21-0,47]
H	2022	0,01 [0-0,16]				0,24 [0,09-0,49]			0,56 [0,35-0,75]	
H	2023	0,01 [0-0,07]	0,23 [0,14-0,36]	0,31 [0,20-0,44]	0,33 [0,21-0,46]	0,01 [0-0,07]	0,01 [0-0,07]	0,03 [0-0,10]	0,23 [0,13-0,36]	0,15 [0,07-0,26]
I	2022	0,13 [0,05-0,28]				0,08 [0,03-0,24]			0,35 [0,19-0,55]	
I	2023	0 [0-0,02]	0,26 [0,15-0,39]	0,26 [0,15-0,40]	0,35 [0,22-0,49]	0,16 [0,08-0,28]	0,04 [0,01-0,12]	0,18 [0,09-0,30]	0,34 [0,22-0,48]	0,39 [0,25-0,53]
J	2022	0,01 [0-0,24]				0,17 [0,06-0,38]			0,78 [0,59-0,90]	
K	2022	0,16 [0,07-0,33]				0,10 [0,04-0,26]			0,71 [0,52-0,84]	
K	2023	0,16 [0,08-0,27]	0,20 [0,11-0,31]	0,18 [0,09-0,29]	0,27 [0,16-0,39]	0,25 [0,15-0,38]	0,04 [0,01-0,11]	0,25 [0,15-0,38]	0,49 [0,36-0,62]	0,18 [0,09-0,30]
L (bio)	2023	0,30 [0,19-0,42]	0,26 [0,16-0,39]	0,35 [0,23-0,48]	0,51 [0,38-0,64]	0 [0-0,01]	0,59 [0,45-0,72]	0,65 [0,52-0,77]	0,58 [0,45-0,70]	0,34 [0,22-0,49]
M	2022	0,06 [0,02-0,19]				0,01 [0-0,19]			0,37 [0,21-0,57]	
M	2023	0,04 [-0,01-0,12]	0,35 [0,22-0,49]	0,41 [0,28-0,55]	0,48 [0,34-0,62]	0,04 [0,01-0,12]	0,05 [0,01-0,15]	0,02 [0-0,08]	0,41 [0,28-0,56]	0,16 [0,06-0,30]
N	2022	0,55 [0,35-0,73]				0,49 [0,26-0,73]			0,73 [0,55-0,86]	

2.3 Enquêtes sur les pratiques agricoles de chacun des champs échantillonnés

Méthodologie

Pour chaque ferme participante au projet, une enquête annuelle a été réalisée. Celle-ci comprenait des questions portant sur la superficie de production, la ou les variétés de pommes de terre cultivées, la distance entre les champs, la présence de rotations culturales dans la région, ainsi que l'utilisation des insecticides (produits employés, fréquence d'application et efficacité perçue). Voir l'annexe 2 pour le détail des questions. En complément de cette enquête, une caractérisation du paysage a été effectuée dans un rayon de 1 km autour du champ échantillonné, dont la position a été déterminée à l'aide d'un point GPS. Pour ce faire, les cartes *InfoSols2* (données publiques) ont été analysées à l'aide du logiciel Zen 3.4 (Zeiss, fonction *analyse surface*) afin de calculer la superficie totale des zones agricoles, à l'exclusion des parcelles de pommes de terre, permettant ainsi d'estimer le pourcentage de couverture agricole du paysage. Ce rayon d'un kilomètre a été retenu, car il correspond à la distance maximale de dispersion printanière des femelles de DPT (Weisz et al., 1994). Les mêmes analyses cartographiques ont également permis de vérifier la présence de superficies en culture de pomme de terre dans ce même rayon. Les informations recueillies ont ensuite été analysées de manière qualitative afin de formuler des hypothèses sur les facteurs paysagers et culturels pouvant être associés à la présence de résistance.

Résultats

Les enquêtes menées auprès des producteurs et les données cumulées au cours des trois années, ont fourni une quantité d'informations pertinentes permettant de mieux contextualiser les résultats des bioessais, présentés en quatre volets ci-dessous.

Rotation des cultures

Les champs de pommes de terre étaient cultivés en moyenne 2,3 années sur 5 (± 1), souvent dans les mêmes parcelles, ce qui limitait l'efficacité de la rotation pour réduire la pression exercée par le DPT. Cette faible rotation favorisait l'exposition répétée des populations aux insecticides et, par conséquent, le maintien ou le développement de résistances. Pour une gestion efficace, les champs devraient être distants d'au moins 400 mètres (Sexson et Wyman, 2005). Or, les enquêtes ont révélé la présence de près de trois autres champs de pommes de terre dans un rayon rapproché, offrant des refuges favorables aux DPT et augmentant les risques d'expositions répétées.

Pulvérisations non ciblées pour le DPT

La culture en place l'année précédant la culture de la pomme de terre, a reçu entre une et six applications d'un insecticide homologué contre le DPT, bien que celui-ci n'était pas directement visé. De plus, en moyenne 25 % des terres, dans un rayon de 1 km autour des champs échantillonnés, étaient consacrés à la production de cultures utilisant également des traitements phytosanitaires. Certains produits comme le Coragen® (28), le Delegate™ (5) et le Matador® (3A), pour lesquels des résistances ou des tolérances fortes ont été observées pendant les bioessais, ont pu être utilisés dans ces champs, exposant ainsi accidentellement les adultes hivernants avant leur migration vers les champs de pommes de terre. Cette exposition indirecte pourrait contribuer au maintien des résistances.

Connaissance de la pression du ravageur et vérification de l'efficacité des traitements phytosanitaires

Les enquêtes ont parfois montré une discordance entre l'efficacité perçue des traitements et les résultats des bioessais. Par exemple, deux fermes avaient rapporté de bons résultats avec des insecticides auxquels leurs populations s'étaient pourtant révélées résistantes. Cela pourrait traduire soit une sous-estimation de la pression réelle du ravageur, soit une évaluation approximative de

l'efficacité post-traitement. Inversement, plusieurs fermes ont fourni des évaluations cohérentes avec les données issues des bioessais : trois fermes ont signalé une efficacité moyenne pour des insecticides dont les populations ont montré une résistance, cinq autres une efficacité moyenne pour des insecticides dont les populations ont montré une tolérance, et une seule ferme a correctement associé une faible efficacité à une résistance confirmée.

Rotation des insecticides selon leur groupe chimique et présence de résistance croisée

Le phénomène de résistance croisée pourrait également expliquer pourquoi certaines populations présentaient une résistance à des insecticides qui n'étaient pourtant pas utilisés dans les fermes où elles avaient été échantillonnées. Les quatre exemples suivants sont issus de l'analyse des enquêtes en lien avec les résultats de bioessais :

- Une seule ferme a utilisé le Sivanto^{MD}Prime lors des trois dernières années. Cependant, sept des huit populations provenant de fermes en régie conventionnelle, testées en 2023, se sont révélées résistantes. La dernière population a été caractérisée comme étant tolérante à ce produit.
- Trois fermes seulement ont utilisé de l'Actara[®] au cours des cinq dernières années, les populations issues de neuf fermes, dont une en régie biologique, montraient une résistance à cet insecticide. Selon la logique de résistance croisée, il est probable que l'exposition répétée à d'autres néonicotinoïdes, utilisés par neuf fermes sur 11 en régie conventionnelle, ait contribué au maintien d'une résistance généralisée au sein du groupe chimique 4, même en l'absence d'utilisation directe de certains produits spécifiques.
- Une ferme en régie biologique, qui n'utilisait plus le EntrustTM depuis plusieurs années, abritait tout de même une population résistante.
- Aucune ferme participante n'a utilisé le Matador[®] au cours des cinq dernières années alors que la résistance des populations issues de ces fermes a atteint 78,5 %.

Une attention particulière devrait donc être portée au choix des insecticides, en évitant non seulement ceux pour lesquels une résistance est documentée, mais aussi ceux associés à une tolérance élevée. Il est important de rappeler que la résistance peut persister plusieurs années au sein d'une population, même sans exposition au produit concerné. Ces observations soulignent la nécessité d'une gestion intégrée du ravageur incluant une rotation rigoureuse des groupes chimiques, afin de ralentir le développement de la résistance (Alyokhin et al., 2008; Scott et al., 2023).

L'analyse des enquêtes et les hypothèses formulées démontrent que, pour limiter le développement et le maintien de la résistance au sein des populations québécoises de DPT, la mise en œuvre d'une lutte intégrée est essentielle. Celle-ci repose sur :

- Un aménagement paysager réfléchi, favorisant une rotation efficace des cultures et une distanciation suffisante entre les champs de solanacées ;
- Une utilisation raisonnée des produits phytosanitaires, en excluant ceux associés à une résistance ou une tolérance connue ;
- Une rotation stricte des insecticides selon leur groupe chimique ;
- L'adoption de méthodes de lutte alternatives.

Ces ajustements demeurent toutefois tributaires de plusieurs facteurs, notamment la tolérance au risque des producteurs, le type de régie de culture, le marché de distribution, ainsi que la collaboration régionale entre exploitations voisines.

Enfin, il convient de rappeler que les doses utilisées lors des bioessais étaient volontairement plus faibles que celles appliquées en conditions de terrain. Les résultats doivent donc être interprétés dans le contexte du projet, dont l'objectif principal était de développer un outil de comparaison entre

populations sauvages et sensibles, et non de remettre en cause les doses recommandées en pratique agricole. Les données obtenues confirment néanmoins la présence d'un phénomène de résistance croissante chez certaines populations québécoises de DPT.

Objectif 3 - Valider la méthodologie moléculaire pour détecter la résistance des populations de DPT

3.1 Identification des gènes

Méthodologie

Dans le but d'identifier les gènes associés à la réponse et à la résistance à différents insecticides chez le DPT, divers transcrits d'intérêt ont été amplifiés par RT-qPCR à partir d'ARN total isolé chez des larves soumises aux traitements insecticides de l'objectif 2.2. Une quantification préliminaire des transcrits codant pour certains cytochromes P450s (CYP) et glutathion-S-transférases (GST), deux familles de gènes clés impliquées dans la détoxification et la résistance aux insecticides, a été réalisée. Les transcrits testés comprenaient : CYP4c1, CYP4g15, CYP6a13, CYP6a23, CYP6d4, CYP9e2, CYP12a5, GST, GST1 et GST1-like. Le choix final des gènes ciblés a été établi selon les critères suivants : *i*) les gènes présentant une surexpression marquée chez les individus résistants, et *ii*) la disponibilité et la validation des amorces correspondantes par l'équipe de Pier Morin.

Analyse des données

Les gènes associés à la résistance pour chaque insecticide ont été identifiés en comparant l'expression des dix gènes ciblés, entre une population sensible et une population résistante. L'expression génique a été estimée à l'aide d'un modèle linéaire mixte multivarié (MLMM), permettant d'évaluer simultanément plusieurs gènes pour chaque population sélectionnée. Des contrastes post hoc ont ensuite été réalisés afin d'identifier les gènes présentant les plus fortes différences d'expression entre la population sensible et la population résistante, pour chaque insecticide. Le modèle incluait la population, l'insecticide et leur interaction comme effets fixes, tandis que les répétitions expérimentales étaient considérées comme effet aléatoire. Une approche bayésienne a été employée pour l'ajustement des modèles (McElreath, 2018), à l'aide de la librairie *brms* (Bürkner, 2021). Cette approche repose sur des simulations de type Hamiltonian MCMC, assurant une meilleure estimation des paramètres dans les modèles complexes. Huit chaînes de 5 000 itérations ont été lancées, en conservant les 2 500 dernières de chacune pour un total de 20 000 itérations, soit environ dix fois le nombre minimal habituellement recommandé. La validation des modèles a été effectuée en examinant plusieurs diagnostics de convergence, la forme des distributions postérieures, la qualité du mélange des chaînes (*chain mixing*), la cohérence inter-chaînes et le nombre effectif d'itérations.

Résultats

L'expression de sept CYP et trois GST a été quantifiée afin de déterminer le gène le plus surexprimé dans le cadre d'une résistance aux insecticides. Une légère surexpression des GST a été identifiée en réponse à une exposition à l'Entrust™ et au Matador®, cependant les amorces se sont révélées indisponibles commercialement ou non validées en laboratoire, il a donc été choisi de ne pas aller de l'avant avec les GST dans ce projet.

Dans le cas du Delegate™ (Figure 2), le CYP4g15 a été 3,26 fois plus exprimé dans la population la plus résistante à cet insecticide que dans la population la plus sensible à cet insecticide, sans l'implication des autres gènes testés. Le même processus a été fait pour l'ensemble des insecticides.

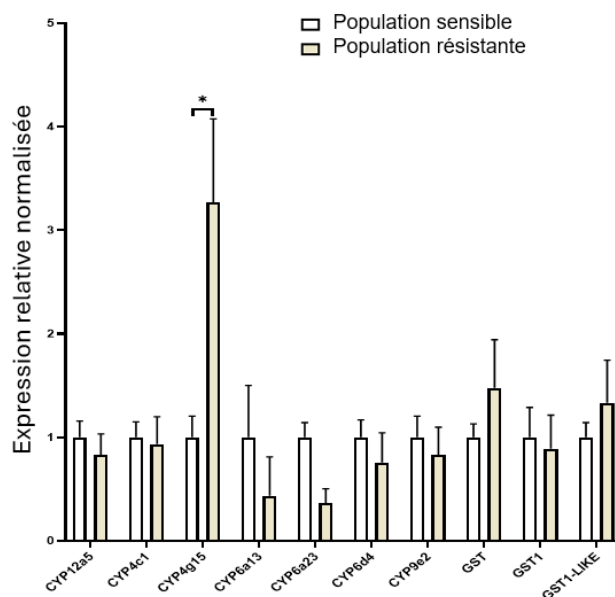


Figure 2. Expression relative des gènes, sept cytochromes P450s (CYP) et trois glutathion-S-transférases (GST) chez la population la plus sensible et la population la plus résistante au Delegate™. L'étoile indique une différence significative au seuil $\alpha = 0,05$ entre les deux populations pour le CYP4g15 (test post hoc).

Aucune surexpression génique n'a été détectée pour le Coragen® et le Vayego®, ce qui concorde avec l'absence de résistance observée lors des bioessais. Par conséquent, aucun test n'a été mené en 2024 avec ces insecticides. À l'inverse, pour le Matador®, des surexpressions ont été observées pour six des sept CYP testés, ainsi que pour toutes les cibles GST, il n'a donc pas été possible de déterminer la cible principalement responsable de la résistance. De ce fait, aucun bioessais n'a été mené en 2024 pour cet insecticide.

Les analyses moléculaires ont permis d'identifier la surexpression de transcrits pour cinq des insecticides testés. L'identification de quatre CYP d'intérêt, surexprimés chez des populations résistantes par rapport à des populations sensibles au même insecticide a été faite (Tableau 5). Pour tous les insecticides du groupe 4, le gène CYP6a23 a été largement surexprimé dans la population résistante, par rapport aux autres gènes, soit 4,31 fois pour l'Actara®, 7,14 fois pour le Titan® et 6,06 fois pour le Sivanto^{MD}Prime. Afin de maximiser notre effort, il a été décidé, en accord avec le LEDP, de ne travailler que sur deux insecticides de ce groupe, en mettant l'accent sur ceux appartenant aux néonicotinoïdes. Dans le but d'identifier un marqueur commun au sein d'une même famille, il a été décidé de tester uniquement le gène CYP6a23, bien que le CYP6a13 ait également été fortement surexprimée, en réponse à une exposition à l'Actara®. Pour l'Entrust™, c'est le gène CYP9e2 qui a été 4,95 fois plus exprimé dans la population plus résistante que dans la population la plus sensible alors que pour le Verimark®, c'est le CYP6d4 qui a été 2,08 fois plus exprimé. Ces résultats ont permis d'identifier une cible par insecticide ou groupe chimique sans chevauchement pouvant laisser espérer une spécificité et donc une facilité de diagnostic.

Tableau 5. Choix des gènes cibles en fonction des résultats de biologie moléculaire. Certains gènes ont été légèrement surexprimés (↑) alors que d'autres l'ont été fortement (↑ ↑) dans la population la plus résistante à un insecticide donné, par rapport à la population la plus sensible à ce même insecticide. Les cases vides indiquent l'absence de surexpression du gène. Les cases orangées indiquent les gènes choisis pour les tests de diagnostic moléculaire en 2024, pour les cinq insecticides testés.

Nom commercial	Groupe chimique	CYP12a5	CYP4c1	CYP4g15	CYP6a13	CYP6a23	CYP6d4	CYP9e2
Actara®	4A				↑ ↑	↑ ↑		
Titan®	4A					↑ ↑		↑
Delegate™	5			↑ ↑				
Entrust™	5	↑	↑				↑	↑ ↑
Verimark®	28						↑ ↑	

3.2 Synthèse de l'ARN interférent (ARNi) et validation de leur fonctionnalité par l'ingestion d'ARNi

Méthodologie

Synthèse de l'ARNi

Dans le but de bloquer l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la résistance, des ARN interférents (ARNi) ont été synthétisés pour chacun des gènes cibles. Cette approche visait à réduire l'expression des gènes cibles, afin de rendre les DPT plus sensibles aux insecticides.

Pour la synthèse de l'ARNi, l'extraction d'ARN total a d'abord été réalisée à l'aide du kit RNeasy Universal (Thermo Fisher Scientific), suivie de la synthèse de l'ADNc. L'ADNc obtenu a ensuite servi de matrice pour l'amplification par PCR, avec l'ajout de séquences promotrices T7 aux amorces spécifiques des gènes ciblés. Les produits amplifiés ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR (QIAGEN). La synthèse d'ARN double brin a ensuite été effectuée à partir de cette matrice ADN en utilisant les nucléotides et enzymes T7 du kit MEGAscript RNAi (Thermo Fisher Scientific). Des traitements à la DNase et à la RNase ont ensuite permis d'éliminer les acides nucléiques résiduels indésirables. L'ARNi obtenu a été quantifié puis conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation pour les essais d'ingestion chez les larves sauvages.

Validation de l'efficacité des ARNi

Afin de valider l'efficacité de l'ARNi synthétisé, les ARNi ciblant deux gènes CYP ont été testés par ingestion chez des larves de premier stade (L1) dans une plaque ELISA. Pour chaque traitement (ARNi et témoin à l'eau distillée), 12 larves L1 issues de la population sensible ont été placées individuellement dans des puits contenant un disque foliaire de pomme de terre. Un volume correspondant à 1 µg d'ARNi, ajusté selon la concentration, a été déposé dans chaque puits à l'aide d'une micropipette, puis incubé à 25 °C et 60 % HR pendant 24 h afin d'assurer l'ingestion.

Après cette période, les neuf larves les plus vigoureuses de chaque traitement ont été plongées dans l'azote liquide, puis regroupées par trois dans des tubes à vis distincts. L'expression des gènes ciblés a ensuite été quantifiée par RT-qPCR à partir de l'ARN total extrait des larves traitées à l'ARNi, comparativement à celles soumises au traitement témoin (eau distillée). Cette étape a permis de valider la méthodologie utilisée pour initier les bioessais de l'objectif 3.3.

Analyse des données

L'efficacité de l'ARNi a été évaluée en comparant l'expression des gènes cibles CYP4g15, CYP6a23, CYP6d4 et CYP9e2 chez la population sensible. Des larves ont été soumises à deux traitements : témoin (eau distillée) et ARNi. Les essais ont été réalisés dans des plaques ELISA selon une exposition de 24 h. Chaque gène cible a été analysé séparément à l'aide d'un modèle linéaire mixte (LMM), et les comparaisons entre traitements ont été effectuées par contrastes bayésiens, suivant la même approche que décrite précédemment. Le traitement a été modélisé comme effet fixe, tandis que l'identifiant combiné date-échantillon a été inclus comme effet aléatoire (jusqu'à quatre mesures par combinaison date/échantillon/traitement).

Résultats

Les bioessais ont permis de valider le fonctionnement des ARNi et l'inactivation des gènes cibles dès 24 h post-exposition (Figure 3). L'expression du CYP6a23 a été réduite de 93,9 % chez les individus ayant consommé l'ARNi correspondant, par rapport aux témoins. L'expression du CYP6d4, a quant à elle diminuée de 53,2 %. Cette étape a permis de valider que l'exposition à l'ARNi seulement 24 h avant l'exposition aux insecticides était suffisante pour induire une réponse.

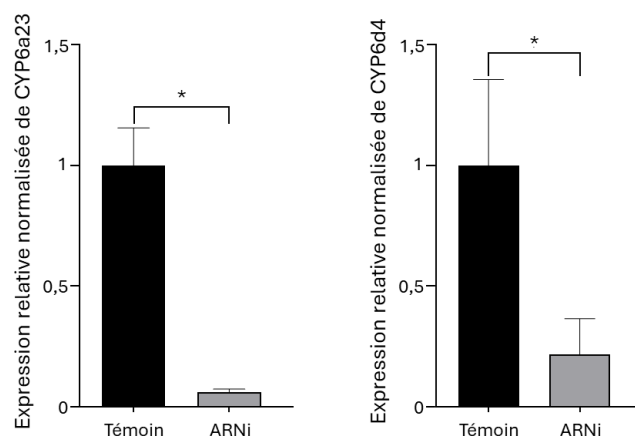


Figure 3. Expression relative normalisée pour les gènes cibles CYP6a23 et CYP6d4 à la suite d'une exposition de 24 h des larves L1 aux ARNi respectifs. Le graphique présente l'expression pour les individus témoins (noir) et les individus ayant consommé l'ARNi (gris). L'étoile indique une différence significative au seuil $\alpha = 0,05$ entre les deux groupes (test post-hoc).

3.3 Validation de l'implication des gènes, dans le mécanisme de résistance, par bioessais

Méthodologie

Pour valider le blocage des gènes ciblés et leurs impacts potentiels sur la résistance, des bioessais ont été réalisés pour chaque combinaison gène cible/insecticide sur les trois populations identifiées comme les plus résistantes lors des bioessais de 2023. Ces trois populations comprenaient celle ayant servi à l'identification du gène cible (en gras ci-après) : Actara® (**C**, H, E), Delegate™ (**A**, C, D), Entrust™ (**A**, B, E), Titan® (C, H, **M**) et Verimark® (B, **C**, H).

L'exposition à l'ARNi a été effectuée sur des larves de premier stade (L1), afin d'assurer la continuité méthodologique avec les essais des années précédentes et de permettre ensuite une exposition aux insecticides au deuxième stade larvaire (L2). Les larves L1 ont été soumises à trois traitements : i) solution tampon ; ii) ARNi ou iii) eau distillée (témoin). En fonction de ce premier traitement, les larves L2 ont ensuite été exposées à deux modalités, eau distillée ou insecticide, selon l'ordre présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

Tableau 6. Pulvérisations des disques foliaires en fonction de la modalité lors des bioessais. L1 et L2 représente les larves de DPT de premier et deuxième stade respectivement.

Stades larvaires	Traitement 1 (Témoin)	Traitement 2 (ARNi + insecticide)	Traitement 3 (Témoin insecticide)
Feuille + L1 (2 x 7 larves)	Solution tampon	ARNi	Eau distillée
Feuille + L2 (2 x 5 larves)	Eau distillée	Insecticide	Insecticide

L'exposition au stade L1 a été réalisée par pulvérisation à l'aide d'un pistolet vaporisateur (pression de 9 psi, distance standardisée de dix cm) sur des disques foliaires de 26 mm de diamètre. Les pulvérisations ont été effectuées dans l'ordre suivant : eau distillée, solution tampon, puis ARNi. Avant chaque série, les solutions ont été homogénéisées au vortex et les embouts de pipette ont été remplacés entre chaque modalité. Une vérification du débit complet du pistolet a été réalisée à chaque manipulation. La concentration en ARNi a été standardisée à 1 µg d'ARNi par individu, le volume appliqué a été ajusté selon la concentration initiale produite. Deux boîtes de Pétri ont été préparées par traitement, contenant chacune sept larves L1 (contre cinq pour les L2) afin de compenser les pertes potentielles avant la phase d'exposition aux insecticides.

Après 24 h d'exposition à 25 °C et 60 % HR, cinq larves de stade L2 ont été transférées du premier Pétri vers un second contenant un disque foliaire de 42 mm de diamètre, préalablement trempé et séché selon la méthode décrite à la section 2.2. Ce délai de 24 h post-exposition à l'ARNi avait été préalablement testé et validé comme suffisant pour induire l'inactivation du gène cible.

Selon l'insecticide testé, les observations de mortalité ont été effectuées 48 h ou 72 h post-exposition, conformément aux protocoles établis. Les individus vivants à la fin des bioessais ont été conservés à – 80 °C afin de permettre la vérification du blocage effectif des gènes ciblés par analyses moléculaires subséquentes.

Analyse des données

L'effet de l'inactivation des gènes sur la mortalité a ensuite été évalué par bioessais réalisés sur les populations résistantes. Pour chaque insecticide, la mortalité a été mesurée après exposition à deux traitements *i)* insecticide seul, et *ii)* ARNi + insecticide. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM), considérant le traitement comme effet fixe et la population comme effet aléatoire. Les réplications expérimentales ont également été incluses comme effets aléatoires nichés dans la population, afin de tenir compte de la structure hiérarchique des données. Cette complexité hiérarchique ayant entraîné des problèmes de convergence avec le package *glmmTMB*, une approche bayésienne similaire à celle décrite précédemment a été adoptée pour ajuster le modèle et estimer l'effet global de l'ARNi, ainsi que les différences d'effet entre populations.

Résultats

Validation de l'efficacité des ARNi chez les populations sauvages

Une réduction de l'expression des gènes cibles a bien été détectée. La figure 4 illustre, à titre d'exemple, l'effet de l'inactivation du gène CYP4g15 pour les trois populations testées. Les pics en gris représentent l'expression du gène de référence RP18, le fait qu'il soit stable valide son utilisation. Les pics en bleu représentent l'expression du CYP4g15 pour les individus ayant ingérés l'ARNi avant l'insecticide ou ayant été uniquement exposé au Delegate™. La valeur Cq (cycle de quantification), correspond au moment où le signal de fluorescence de l'ADN, du gène considéré, a atteint son seuil d'expression. Le fait que les pics bleus des individus ayant reçu l'ARNi et l'insecticide soient décalés vers la droite, indique une détection de la fluorescence plus tardive et donc une expression moindre.

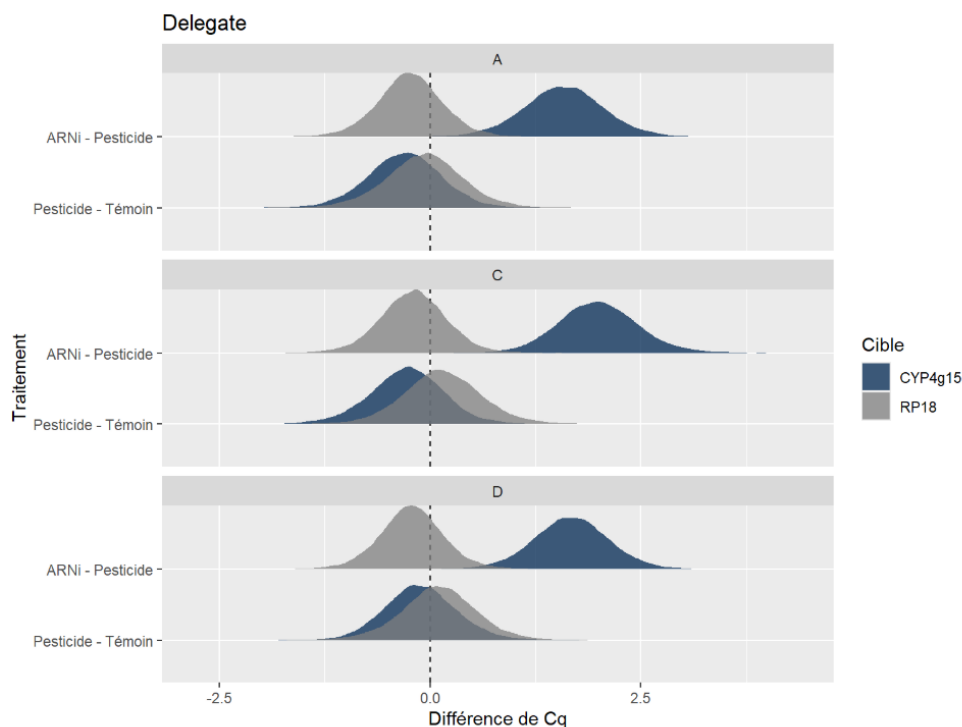


Figure 4. Différence de Cq (nombre de cycles de qPCR) représentant l'expression du gène CYP4g15 (bleu) comparée à un gène de référence RP18 (gris) pour un groupe d'individus exposés à l'ARNi puis à l'insecticide comparativement à un groupe uniquement exposé au Delegate™. La ligne pointillée représente une différence nulle dans l'expression des deux gènes.

À l'issue des évaluations, la probabilité de réduction de l'expression de chaque gène, a été forte pour chacune des populations (Tableau 7). La plus grande instabilité a été détectée pour le CYP6d4. Pour les autres gènes, cette probabilité a été supérieure à 87 % et a même atteint 99 % dans la majorité des cas. Les gènes CYP6a23, CYP4g15 et CYP9e2 ont bien réagi à l'exposition à leur ARNi respectif, avec une probabilité de réduction de l'expression génique supérieure à 98 %, variant selon les populations et les cibles. Il est bien établi que l'utilisation de l'ARNi peut inhiber l'expression de certains gènes afin de réduire la résistance (par exemple, contre l'acétamipride, Chen et al., 2023 ; les pyréthrinoides, Dulbecco et al., 2021), bien que cette inhibition ne soit généralement ni complète ni durable, représentant souvent une action transitoire (Zhu et al., 2011). Les CYP étudiés ont été sélectionnés en partie car ils sont déjà connus pour jouer un rôle clé dans les mécanismes de résistance chez plusieurs insectes (Kaplanoglu et al., 2017 ; Bastarache et al., 2022).

Tableau 7. Probabilité de réduction de l'expression du gène ciblé en fonction de l'insecticide (nom commercial) et de la population sauvage testée, à la suite d'une exposition à l'ARNi puis à l'insecticide correspondant. Les pourcentages en gras sont considérés comme ayant un effet non négligeable.

Nom commercial	Gène ciblé	Populations testées	Probabilité de réduction de l'expression du gène ciblé
Actara®	CYP6a23	C	87 %
		H	99 %
		E	99 %
Delegate™	CYP4g15	A	99 %
		C	99 %
		D	99 %
Entrust™	CYP9e2	A	99 %
		B	99 %
		E	98 %
Titan®	CYP6a23	C	99 %
		H	96 %
		M	99 %
Verimark®	CYP6d4	B	95 %
		C	54 %
		H	88 %

Impact de l'inactivation des gènes cibles sur la mortalité des individus

À la suite de l'inactivation du gène ciblé, une augmentation de la sensibilité (ou une perte partielle de résistance) lors de l'exposition à l'insecticide correspondant au CYP bloqué, a été observée. Par exemple, les individus ayant ingéré l'ARNi ciblant le gène CYP4g15 avant l'exposition au Delegate™, étaient plus sensibles que ceux n'en n'ayant pas ingéré (Figure 5).

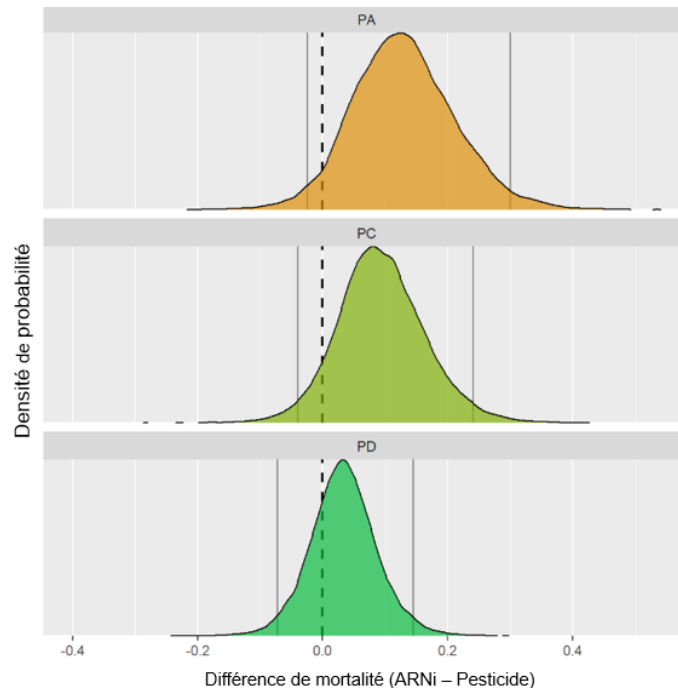


Figure 5. Différence de mortalité des individus résistants de trois populations (A-C-D) exposées à de l'ARNi (CYP4g15) suivi de l'insecticide correspondant (Delegate™) comparé à des individus résistants exposés uniquement au Delegate™. La ligne pointillée représente une différence nulle entre les deux traitements. Les lignes pleines représentent les intervalles de confiance (IC) à 95 %.

Toujours en ce qui concerne le Delegate™, en combinant les trois populations testées, la probabilité que l'ARNi augmente la mortalité a atteint 87 % (Tableau 8). Une différence marginale mais significative (probabilité de 95 %) a été observée pour la population A, où le blocage du gène CYP4g15 a entraîné une augmentation d'environ 13 % de la mortalité. Pour la population C, la probabilité de 92 % indiquait une hausse de la mortalité d'environ 9 %. En revanche, aucune différence claire n'a été détectée pour la population D.

Une augmentation significative de la sensibilité a été observée seulement à trois reprises, soit Delegate™ – populations A et C ainsi que Entrust™ – population E. Il est intéressant de noter que la même approche de validation employée par Kaplanoglu et al., (2024), également sur des DPT, a permis d'obtenir une augmentation de la sensibilité d'environ 17 % en bloquant l'expression d'un seul gène ciblé, ce qui demeure comparable aux résultats de la présente étude.

Ainsi, selon l'insecticide et la population, l'effet sur la mortalité a été plus ou moins important bien que la probabilité de réduction de l'expression du gène eu été bien réelle. Pour certaines populations et cibles, l'effet inverse a même été observé avec moins de mortalité chez les individus ayant ingérés de l'ARNi (Tableau 8). Cela illustre bien que les mécanismes de résistance reposent généralement sur l'interaction de plusieurs gènes, rendant leur identification exhaustive particulièrement complexe. Ainsi, une restauration complète de la sensibilité n'était pas attendue et n'a pas été observée.

Tableau 8. Différences de mortalité entre les individus ayant reçus l'ARNi et l'insecticide correspondant ou seulement l'insecticide, pour chaque population. La probabilité d'une différence de mortalité est présentée pour chaque gène ciblé, produit testé et population. Les pourcentages indiqués en gras correspondent aux effets considérés comme biologiquement significatifs.

Nom commercial	Gène ciblé	Probabilité d'une différence de la mortalité	Populations testées	Probabilité d'avoir une différence	Différence de mortalité
Actara®	CYP6a23	65 %	C	71 %	3 %
			H	63 %	4 %
			E	68 %	4 %
Delegate™	CYP4g15	80 %	A	95 %	13 %
			C	92 %	9 %
			D	75 %	3 %
Entrust™	CYP9e2	< 50 %	A	96 %	-13 %
			B	63 %	3 %
			E	85 %	13 %
Titan®	CYP6a23	30 %	C	80 %	-5 %
			H	94 %	-13 %
			M	57 %	2 %
Verimark®	CYP6d4	65 %	B	57 %	2 %
			C	91 %	13 %
			H	56 %	2 %

La validation de certains gènes ciblés a pu être réalisée pour quelques insecticides et populations. Les résultats ont montré que la surexpression de gènes tels que CYP6a23, CYP4g15 et CYP9e2 jouait un rôle déterminant dans la résistance à l'Actara®, au Titan®, au Delegate™ et à l'Entrust™, respectivement. En revanche, l'implication de multiples gènes interagissant pour mettre en place un mécanisme de détoxification vis-à-vis d'un même insecticide demeure clairement non négligeable. En effet, il est probable que d'autres cytochromes P450s ou enzymes de détoxification, notamment les GSTs, contribuent également à la neutralisation des insecticides (Højland et al., 2017). Une approche combinée d'ARNi à cibles multiples pourrait donc représenter une stratégie prometteuse pour réduire

la résistance aux insecticides, comme l'ont montré Kaplanoglu et al., (2024). Par exemple, en inhibant simultanément CYP6a23 et CYP4g15, il serait possible de limiter les voies métaboliques alternatives utilisées par les insectes pour compenser la perte d'activité d'un seul gène, maximisant ainsi l'efficacité de l'ARNi et renforçant la validation fonctionnelle des gènes impliqués dans la résistance. Nos résultats vont dans ce sens et soulignent l'intérêt d'envisager l'utilisation d'ARNi ciblant plusieurs transcrits (par exemple CYP6a23 et CYP4g15) afin de sensibiliser les insectes à un insecticide donné, ou à une classe d'insecticides spécifique.

Pour conclure, bien que la validation expérimentale de certains gènes n'ait pu être confirmée pour l'ensemble des insecticides ou populations, il est bien établi que la résistance aux insecticides constitue un phénomène multifactoriel, impliquant plusieurs gènes agissant simultanément au sein de différents mécanismes de détoxification (Paine et al., 2016; Kaplanoglu et al., 2024). Néanmoins, les résultats de l'objectif 2 ont mis en évidence une surexpression significative d'un CYP spécifique pour trois populations reconnues résistantes à l'insecticide correspondant, confirmant ainsi la pertinence des cibles sélectionnées pour l'étude de la résistance.

Objectif 4 - Transférer la méthodologie au laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ.

Le dernier objectif du projet visait à transférer tous les protocoles concernant la méthodologie développée et utilisée aux fins de ce projet. Une liste d'équipements et de consommables nécessaires a été fournie, tout comme des individus congelés qui peuvent servir de témoins pour de futures analyses. En plus de la méthodologie pour les essais de biologie moléculaire, tous les protocoles pour faire les bioessais et les élevages de DPT ont été transférés sous le format de protocoles écrits, mais également à la suite d'une formation des membres du LEDP d'une durée de quatre jours dans nos installations à l'IRDA. L'équipe du LEDP est en mesure de mener l'ensemble des expérimentations, en autonomie, dès la fin de ce projet.

CONCLUSION

Ce projet a permis de confirmer l'utilité des bioessais, grâce auxquels il a été possible de détecter des résistances sans même connaître précisément les mécanismes génétiques sous-jacents. Les résultats obtenus dans le cadre des objectifs 1 et 2 démontrent que le phénomène de résistance du DPT au sein des populations québécoises est préoccupant.

L'analyse des différentes enquêtes de terrain a mis en évidence plusieurs enjeux, notamment l'importance d'une gestion fine du paysage agricole, par des pratiques telles que la rotation des cultures ou la distanciation spatiale (Gao et al., 2024). L'analyse des enquêtes a également permis de souligner la nécessité de mieux connaître la pression du ravageur et de baser les interventions sur des seuils agronomiques, tout en maintenant une rotation rigoureuse des groupes chimiques utilisés (Scott et al., 2023). De plus, la vérification régulière de l'efficacité des traitements devrait devenir une étape prioritaire, puisqu'elle constitue un indicateur précoce du développement potentiel de la résistance au champ.

Bien qu'un gène cible n'ait été identifié que pour certains insecticides (six sur neuf), le processus de validation par bioessais entrepris dans l'objectif 3 n'a pas conduit aux résultats attendus. Ces travaux ont néanmoins permis de confirmer que les mécanismes de résistance sont hautement complexes et reposent sur l'interaction simultanée de plusieurs gènes. Il est important de rappeler que le présent projet visait avant tout à soutenir le développement d'un service d'analyse biomoléculaire, et non à identifier l'ensemble des gènes impliqués dans la détoxification de chaque insecticide. Cependant, les

résultats ont tout de même mis en évidence plusieurs signatures d'expression génique spécifiques aux populations résistantes et aux insecticides testés. Ces signatures, principalement associées aux gènes de détoxification de type CYP450, représentent des profils d'expression distincts pouvant servir de base à un futur service de diagnostic moléculaire destiné à détecter précocement la résistance chez les insectes à partir de leur signature transcriptionnelle. L'analyse de ces transcrits a également permis d'identifier des gènes candidats susceptibles d'être utilisés pour anticiper l'émergence de la résistance d'une population à la suite de l'exposition d'insecticides tels que Actara®, Delegate™, Entrust™, Titan® et Verimark®.

Par ailleurs, ce projet a confirmé l'efficacité des approches basées sur l'ARNi pour réduire l'expression de gènes associés à la résistance, démontrant qu'une telle stratégie peut influencer significativement la sensibilité des insectes à divers composés. Ces résultats ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour la gestion durable de la résistance aux pesticides.

Enfin, grâce au transfert des connaissances acquises dans le cadre de l'objectif 4, le LEPD sera désormais en mesure d'évaluer la possibilité d'offrir un service de diagnostic de résistance du DPT pour certains insecticides, fournissant ainsi un outil concret d'aide à la décision pour les producteurs agricoles.

DIFFUSION DES RÉSULTATS

Plusieurs communications ont eu lieu durant les trois années du projet, ciblant des publics différents, des producteurs aux conseillers (MAPAQ et privés) du secteur de la pomme de terre, en passant par la communauté scientifique.

En 2022, le projet a été présenté au colloque Pommes de terre à Lévis. La même année et la suivante, le projet et ses résultats ont été présentés aux journées RAP Solanacées.

En 2023, des résultats ont été présentés lors d'une journée "producteurs" dans les Laurentides, mais également à la journée Phytoprotection du CRAAQ.

En 2024, deux affiches scientifiques ont été présentées lors d'un congrès national (Société d'Entomologie du Québec, à Québec, Annexes 3 et 4) et lors d'un congrès international (Entomological Society of America, conférence virtuelle, Annexe 5). Une présentation à une journée champêtre a également été faite en Mauricie.

Le portrait de résistance des populations québécoises, réalisé dans le cadre de ce projet, a été publié dans Canadian Journal of Plant Science en 2025 (Ménard et al., 2025).

Toutes ces communications ont soulevé beaucoup d'intérêts et de questionnement quant aux solutions possibles vis-à-vis le développement de la résistance du DPT.

APPLICATION POSSIBLE POUR L'INDUSTRIE

Les résultats issus de ce projet présentent des retombées concrètes pour l'industrie agricole, particulièrement en matière de gestion intégrée de la résistance du doryphore de la pomme de terre (DPT). La mise en place d'un service de diagnostic de la résistance par le Laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection (LEPD) du MAPAQ permettrait à plus de 600 exploitations agricoles de bénéficier directement des avancées scientifiques obtenues. Ce service constituerait un outil d'aide à la décision essentiel, en fournissant aux producteurs des informations précises sur le niveau de résistance de leurs populations locales de DPT.

Les données de bioessais et d'expression génique issues du projet serviront également à sensibiliser les producteurs sur les bonnes pratiques de gestion de la résistance, notamment en appuyant sur

l'importance de la rotation des matières actives plutôt que la simple rotation des insecticides commerciaux. Une rotation rigoureuse des groupes chimiques demeure indispensable pour ralentir le développement de la résistance, tout en maintenant les insecticides comme un outil essentiel aux producteurs.

L'application des résultats de ce projet s'étend également à d'autres cultures touchées par le DPT, telles que la tomate, le poivron et l'aubergine. Ces filières pourraient, à terme, accéder au service de diagnostic développé, leur permettant d'adapter leurs stratégies de lutte selon les profils de résistance détectés.

De plus, les 14 fermes participantes à l'étude ont bénéficié d'un portrait individualisé de la résistance du DPT sur leur exploitation, leur permettant d'ajuster leurs pratiques culturales pour limiter la progression du phénomène. À plus grande échelle, la généralisation d'un tel service de diagnostic favoriserait une réduction progressive de l'utilisation d'insecticides, grâce à une meilleure gestion des interventions et à une planification plus raisonnée des traitements. Cette approche se traduirait non seulement par une diminution des coûts de production, mais aussi par des bénéfices environnementaux et sanitaires significatifs, liés à la réduction de l'usage d'intrants chimiques.

Ainsi, les connaissances acquises au cours de ce projet offrent à l'industrie agricole des pistes concrètes pour améliorer la durabilité des pratiques phytosanitaires, tout en contribuant à la préservation de l'efficacité des insecticides disponibles et à la protection de la santé des écosystèmes et des travailleurs agricoles.

RÉFÉRENCES

- Alyokhin, A., Baker, M., Mota-Sanchez, D., Dively, G., et Grafius, E. (2008). Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *American Journal of Potato Research*, 85(6), 395-413. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9052-0>
- Bastarache, P., Bouafoura, R., Omakele, E., Moffat, C. E., Vickruck, J. L., et Morin, P. J. (2023). Spinosad-associated modulation of select cytochrome P450s and glutathione S-transferases in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 112(3), e21993.
- Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A. Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Maechler, M. et Bolker, B. M. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal*, 9(2), 378-400. doi: 10.32614/RJ-2017-066.
- Bürkner, P.-C. (2021). Bayesian Item Response Modeling in R with brms and Stan. *Journal of Statistical Software*, 100(5), 1-54. doi:10.18637/jss.v100.i05
- Chen, W., Li, Z., Zhou, C., Ali, A., Ali, S., et Wu, J. (2023). RNA interference in cytochrome P450 monooxygenase (CYP) gene results in reduced insecticide resistance in *Megalurothrips usitatus* Bagnall. *Frontiers in Physiology*, 14, 1130389.
- Dulbecco, A. B., Moriconi, D. E., et Pedrini, N. (2021). Knockdown of CYP4PR1, a cytochrome P450 gene highly expressed in the integument tissue of *Triatoma infestans*, increases susceptibility to deltamethrin in pyrethroid-resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173, 104781.
- Ellis, F.W. (1989). Baseline levels and factors associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle populations in Maryland. M.S. thesis, University of Maryland, College Park, MD.
- Gabry, J., et Mahr, T. (2022). "bayesplot: Plotting for Bayesian Models." R package version 1.10.0, <<https://mc-stan.org/bayesplot/>>.
- Gabry, J., et Veen, D. (2022). _shinystan: Interactive Visual and Numerical Diagnostics and Posterior Analysis for Bayesian Models_. R package version 2.6.0.

- Gao, Y., Alyokhin, A., Prager, S. M., Reitz, S., et Huseeth, A. (2024). Complexities in the Implementation and Maintenance of Integrated Pest Management in Potato. *Annual Review of Entomology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120523-023156>
- Goodrich, B., Gabry J., Ali I. et Brilleman S. (2023). *rstanarm*: Bayesian applied regression modeling via Stan. R package version 2.26.1
- Hartig, F. (2022). *_DHARMa*: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models_. R package version 0.4.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=DHARMa>>.
- Højland, D. H., et Kristensen, M. (2017). Analysis of differentially expressed genes related to resistance in spinosad-and neonicotinoid-resistant *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae) Strains. *PloS one*, 12(1), e0170935.
- Kaplanoglu, E., Chapman, P., Scott, I. M., et Donly, C. (2017). Overexpression of a cytochrome P450 and a UDP-glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Scientific reports*, 7(1), 1762.
- Kaplanoglu, E., Scott, I. M., Vickruck, J., et Donly, C. (2024). Role of CYP9E2 and a long non-coding RNA gene in resistance to a spinosad insecticide in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Plos one*, 19(5), e0304037.
- Krolikowski, S., Atienza, V., Daigurande, A., Skikos, R., Tran, T., et Scott, I. M. (2018). Determination of susceptibility to seven insecticides registered in Canada for the control of the Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotarsa decemlineata* Say (Year End Report - Draft Version). Agriculture and Agri-Food Canada, London Research and Development Centre, London, Ontario. 12 p.
- Kromann, P., Miethbauer, T., Ortiz, O., et Forbes, G. A. (2014). Review of Potato Biotic Constraints and Experiences with Integrated Pest Management Interventions. Dans D. Pimentel et R. Peshin (Éds.), *Integrated Pest Management* (p. 245-268). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_10
- McElreath, R. (2018). *Statistical Rethinking*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781315372495>
- Ménard, É., Wu, G. M., et Bordier, C. (2025). Insecticide resistance of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) in the province of Québec. *Canadian Journal of Plant Science*, 105, 1-5.
- Mishra, Y. K., Panday, A. K., et Sharma, A. K. (Éds.). (2021). *Insect Pest Management : Concept and Approaches* (1^{re} éd.). AkiNik Publications. <https://doi.org/10.22271/ed.book.1199>
- Paine, M. J., et Brooke, B. (2016). Insecticide resistance and its impact on vector control. *Advances in Insect Control and Resistance Management*, 287-312.
- Ritz, C., Jensen, S. M., Gerhard, D., et Streibig, J. C. (2019). *Dose-Response Analysis Using R*. CRC Press.
- Scott, I.M., Tolman, J.H. et MacArthur, D.C. (2014). Insecticide resistance and cross-resistance development in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) populations in Canada 2008–2011. *Pest Management Science*. 71: 712–721.
- Scott, I. M., Vickruck, J., Hann, S., Krolikowski, S., MacKinley, P., Stokes-Rees, J., Hatten, G., et Moffat, C. (2023). Regional differences in susceptibility to spinosyn insecticides registered for Colorado potato beetle management in Canada. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 193, 105459. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105459>
- Sexson, D. L., et Wyman, J. A. (2005). Effect of Crop Rotation Distance on Populations of Colorado Potato Beetle (Coleoptera : Chrysomelidae): Development of Areawide Colorado Potato Beetle Pest Management Strategies. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 716-724. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.716>
- Viechtbauer, W. (2010). Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *Journal of Statistical Software*, 36(3), 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>
- Weisz, R., Smilowitz, Z., et Christ, B. (1994). Distance, Rotation, and Border Crops Affect Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) Colonization and Population Density and Early

Blight (*Alternaria Solani*) Severity in Rotated Potato Fields. Journal of Economic Entomology 87, 723–729. <https://doi.org/10.1093/jee/87.3.723>

PERSONNE-RESSOURCE POUR INFORMATION

Célia Bordier, Ph. D.

Chercheure en entomologie fruitière

Institut de Recherche et Développement en Agroenvironnement (IRDA)

335, rang des Vingt-Cinq Est, Saint-Bruno-de-Montarville (Québec) J3V 0G7

Tél : 450 653-7368, poste 631 | Cell. : 438 951-9677

Courriel : celia.bordier@irda.qc.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

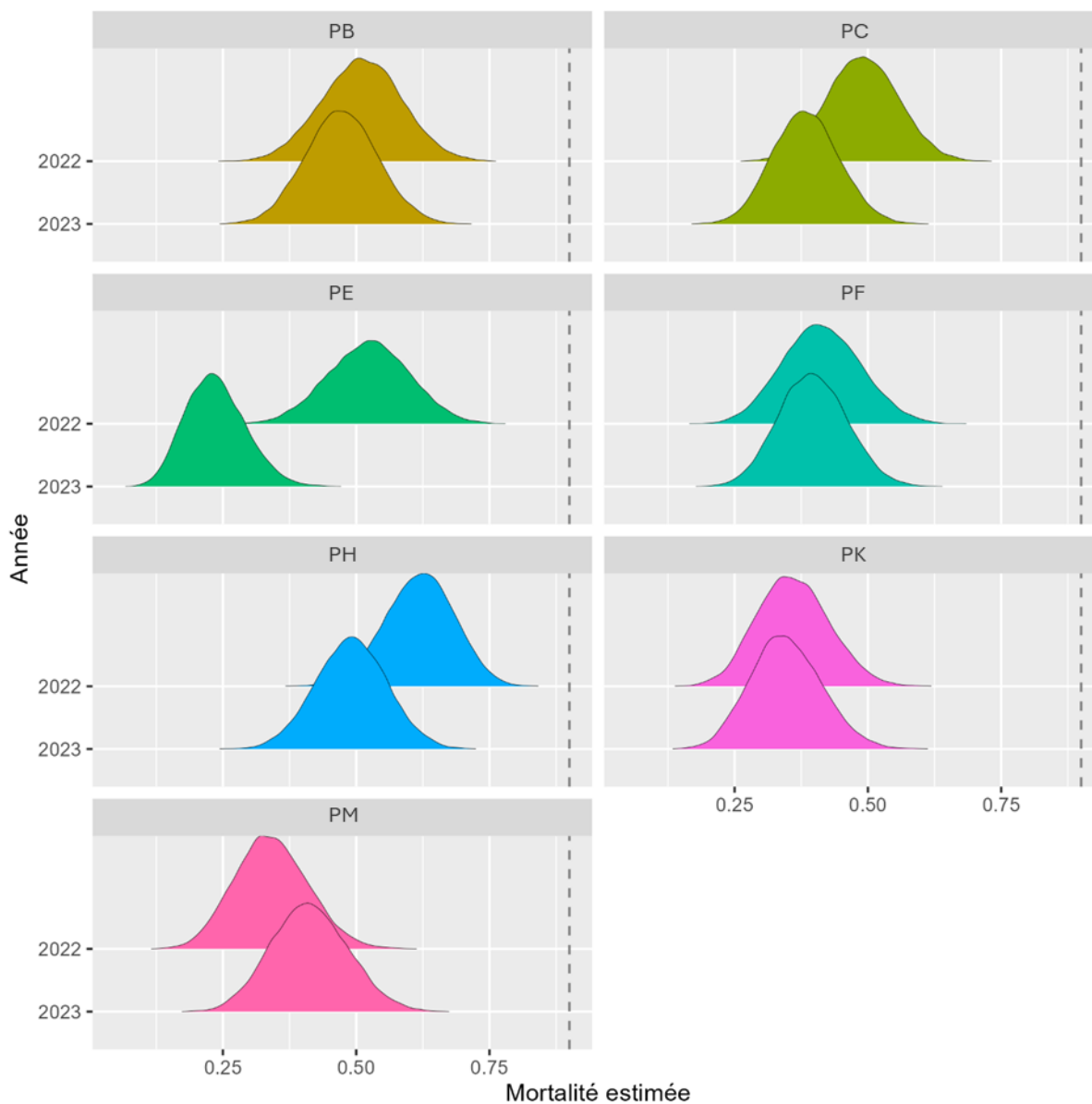
Ce projet a été réalisé dans le cadre du volet 2 du programme Prime-Vert – Approche régionale et interrégionale avec une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Clarisse Bannery, Fatoumata Bintou Diagne, Alex Faigan, Marie-Ève Jarry, Isabelle Joly-Grenier, François Martin, Alexandre Michaud, Esther Nidelle Saha Tinwa, Justin Ouellette et Léo Seguy, pour la réalisation des expérimentations. Nous remercions également Simon Legault, Annabelle Firlej et Maxime Lefebvre pour l'idéation du projet, l'aide dans les orientations scientifiques et la rédaction des différents rapports. Nous remercions Agriculture Agroalimentaire Canada (AAC) pour avoir fourni la souche sensible de DPT. Enfin nous remercions Chandra Moffat, Ian Scott, Cam Domly et Jessica Vickruck, chercheurs scientifiques à AAC pour leur appui dans l'élevage de DPT et la mise au point des différents protocoles au début de ce projet.

ANNEXES

Annexe 1. Comparaison de la proportion de mortalité des populations testées sur les deux années (B, C, E, F, K, I et L) pour le Vayego®. Les mortalités estimées (proportions) sur la base des modèles ainsi que la distribution des probabilités sont représentées par les courbes. Plus une courbe est plate, plus l'incertitude autour de la valeur est grande. La ligne pointillée représente la proportion de mortalité à 0,90. Seule la population H a montré une mortalité significativement inférieure en 2023 par rapport à 2022.



Annexe 2. Questions présentes dans l'enquête remplie par les producteurs ayant fourni des doryphores de la pomme de terre.

1. Responsable MAPAQ/Agronome Club
2. Collecteur (si différent du responsable MAPAQ ou agronome en charge)
3. Producteur
4. Informations concernant la collecte : Date, Adresse, Latitude, Longitude, Comté (MRC) :
5. Variété cultivée dans le champ échantillonné :
6. Est-ce une terre en location? : ☐ OUI ☐ NON
7. Nombre de fois que la pomme de terre a été cultivée dans ce champ lors des 10 dernières années :
8. Nombre de fois que la pomme de terre a été cultivée dans les champs voisins lors des 5 dernières années :
9. Pression attendue en doryphore pour la saison, basée sur l'historique de la parcelle (encerclez une réponse).

Nombre de DPT par plant/tige

	Adultes	Larves de petite taille	Larves de grande taille
Faible	0-15	--	0-30
Moyenne	16-24	0-75	31-74
Élevée	25	75	75

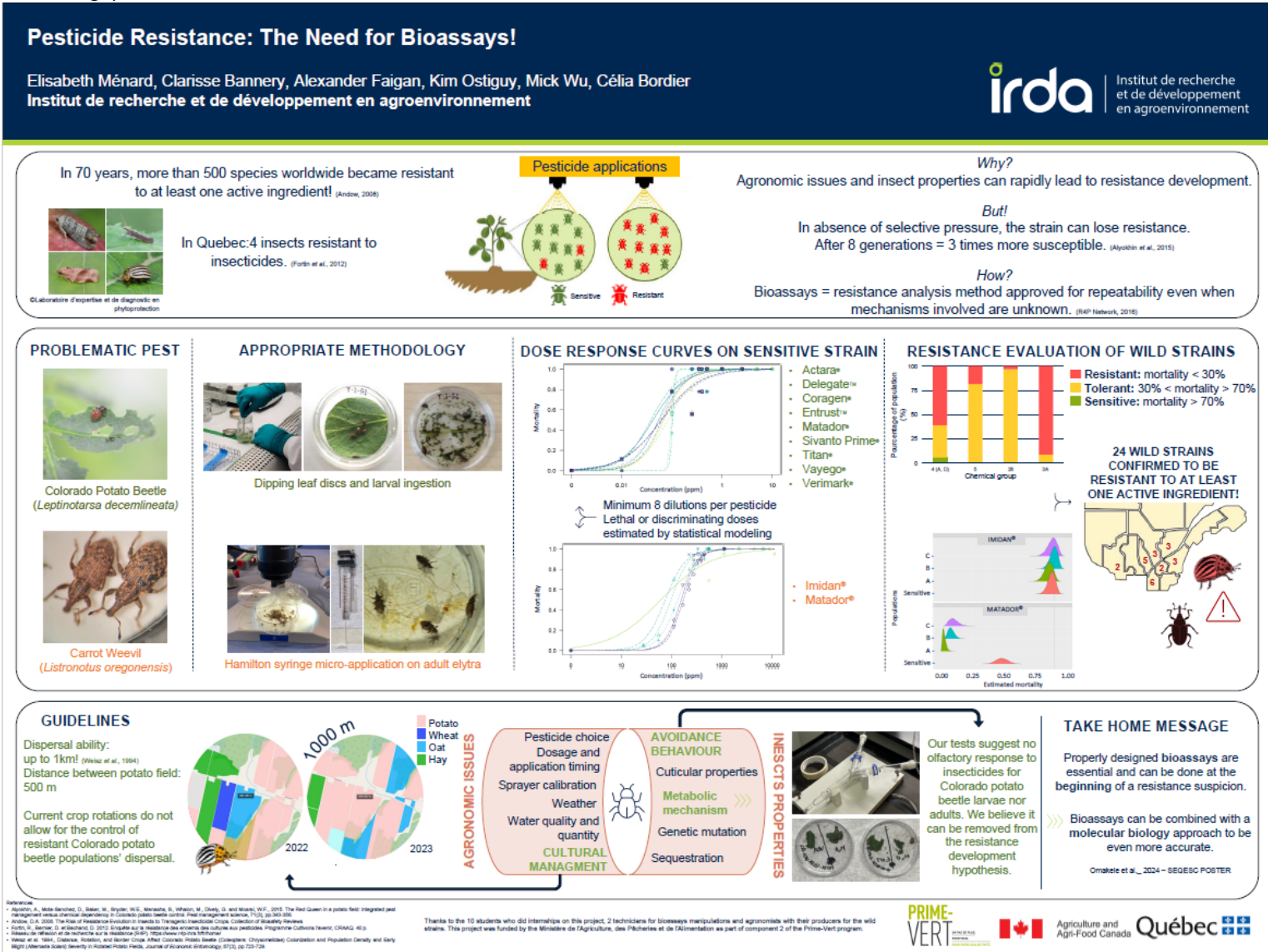
*Extrait du « Guide commun de dépistage des insectes de pomme de terre » du MAAARO, 2005.

10. Distance de la plus proche culture commerciale de pommes de terre/tomates/aubergines en 2022 (encerclez une réponse)

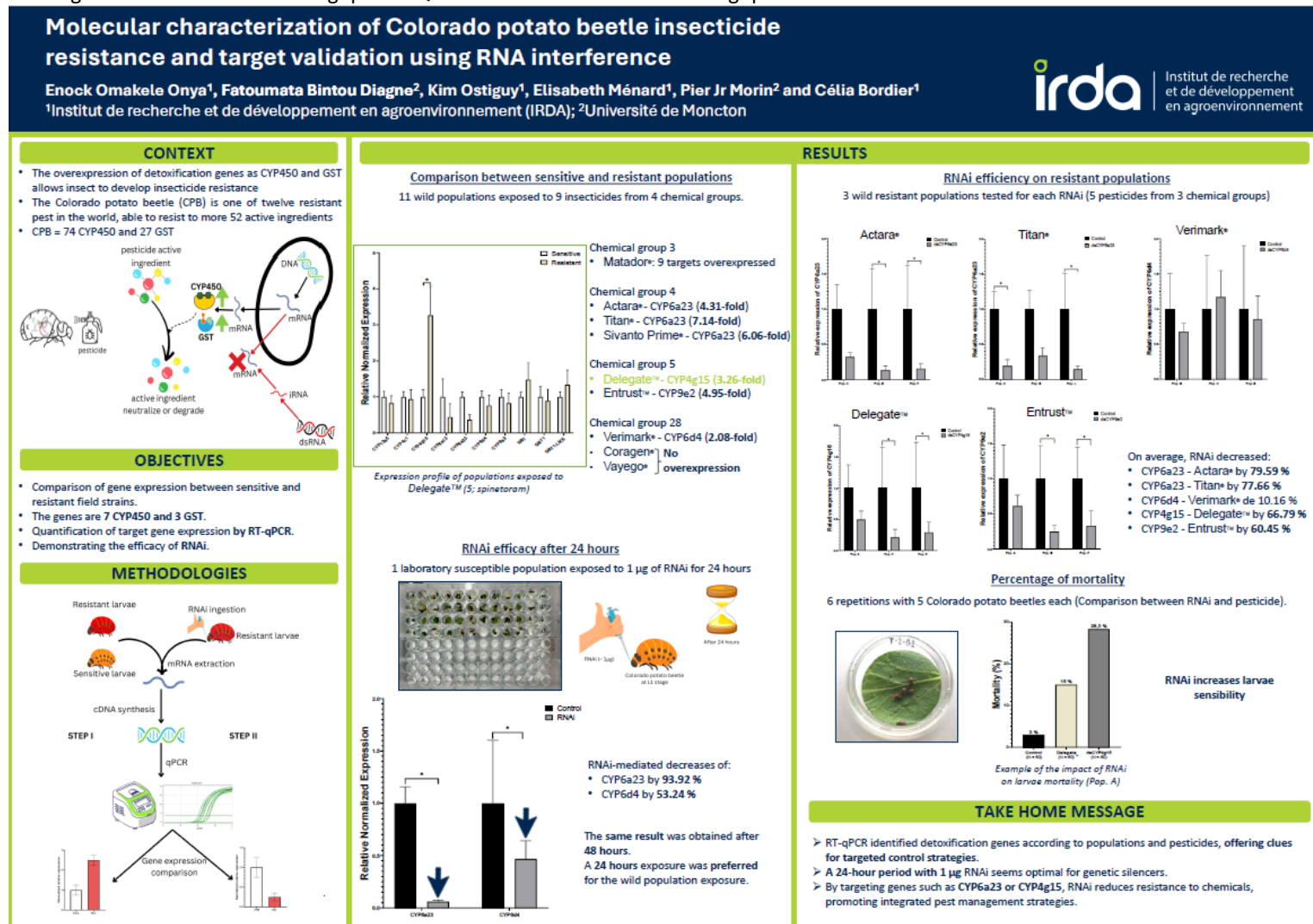
< 100 m	< 200 m	> 500 m
---------	---------	---------
11. Caractéristique du paysage avoisinant
Inscrire le pourcentage des différentes composantes suivantes dans un rayon de 500 m : Pomme de terre, Autres solanacées, Autres cultures maraîchères, Grandes cultures, Forêts et Habitations.
12. Pour les cinq (5) dernières années, indiquez la culture dans le champ échantillonné en 2023 ainsi qu'une estimation du nombre d'applications par insecticide. Cocher la case correspondant à l'efficacité qu'a eue chaque insecticide (faible (-), moyenne (+/-) ou forte (+)), pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre lors de la dernière année.

Année		2019	2020	2021	2022	2023	Efficacité en 2022		
Culture							-	+/-	+
Buténolides (4D)	Sivanto ^{MD}								
	Prime								
Diamides (28)	Coragen [®]								
	Vayego [®]								
	Verimark [®]								
Néonicotinoïdes (4A)	Actara [®]								
	Titan [®]								
Pyréthroïdes (3A)	Matador [®]								
Spinosynes (5)	Delagate TM								
	Enstrust TM								
Autres									


Annexe 3. Affiche scientifique, intitulée *Pesticide Resistance: The Need for Bioassays!*, présentée au congrès de la société entomologique du Québec et de la société entomologique du Canada en 2024.



Annexe 4. Affiche scientifique, intitulée *Molecular characterization of Colorado potato beetle insecticide resistance and target validation using RNA interference*, présentée au congrès de la société entomologique du Québec et de la société entomologique du Canada en 2024.



Annexe 5. Affiche scientifique, intitulée *Molecular changes associated with insecticide resistance in the Colorado potato beetle: the case of cyantraniliprole and thiamethoxam*, présentée au congrès virtuel de l'Entomological Society of America en 2024.




UNIVERSITÉ DE MONCTON
CAMPUS DE MONCTON

Molecular changes associated with insecticide resistance in the Colorado potato beetle: the case of cyantraniliprole and thiamethoxam

Saha, T, N, E¹, Omakele, E, O¹, Bordier, C² and Morin, P, Jr¹

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Moncton, Moncton, New Brunswick, Canada
²Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA), Saint-Bruno-de-Montarville, Quebec, Canada



Abstract

Cultivation of potatoes has come under considerable threat from insects such as the Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*. Multiple approaches have been implemented to control this pest, but it has developed resistance to most insecticides available on the market. The aim of this study was to deepen our understanding of the molecular mechanisms underlying this resistance towards two insecticides, cyantraniliprole and thiamethoxam, in *L. decemlineata* larvae. To achieve this objective, molecular targets linked to detoxification processes, such as seven cytochromes P450 (CYP) and three glutathione S-transferases (GST), were measured using qRT-PCR in *L. decemlineata* larvae. Multiple changes in transcript levels were noted following the different conditions assessed. Overexpression of CYP6a13 (5.8-fold) transcript levels was observed following thiamethoxam exposure in a larvae population that exhibited resistance to the compounds investigated. A 31.1-fold increase was in addition observed in transcript levels for the same target in thiamethoxam-resistant *L. decemlineata* larvae when compared to larvae susceptible to the same compound. It is also interesting that several transcripts coding for GSTs were elevated following treatments to both compounds in a larvae population displaying susceptibility to both pesticides: GST (15.8-fold for thiamethoxam and 10.7-fold for cyantraniliprole), GST1 (36.8-fold for thiamethoxam and 34.1-fold for cyantraniliprole) and GST1-like (8.3-fold for thiamethoxam and 9.7-fold for cyantraniliprole). These results set the stage for subsequent RNA interference approaches directed against the overexpressed targets to evaluate their impact against insecticide resistance in this potato pest.

Objective

This study was conducted to:

- Determine the expression profile of transcripts coding for certain cytochromes P450 with a potential involvement for resistance in *L. decemlineata* larvae treated with cyantraniliprole or thiamethoxam.
- Characterize the expression profile of transcripts coding for select glutathione S-transferases with a possible role for resistance in *L. decemlineata* larvae exposed with cyantraniliprole or thiamethoxam.
- Explore the signature of these transcripts in *L. decemlineata* larvae populations that exhibit differences in cyantraniliprole or thiamethoxam susceptibility.

Methods

RNA isolation :
2 larvae + 1ml Total
Homogenization/ Lysis
Phase Separation
200µl Chloroform
100µl Phenol
100µl NaAc
Extraction/ Precipitation
100µl Isopropanol
Resuspension 100µl 100% EtOH

cADN synthesis & quantification of transcript levels using qRT-PCR:

cDNA synthesis
qRT-PCR

Results

Fig.1: Transcript expression in a CPB larvae population exposed to thiamethoxam or cyantraniliprole deemed susceptible to these compounds

Overexpression of :
- CYP6d4 (23.1-fold), GST (15.8-fold), GST1 (36.8-fold) and GST1-like (8.3-fold) upon thiamethoxam treatments.
- GST (10.7-fold), GST1 (34.1-fold) and GST1-like (9.7-fold) in CPB sensitive to cyantraniliprole

Conclusions

In conclusion, the expression of transcripts coding for cytochrome P450 and glutathione S-transferases was conducted in *L. decemlineata* larvae displaying differences in susceptibility towards two compounds. Multiple changes were detected including an overexpression of CYP6d4, GST, GST1 and GST1-like in a thiamethoxam-treated population of larvae that was susceptible to the compounds investigated. Overexpression of CYP 6a13 was identified in larvae that displayed resistance to thiamethoxam. RNA interference targeting these genes can next be envisioned in *L. decemlineata* to silence these genes and explore the impact on resistance.

References

Chen YH, Cohen ZP, Bueno EM, Christensen BM, Schoville SD. Rapid evolution of insecticide resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Curr Opin Insect Sci*. 2023 Feb;55:101000. doi: 10.1016/j.cois.2022.101000. Epub 2022 Dec 13. PMID: 36521782.
Bastarache P, Bouafoura R, Omakele E, Moffat CE, Vickruck JL, Morin PJ. Spinosad-associated modulation of select cytochrome P450s and glutathione S-transferases in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2023 Mar;112(3):e21993. doi: 10.1002/arch.21993. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36546461.

Fig.2: Transcript expression in a CPB population exposed to thiamethoxam or cyantraniliprole deemed resistant to these compounds

Fig.3: Transcript expression in CPB larvae treated with thiamethoxam : comparison between sensitive versus resistant populations

Acknowledgements: Thanks to the IRDA fruit entomology team for collecting the samples.
Funding: This work is part of component 2 of the Prime-vert program, led by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation au Québec (MAPAQ).

Québec

PRIME-vert

30