

Evaluation de la résistance aux insecticides et de son coût chez une espèce exotique envahissante *versus* une espèce résidente au sein du complexe d'espèces *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) à l'île de La Réunion[‡]

Résumé

L'application d'insecticides a contribué à réduire les populations d'insectes ravageurs des cultures à travers le monde. Le revers de la médaille de ces traitements très efficaces est l'évolution très fréquente de résistances vis-à-vis de ces produits. L'évolution de la résistance aux insecticides repose sur la sélection, par le traitement insecticide, d'individus portant une ou des mutations qui confèrent une moins grande sensibilité aux substances actives. L'utilisation sur d'importantes surfaces et de manière répétée, d'une même substance active, va procurer un avantage sélectif important aux individus possédant les génotypes les plus résistants : ils vont ensuite transmettre leurs gènes préférentiellement à la génération suivante. Cet avantage est dépendant de la présence du traitement insecticide : en l'absence de traitement, une résistance peut devenir coûteuse et être contre-sélectionnée. Cette contre-sélection retarde la diffusion et la fixation des allèles de résistance, ce qui peut être mis à profit pour une gestion intégrée des ravageurs des cultures. Le coût de la résistance peut être dû à la perte de fonction de la protéine mutée qui a un rôle biologique important, ou à la réallocation d'énergie pour des mécanismes de résistance plutôt qu'à d'autres fonctions importantes qui peuvent avoir un impact négatif sur la *fitness* (=la capacité d'un individu à transmettre ces gènes à la génération suivante).

A La Réunion, le climat tropical favorise des densités importantes d'aleurodes toute l'année. Si des solutions alternatives se développent, les traitements insecticides sont encore majoritairement utilisés. Cette étude vise dans un premier temps à estimer les niveaux de résistance des populations de MEAM1 et IO dans différents sites et contextes agricoles. Cette estimation des niveaux de résistance se base sur la mesure des [CL₅₀](#), la concentration d'insecticide létale pour 50% des individus testés. Deux insecticides ont été testés, le Suprême®

[‡] Ce chapitre a fait l'objet d'une publication : **Taquet, A., H. Delatte, B. Barrès, C. Simiand, M. Grondin, and H. Jourdan-Pineau** (2020) Insecticide resistance and fitness cost in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) invasive and resident species in La Réunion Island. *Pest Management Science* 4, 1235-1244. La version présentée ici a été légèrement modifiée.

20 SG (substance active : acétamipride) et le Plenum[®] 50 WG (substance active : pymétozine), appartenant à deux familles différentes (donc ayant des cibles moléculaires distinctes) : la famille des néonicotinoïdes et la famille des pyridine-azométhrines, respectivement. Quinze populations ont été échantillonnées sur le terrain, en visant des populations "pures" IO ou MEAM1, puis élevées au laboratoire pour obtenir des effectifs suffisants. Pour deux populations en mélange, un génotypage *a posteriori* (marqueurs microsatellites) de tous les individus testés a permis d'analyser séparément les espèces.

Les tests biologiques révèlent des résistances modérées à fortes au Suprême pour l'espèce MEAM1. Pour le Plenum, la résistance est tellement forte dans la plupart des populations pour l'espèce MEAM1 qu'il a été impossible d'atteindre des taux de mortalité importants, même en limite de solubilité de l'insecticide. De son côté, l'espèce IO est sensible aux deux insecticides testés.

Ces hauts niveaux de résistances mesurés au laboratoire sur MEAM1 font écho aux pertes d'efficacité rapportées sur le terrain par les agriculteurs. Cependant, les deux insecticides testés, encore largement utilisés au début de notre étude, sont à présent interdits. On pourrait donc supposer que les niveaux de résistance de MEAM1 pourraient diminuer dans le temps, si toutefois il existe un coût à ces résistances.

Pour en savoir plus, nous avons testé la présence d'un coût de résistance vis-à-vis de l'acétamipride chez l'espèce MEAM1. Ainsi, nous avons mesuré des traits liés à la *fitness* (survie adulte, fécondité, taux d'éclosion, survie larvaire...) chez sept populations montrant des niveaux de résistance variés à l'acétamipride (en plus de la population de référence du laboratoire). Nos résultats montrent bien des différences inter-populations pour les traits d'histoire de vie mesurés. Par contre, ces différences ne sont absolument pas liées aux niveaux de résistance à l'acétamipride. Ainsi, il ne semble pas y avoir de coût lié à la résistance à l'acétamipride chez l'aleurode MEAM1. Ceci peut s'expliquer par plusieurs mécanismes : le remplacement au cours du temps de la mutation résistante initiale par de nouvelles mutations moins coûteuses, ou bien la préexistence de la mutation avant la pression d'insecticide.

Cette étude a apporté la première estimation de la résistance chez l'espèce IO. Cette espèce est toujours sensible, malgré sa présence dans ou à proximité des agrosystèmes. Au contraire, MEAM1 est très résistante, ce qui reflète l'échec de la stratégie actuelle de gestion de ce ravageur.

**Insecticide resistance and fitness cost in *Bemisia tabaci*
(Hemiptera: Aleyrodidae) invasive and resident species
in La Réunion Island**

Running title: Insecticide resistance and fitness cost in *B. tabaci* MEAM1 and IO species

**Alizée Taquet,^a Hélène Delatte,^{a*} Benoit Barrès,^b Christophe Simiand,^a Martial Grondin^a
and Hélène Jourdan-Pineau^a**

^a CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, Saint-Pierre, France

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

* **Correspondence to:** H Delatte, CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7
chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France.

E-mail: helene.delatte@cirad.fr

Abstract

BACKGROUND: Global and intensive use of insecticides has led to the emergence and rapid evolution of resistance in the major pest *Bemisia tabaci* (Gennadius). In La Réunion, an island of the South West Indian Ocean, three whitefly species coexist, two of which are predominant, the indigenous Indian Ocean (IO) and the invasive Middle East Asia Minor 1 (MEAM1) species. To assess the resistance level of both of these species to acetamiprid and pymetrozine, whitefly populations were sampled at 15 collection sites located all over the island in agroecosystems and natural areas, and tested using leaf-dip bioassays. We also investigated the potential cost of resistance to acetamiprid by measuring six fitness-related traits for MEAM1 populations that displayed different resistance levels.

RESULTS: IO was mainly found in natural areas and was susceptible to both acetamiprid and pymetrozine. MEAM1 populations displayed evidence of high resistance to pymetrozine, whereas resistance to acetamiprid was more variable. No fitness-related costs were associated with this resistance in MEAM1 populations.

CONCLUSION: This is the first assessment of the susceptibility to insecticides for *B. tabaci* IO species. For the time being, no resistance to the tested insecticides has evolved in this species despite (i) its presence in agroecosystems and their surroundings, and (ii) its close proximity to, and possible hybridization with, the MEAM1 species. In contrast, with continuous selection pressure of insecticide treatments and in the absence of fitness cost to resistance, the invasive exotic species MEAM1 will continue to threaten agriculture in La Réunion.

Keywords: arthropod; chemical treatments; toxicity; field-evolved resistance; pest management.

V.1. Introduction

Nowadays, the estimated worldwide consumption of pesticides has reached 3.5 million tons per year ([Eyhorn et al. 2015](#)). Repeated insecticide applications resulted in a high selection pressure that has led to the rapid evolution and emergence of resistances in target pest populations ([Denholm 1988](#), [Dittrich et al. 1990](#), [Palumbo et al. 2001](#)). Indeed, the dynamics of resistance among pest populations is driven by evolutionary forces: selection by insecticide treatment, emergence of resistance-conferring mutation, migration of resistant individuals into more susceptible populations and genetic drift ([Labbé et al. 2005](#)). While resistance to insecticide confers an obvious advantage in treated environments, it may be counterselected in the absence of treatment ([Kliot and Ghanim 2012](#)). The potential lower fitness of individuals carrying resistant alleles in the absence of insecticide, is considered as a resistance cost ([Lenormand et al. 2018](#)). Such costs are due to the (near) loss of function in genes that are essential for viability or to the reallocation of resources and energy to resistance mechanisms instead of other fitness-enhancing traits ([Kliot and Ghanim 2012](#)). If fitness costs associated with resistance are high, resistant individuals can be counterselected in the absence of treatments, resulting in delayed diffusion and fixation of resistant genotypes. Therefore, identifying fitness costs is important for designing efficient integrated pest management programmes based, for instance, on alternation of classes of compound with differing modes of action ([Bass and Ffrench-Constant 2017](#)). Resistance costs can be assessed by studying the stability of resistance over time in the absence of treatment (the frequency of resistant genotypes should decrease if they are counterselected) or by comparing fitness-related traits between resistant and susceptible strains (ideally with the same genetic background).

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a pest distributed worldwide, with some members responsible for heavy crop losses ([Oliveira et al. 2001](#), [Perring 2001](#)) and with a known high evolutionary potential. Based on phylogenetic studies, it is considered to be a cryptic species complex with more than 40 morphologically indistinguishable species ([Boykin et al. 2007](#), [De Barro et al. 2011](#), [Liu et al. 2012](#), [Mugerwa et al. 2018](#)). *Bemisia tabaci* can cause three types of damage on plants: (i) direct damage by sucking phloem sap of hundreds of plant species ([Byrne and Bellows Jr 1991](#)), (ii) indirect damage by excreting honeydew that favours the growth of sooty mould fungus ([Davidson et al. 1994](#)), or (iii) by transmitting at least 320 virus species belonging to five genera: Begomovirus, Ipomovirus, Crinivirus, Torradovirus and Carlavirus ([Brown et al. 2015](#), [Zerbini et al. 2017](#)). Despite novel control agents being available, insecticides remain the most widely used tool against the whitefly *B. tabaci*

([Caballero et al. 2015](#), [Roditakis et al. 2017](#)). To date, 637 resistance cases to 61 different active substances have been recorded in the *Arthropod Pesticide Resistance Database* for the *B. tabaci* complex all over the world ([Whalon et al. 2019](#)). Among all the species belonging to the *B. tabaci* species complex, two have been identified as invasive worldwide: the Middle East Asia Minor 1 species (MEAM1) and the Mediterranean species (MED), which were formerly referred to as the B ‘biotype’ and the Q ‘biotype’, respectively ([Boykin et al. 2007](#), [De Barro et al. 2011](#)). Both of these are particularly well known for their capacity to evolve resistance to multiple important classes of insecticides ([Basit 2019](#)).

Insular environments are among the most vulnerable ecosystems in the world, partly due to their small size and isolation. Ecological impacts of invasion by non-native species are often more pronounced in islands compared to mainlands ([Mueller-Dombois and Loope 1990](#), [Gillespie and Roderick 2002](#)). La Réunion is a French tropical island located in the southwest Indian Ocean (SWIO), 700 km east of Madagascar. On this island, *B. tabaci* was first described in 1938 ([Bourriquet 1938](#)). Molecular analysis revealed the presence of an indigenous species, referred to as the Indian Ocean species (IO), formerly referred to as the Ms ‘biotype’ ([Delatte et al. 2005](#)). In 1997, a severe outbreak of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in the island was associated with the introduction of its vector, the invasive MEAM1 species ([Delatte et al. 2005](#)). Since then, vegetable production in La Réunion has mainly relied on chemical control options for whitefly populations ([Agreste DAAF de La Réunion 2016](#)). Among all insecticide families, neonicotinoids and pyridine azomethine derivatives have been widely used for their effectiveness against sucking pests ([Polston and Sherwood 2003](#), [Bass et al. 2015](#)). In 2010, a second invasive whitefly species was detected in La Réunion: the invasive MED species ([Thierry et al. 2015](#)). Among these three whitefly species that coexist in La Réunion, IO and MEAM1 are widespread, and found preferentially on weeds and crops, respectively ([Delatte et al. 2006](#), [Delatte et al. 2009](#)).

The IO species was described in all the islands of the south-west part of the Indian Ocean and mainland Central and East Africa ([Delatte et al. 2005](#), [Sseruwagi et al. 2005](#), [Delatte et al. 2011](#), [Tocko-Marabena et al. 2017](#)). Contrary to the MEAM1 and MED species, the IO species has never been considered invasive to date. However, they have been shown to group together in the same phylogenetic clade of ‘invasive’ species ([Delatte et al. 2005](#), [Boykin et al. 2007](#)). It is also known that MEAM1 and IO can hybridize when they are in syntopy ([Delatte et al. 2006](#), [Thierry et al. 2011](#)). Thus, introgression of MEAM1 resistant allele(s) within the IO genotype and/or selection by insecticide could lead to the evolution of insecticide resistance in the indigenous species, as shown between two mosquito sister species for

dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and pyrethroid insecticides in Mali (Norris et al. 2015), or for the resistance to anticoagulant rodenticide acquired by house mice from Algerian mice across Western Europe (Song et al. 2011). Additionally, Delatte et al. (2005) have shown that IO was able to induce silverleaf symptoms on *Cucurbita sp.*, and was as efficient as MEAM1 at acquiring and transmitting TYLCV. For all these reasons, IO could potentially represent a risk to agriculture in the SWIO that should not be neglected. However, the IO species has never been tested for insecticide resistance so far, and similarly nothing is known about the insecticide resistance status of the invasive MEAM1 populations present in La Réunion.

It is of crucial importance to highlight resistance cases and to identify potential associated costs, in order to design effective and long-term control measures that will limit resistance propagation. The aims of this study were therefore (i) to investigate the resistance level of populations of the two main *B. tabaci* species (one native, one invasive) against acetamiprid and pymetrozine, two important active substances used in La Réunion, and (ii) to assess the existence of a fitness cost associated with resistance.

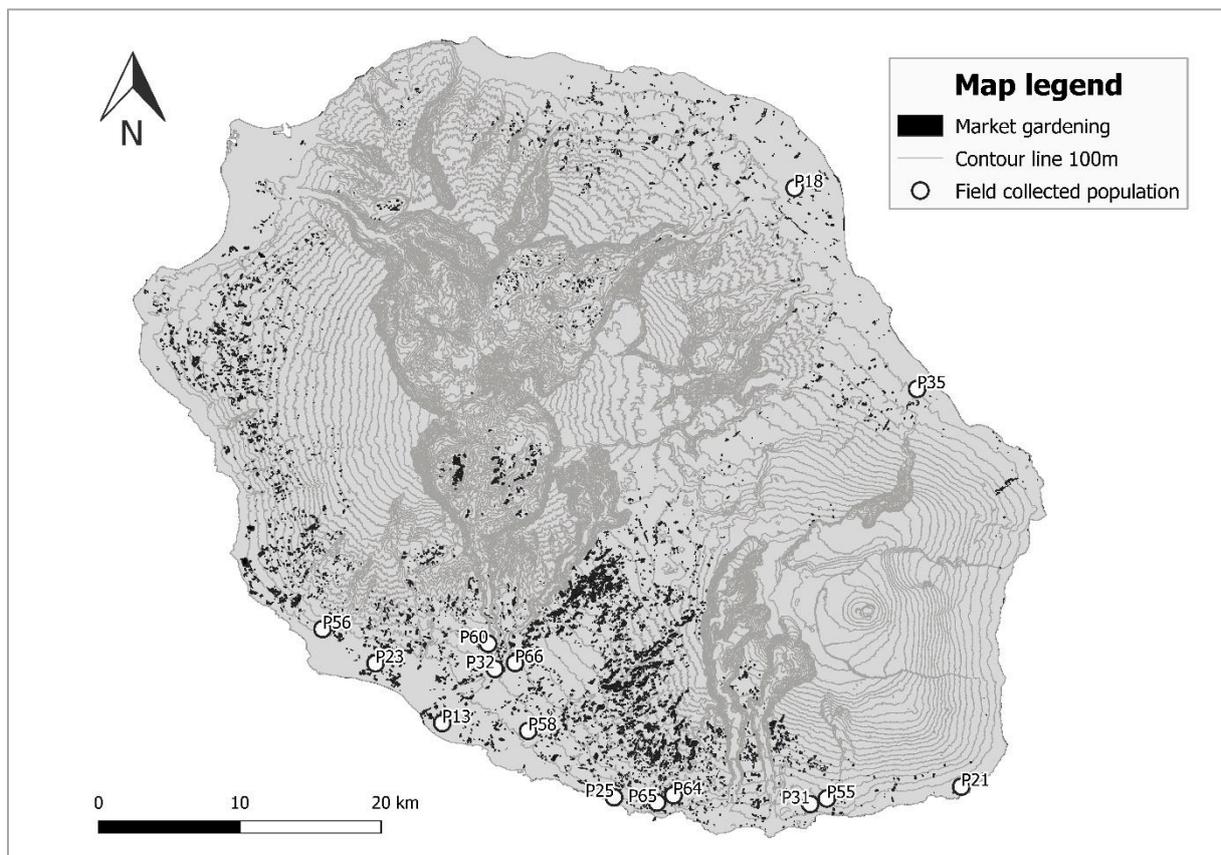


Figure V-1: Global repartition of sampled *B. tabaci* field populations in and around market gardening areas of La Réunion. Each field population is named as referred to in [Table V-S1](#).

V.2. Materials and methods

V.2.1. *Bemisia tabaci* populations

A total of 15 field populations of *B. tabaci* were investigated in this study (Supporting information, [Table V-S1](#) and [Figure V-1](#)). They were collected on cultivated plants and weeds all over the island from greenhouses, open fields, field surroundings and non-cultivated areas, from October to December 2017. Field-collected adult whiteflies were transferred to uninfested cotton seedlings (*Gossypium hirsutum* L. cv. Dora) confined inside insect-proof cages (dimensions: 32.5 × 32.5 × 32.5 cm; mesh size: 650 µm aperture). Each population was established from at least 300 individuals. They were maintained in a climate chamber at 28°C (photoperiod 12:12 h light:dark and relative humidity 60 ± 10%) until they were tested.

Susceptible populations of MEAM1 and IO, collected in La Réunion, were used as reference populations when evaluating the insecticide susceptibility of sampled populations. The reference MEAM1 laboratory population was originally sampled in 2001 from cabbage *Brassica oleracea* L. (Brassicaceae), whereas the IO was sampled on July 2017 from Mexican fireplant *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae) and lantana *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Both whitefly species were reared on cotton plants in separate climate chambers, using identical conditions described for the field-collected populations, and were maintained without exposure to insecticides.

In addition to living individuals, 30 individuals were sampled at each collection site, preserved in 95% ethanol and held at -20°C for molecular species determination in the laboratory. After DNA extraction, each individual was genotyped using the microsatellite marker Ms145 as a diagnostic locus ([Dalmon et al. 2008](#), [Delatte et al. 2011](#)). Allele sizes under 200 base pairs (bp) are specific to the IO species, whereas alleles over 200 bp are only found in the MEAM1 species. The partial 3' mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) of 53 individuals, randomly chosen from each of the two species, was sequenced in order to confirm the species identification by pairwise nucleotide comparisons with reference sequences from GenBank. For dose-response leaf-dip bioassays, only unmixed species populations were used. In the case of mixed species populations detected on field-collected individuals, *a posteriori* molecular species determination was performed on all individuals after each bioassay (IO and MEAM1, i.e. P60 and P64).

V.2.2. Dose-response leaf-dip bioassays

We investigated two of the main classes of insecticides used in La Réunion for the dose–response bioassays: formulated acetamiprid (Supreme® 20 SG, 200 g kg⁻¹, Certis) and formulated pymetrozine (Plenum 50 WG, 500 g kg⁻¹, Syngenta Crop Protection), which belong to neonicotinoids and pyridine azomethine derivatives, respectively. Acetamiprid acts as an agonist of nicotinic acetylcholine receptors, inducing hyperactivity and muscle spasms that can lead to death ([Jeschke and Nauen 2008](#)). Pymetrozine acts by suppressing stylet penetration so that whiteflies can no longer feed on the plant and die of starvation ([Harrewijn and Kayser 1997](#)).

Bioassays were performed for both insecticides on each field population (with the exception of populations P35 and P60-IO that were only tested against acetamiprid because of an insufficient number of adults available in the population) using a leaf-dip method adapted from the Insecticide Resistance Action Committee protocol 015 (IRAC; <http://www.irac-online.org/methods/>). Untreated cotton plants were pot cultivated in a growth chamber (temperature 28°C, photoperiod 12:12 h light:dark and relative humidity 70 ± 10%), away from any pests. About 6 weeks after germination, their leaves were removed and 86 mm diameter discs were cut out from them. From 4.096 and 10 g L⁻¹ stock solutions of acetamiprid and pymetrozine, respectively, two-fold or four-fold serial dilutions of insecticide were made with distilled water. Each cotton leaf disc was dipped for 5 s into one of the dilutions of the insecticide. Natural mortality was assessed with control leaf discs treated with distilled water. Leaves were laid on an agar bed (1%) in Petri dishes (88 mm in diameter), with their adaxial surface downwards.

For each field population, adult whiteflies were collected from rearing cages and anaesthetized by cold treatment before being sexed under a Leica MZ6 stereomicroscope ([Calvert et al. 2001](#)). Adult female whiteflies were placed on each treated leaf disc. Petri dishes were sealed with a transparent ventilated lid and were randomly distributed into climate chambers at 25°C (photoperiod 12:12 h light:dark). Mortality was recorded after 48 or 96 h of exposure to acetamiprid or pymetrozine, respectively. An insect was considered dead if it showed no sign of movement during 10 s. Each replicate consisted of 15 adult female whiteflies for each different concentration tested. A replicate was discarded if the mortality in the control leaf disc was greater than 15%. Each bioassay was performed with at least five concentrations (plus the control), with three to four replicates each. We did not meet some of these protocol requirements for MEAM1 field-collected population P32 and mixed species populations P60

and P64. Although population size was smaller or natural mortalities were higher than expected, we performed analysis of the mortality data.

V.2.3. Dose-response curves analysis

Dose-response curve analysis was carried out in R ([R Core Team 2017](#)) using the ‘drc’ package v.3.0.1 ([Ritz et al. 2015](#)). The insecticide concentration causing 50% whitefly mortality (lethal concentration, LC_{50}) was estimated using the three-parameter log-normal dose-response model, with unbounded level of natural mortality, similar to the log-logistic model of Finney ([Finney 1979](#)). This model calculates 95% confidence limits (CL) of LC_{50} and the slope of the curve around LC_{50} , and provides the background mortality before increasing insecticide dose has any effect.

The effect of population or environment on LC_{50} was assessed with a deviance analysis ([Crawley 2005](#)), comparing the deviance of a model specifying different values for the three parameters (i.e. LC_{50} , slope and lower limit) for each population (or each environment, see Supporting information, Table V-S1) to a model with only one value of LC_{50} for all populations (or environments). Pairwise comparisons of LC_{50} were achieved using the ‘drc’ function `compParm`. Deviance analyses and pairwise comparisons of LC_{50} for MEAM1 field-collected populations tested with pymetrozine could not be performed due to very high resistance levels among populations, leading to convergence failure.

The resistance ratio RR_{50} was computed by dividing the estimated LC_{50} value of a given field-collected population for a particular chemical by the corresponding LC_{50} value for the susceptible laboratory population. As described by [Ahmad et al. \(2007\)](#), resistance was classified as none ($RR = 1$), very low ($RR = 2 - 10$), low ($RR = 11 - 20$), moderate ($RR = 21 - 50$), high ($RR = 51 - 100$) and very high ($RR > 100$).

Finally, we tested the relationship between the background mortality and the LC_{50} to acetamiprid using a linear model and an F-test. The expectation was that resistant populations (with higher LC_{50}) should have lower survival than susceptible populations at sublethal doses if there is a high fitness cost (i.e. causing mortality in the absence of treatment) associated with resistance to acetamiprid.

V.2.4. Life history traits

We further investigated the potential cost of resistance to acetamiprid by recording six fitness-related traits (fecundity, female adult life expectancy, hatching rate, egg-to-adult survival, lifetime reproductive success and female size) for several populations that displayed different levels of resistance. Adult size can be considered as a fitness proxy in females since it is directly correlated with fecundity ([Honěk 1993](#)). The cost of pymetrozine resistance was not investigated since it was not possible to determine precisely LC_{50} values for some MEAM1 populations. Based on the previously described bioassays, we selected seven field populations of the MEAM1 species, in addition to the reference laboratory population. During the following experiments, whitefly individuals were randomly distributed over cotton plants and in climate chambers at 28°C (photoperiod 12:12 h light:dark).

Female adult life expectancy and fecundity were measured for ten females per population. To collect newly emerged females, cotton leaves with whitefly pupae were cut and placed in Petri dishes on an agar bed (1%). The next day, newly emerged adults were collected, anaesthetized by cold treatment and sexed. One female and one male (about 1 day old) were placed together in a clip-cage (modified from [Millot \(2017\)](#)) attached on a cotton leaf and cotton plants were then transferred into climate chambers. Three days later, we checked if both male and female were alive and if so the male was removed and the clip-cage (with the female) was moved to a new cotton leaf. The clip-cages were moved every 3 days to another cotton leaf until the death of the female. Eggs laid over each 3-day period were counted. Fecundity was calculated as the sum of eggs laid until death by each female. Female adult life expectancy was the number of days a female lived after emergence, and this observation was made at 3-day time intervals.

We monitored egg hatching, egg-to-adult survival and adult emergence on eggs laid on cotton leaves during the first 3 days of this experiment. Leaves were cut 15 days after the start of the experiment and placed on agarose gel in a Petri dish. Every 3 days leaves were observed using a Leica MZ6 stereomicroscope, and all individuals (larvae and adults) were counted and their developmental stages were determined. Emerged adults were repeatedly removed to avoid multiple counting. Therefore, for each female, we measured the number of eggs laid during its first 3 days of life, the number of larvae that hatched and the number of emerged adults. These data were used to estimate hatching rate (number of larvae divided by the number of eggs) and egg-to-adult survival (number of adults divided by the number of eggs). Lifetime reproductive success was estimated by multiplying egg-to-adult survival by the total number of eggs laid in

a lifetime (recorded during the duration spent in clip-cages). Finally, we measured the body size, from the tip of the head to the end of the abdomen, of 24-h-old females (20 per population) under a Leica MZ6 stereomicroscope.

All data and scripts used to perform the analyses presented in this paper are available in the zenodo repository <http://doi.org/10.5281/zenodo.3266422> and at <https://dataverse.cirad.fr/>.

V.2.5. Life history traits statistical analysis

The relation between LC_{50} and fecundity, female adult life expectancy, hatching rate and egg-to-adult survival was modeled in a generalized linear framework using R ([R Core Team 2017](#)). Fecundity and lifetime reproductive success were analysed using quasi-Poisson distribution (to account for overdispersion) whereas female adult life expectancy was analysed using a Poisson distribution. Hatching rate and egg-to-adult survival were analysed as proportion data, using a quasibinomial distribution ([Zuur et al. 2009](#)). Finally, body size was analysed in a linear regression framework. In addition, we also tested if populations differed for the measured traits using the same linear models. We tested the significance of LC_{50} (or population) using F-tests, except for Poisson-distributed variables, which required Chi-square tests.

Table V-1: Non-linear regression analysis of mortality data for populations of *B. tabaci* from La Réunion tested with two insecticides in leaf-dip bioassays.

Species	Population	Acetamiprid				Pymetrozine			
		<i>N</i>	Slope (\pm SE)	LC ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% CL)	RR ₅₀	<i>N</i>	Slope (\pm SE)	LC ₅₀ (mg.L ⁻¹) (95% CL)	RR ₅₀
IO	laboratory	891	0.70 (\pm0.08)	2.00 (0.95-3.05) <i>ab</i>	1.0	420	0.91 (\pm0.16)	2.62 (1.56-3.68) <i>b</i>	1.0
IO	P35	360	1.08 (\pm 0.19)	1.98 (0.85-3.11) <i>a</i>	1.0	NA	NA	NA	NA
IO	P60 ^b	100	0.45 (\pm 0.21)	1.66 (-1.92-5.24) <i>b</i>	0.8	NA	NA	NA	NA
IO	P64 ^b	209	0.97 (\pm 0.14)	2.78 (1.99-3.58) <i>b</i>	1.4	214	0.40 (\pm 0.09)	0.38 (-0.16-0.93) <i>a</i>	0.1
MEAM1	laboratory	422	0.49 (\pm0.09)	3.41 (-1.19-8.01) <i>a</i>	1.0	1199	0.37 (\pm0.03)	0.73 (2.00E-3-1.46)	1.0
MEAM1	P13	419	0.74 (\pm 0.10)	1.86E2 (1.20E2-2.53E2) <i>bc</i>	54.7	417	-	>1.00E4 ^a	-
MEAM1	P18	421	0.59 (\pm 0.10)	3.68E2 (2.07E2-5.29E2) <i>de</i>	107.9	420	-	~1.00E4	-
MEAM1	P21	422	0.58 (\pm 0.06)	6.98E1 (4.33E1-9.62E1) <i>f</i>	20.5	419	-	>1.00E4	-
MEAM1	P23	315	0.48 (\pm 0.06)	1.29E2 (6.66E1-1.92E2) <i>bcg</i>	37.9	421	1.38E-1 (-)	4.51E5 (-1.48E5-1.05E6)	6.2E5
MEAM1	P25	419	0.73 (\pm 0.10)	5.05E2 (3.32E2-6.79E2) <i>d</i>	148.2	420	-	>1.00E4	-
MEAM1	P31	419	0.75 (\pm 0.10)	6.37E1 (3.95E1-8.78E1) <i>fh</i>	18.7	420	2.25E-4 (-)	1.79 (-2.14E1-2.50E1)	2.5
MEAM1	P32	227	0.71 (\pm 0.09)	5.66E1 (3.67E1-7.64E1) <i>fh</i>	16.6	391	-	>1.00E4	-
MEAM1	P55	421	0.84 (\pm 0.13)	1.11E1 (4.73-1.75E1) <i>i</i>	3.3	417	2.21E-1 (\pm 3.40E-2)	9.92E3 (-8.92E2-2.07E4)	1.3E4
MEAM1	P56	421	0.70 (\pm 0.08)	2.46E2 (1.67E2-3.25E2) <i>be</i>	72.1	413	-	>1.00E4	-
MEAM1	P58	422	0.97 (\pm 0.16)	1.83E2 (1.25E2-2.43E2) <i>bcg</i>	53.9	420	8.22E-2 (\pm 7.29E-2)	3.43E4 (-8.34E4-1.52E5)	4.7E4
MEAM1	P60 ^b	183	0.67 (\pm 0.13)	2.92E1 (1.01E1-4.82E1) <i>h</i>	8.5	129	1.25E-1 (-)	4.79E4 (-5.60E4-1.52E5)	6.5E4
MEAM1	P64 ^b	80	0.31 (\pm 0.12)	5.37E1 (-3.42E1-1.41E2) <i>fgh</i>	15.7	145	2.73E-4 (-)	2.30 (-3.38E1-3.84E1)	3.2
MEAM1	P65	417	0.63 (\pm 0.07)	1.46E2 (9.21E1-2.00E2) <i>c</i>	42.8	421	1.01E-1 (-)	6.74E4 (-)	1.0E5
MEAM1	P66	419	0.50 (\pm 0.07)	8.82E1 (3.62E1-1.40E2) <i>c</i>	25.9	420	-	~1.00E4	-

N, number of whiteflies tested; SE, standard error; LC₅₀, concentration of insecticide killing 50% of individuals; CL, 95% confidence limits; RR₅₀, resistance ratio = LC₅₀ of each population/LC₅₀ of laboratory susceptible population (in bold). Deviance analyses could not be performed for all MEAM1 populations tested with pymetrozine, due to high resistance levels among populations.

For each insecticide and each species, LC₅₀ followed by the same letter are not significantly different; missing information due to convergence failure is represented by a dash; NA, not available.

^a Estimation of LC₅₀ equal or up to 1.00E4 mg.L⁻¹ (which is the maximal concentration tested).

^b Analysed according to the *a posteriori* species identification.

V.3. Results

V.3.1. Species identification

Analysis of the mitochondrial COI DNA sequences obtained from 53 randomly selected field-collected whiteflies showed that 46 were classified as MEAM1 species, whilst the remaining seven whiteflies were classified as IO species. All of them shared 100% nucleotide identity to the MEAM1 and IO sequences from La Réunion, already published by [Delatte et al. 2005](#) and [Delatte et al. 2006](#) (accession number: AJ550175 and AJ877264, respectively).

Genotyping of all other individuals using the Ms145 marker revealed that it was challenging to find pure IO species populations in La Réunion: we found, reared and tested for insecticide resistance only one pure IO and two mixed IO and MEAM1 species populations. All these populations were collected on weeds from non-cultivated areas (Supporting information, [Table V-S1](#)).

V.3.2. Characterization of resistance status of MEAM1 and IO field collected populations

Ten out of the 14 MEAM1 tested populations were found to be resistant to both acetamiprid and pymetrozine ($RR_{50} > 10$). Four additional populations displayed evidence of resistance to only one of the insecticides: two to acetamiprid and two to pymetrozine. By contrast, all IO field-collected populations were found to be susceptible to acetamiprid (three out of three) and pymetrozine (one out of one; [Table V-1](#)). The MEAM1 reference laboratory population was confirmed to be the most susceptible in comparison to the field-collected populations ($LC_{50} = 3.41$ and 0.73 mg L^{-1} , respectively).

The field-collected population P60-IO was the most susceptible population of IO species to acetamiprid, even more susceptible than our reference laboratory population ($RR_{50} = 0.8$). Population P35 was as susceptible as our IO reference population, presenting no significant difference between them ($LC_{50} = 1.98$ and 2.00 mg L^{-1} , respectively). Finally, population P64-IO was the least susceptible population of IO species to acetamiprid ($RR_{50} = 1.4$), but also the most susceptible to pymetrozine, even more susceptible than our IO reference population ($RR_{50} = 0.1$).

Resistance status to acetamiprid differed among MEAM1 field-collected populations, but remained in favour of a moderate to very high resistance. Populations P55, P60-MEAM1, P21, P31, P32 and P64-MEAM1 were the most susceptible ($RR_{50} = 3.3$ to 20.5), whereas P18

and P25, both collected from treated green-houses, showed very high resistance levels ($RR_{50} = 107.9$ and 148.2). Between these two extremes, populations P23, P65, P66, P13, P56 and P58 demonstrated a moderate to high resistance level ($RR_{50} = 25.9$ to 72.1).

The pattern of resistance to pymetrozine differed considerably among MEAM1 field-collected populations. First, P31 and P64-MEAM1, collected from non-treated host plants (according to our survey of farmers' usage of insecticides, see Supporting information, [Table V-S1](#)), were the only two MEAM1 susceptible populations ($RR_{50} = 2.5$ and 3.2) of our panel. On the contrary, P23, P55, P58, P60-MEAM1 and P65 displayed evidence of remarkably high resistance to this insecticide: RR_{50} reached up to over 13 000. The seven other MEAM1 field-collected populations (P13, P18, P21, P25, P32, P56 and P66) were extremely resistant to pymetrozine, since it was not possible to determine their LC_{50} values from the sequence of concentrations we tested: models failed to converge. At the highest concentration of 10 g L^{-1} , populations P66 and P18 exhibited 50% and 62% mortality, respectively, and populations P13, P21, P25, P32 and P56 only 11 – 20% mortality. Using higher concentrations of insecticide was not conceivable due to solubility limits and phytotoxicity.

With regard to resistance to acetamiprid, the collection environment (greenhouse, open field, field surroundings and non-cultivated site) had a significant effect on LC_{50} ($\text{Chisq}_4 = 138$, $P < 0.0001$) for MEAM1 populations. In this respect, MEAM1 populations sampled in greenhouses were not significantly different from MEAM1 populations taken from open fields ($t_8 = 0.885$, $P > 0.05$) and field surroundings ($t_6 = 0.402$, $P > 0.05$; [Table V-2](#)). Similarly, pairwise comparison of LC_{50} showed that resistance to acetamiprid was comparable between MEAM1 populations collected in open fields and the ones collected in field surroundings ($t_4 = 0.985$, $P > 0.05$). MEAM1 populations sampled in non-cultivated areas differed significantly from MEAM1 populations sampled in cultivated areas ($P < 0.001$) and field surroundings ($t_2 = 3.15$, $P = 1.61 \times 10^{-3}$).

Table V-2: Pairwise comparisons of LC₅₀ to acetamiprid between groups of MEAM1 populations collected in the same environment (greenhouse, open field, field surroundings and non-cultivated site).

Collection environment	Greenhouse		Laboratory		Non-cultivated		Open field	
	<i>t</i> value	<i>P</i> value						
Field surroundings	0.402	0.688	4.43	9.52E-6	3.15	1.61E-3	0.985	0.324
Greenhouse			5.09	3.57E-7	3.44	5.84E-4	0.885	0.376
Laboratory					-19.9	< 2.20E-16	-124	< 2.200E-16
Non-cultivated							-12.7	< 2.200E-16

The greater the magnitude of the *t* value, the greater the evidence against the null hypothesis. The closer the *t* value is to 0, the more likely there isn't a significant difference between populations means.

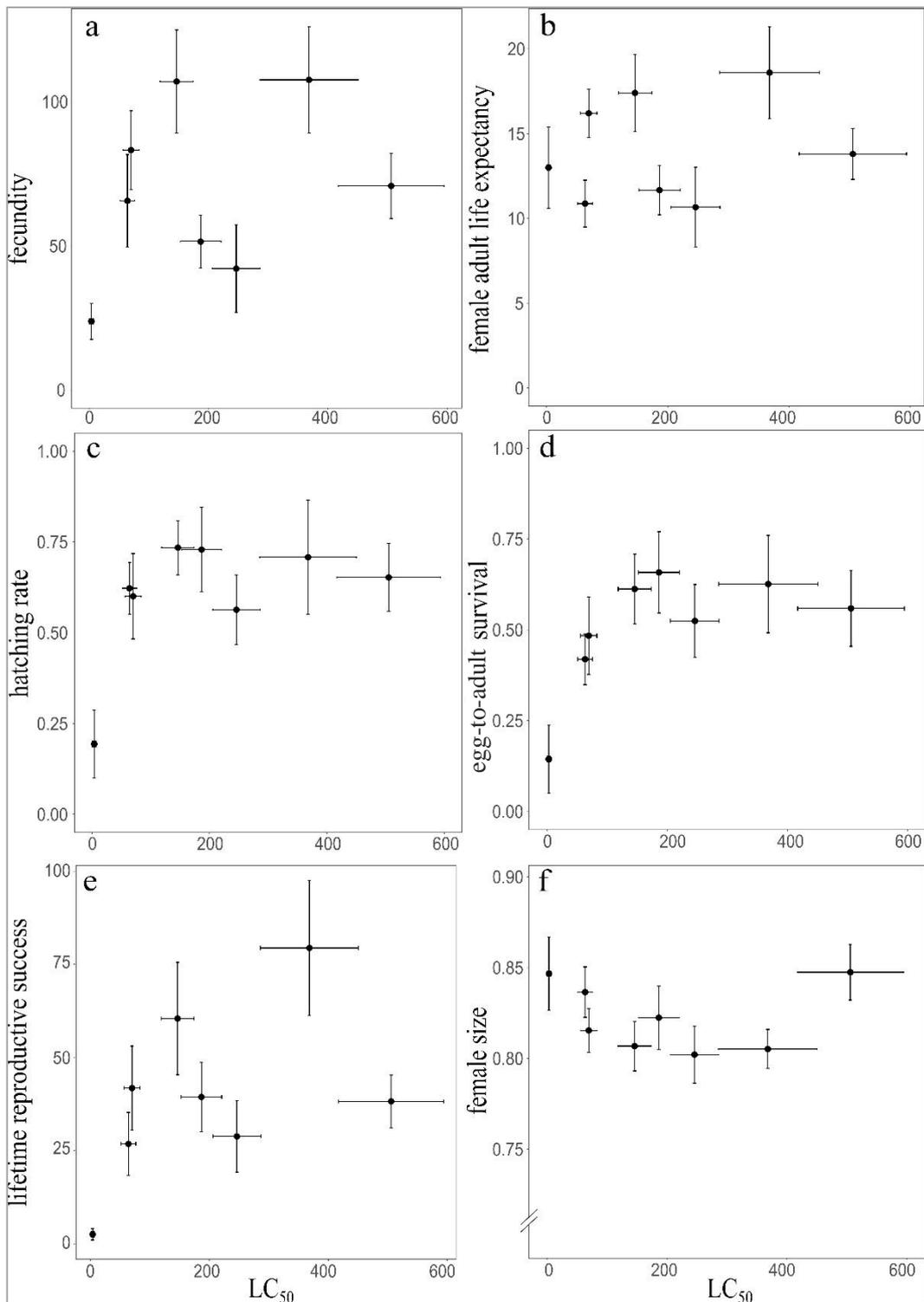


Figure V-2: Relationship between resistance levels to acetamiprid (LC_{50}) and measurements of six fitness-related traits of seven MEAM1 field-collected populations, plus the reference laboratory population: (a) fecundity, (b) female adult life expectancy, (c) hatching rate, (d) egg-to-adult survival, (e) lifetime reproductive success and (f) body size.

V.3.3. Assessment of the potential cost of resistance to acetamiprid for MEAM1 field-collected populations

The eight populations of MEAM1 species studied differed significantly for three out of six fitness-related traits measured: fecundity ($F_7 = 902$, $P = 1.60 \times 10^{-5}$), female life expectancy ($Chisq_7 = 14.2$, $P = 0.047$) and lifetime reproductive success ($F_7 = 4.98$, $P = 1.83 \times 10^{-4}$; Supporting information, [Table V-S2](#)). No significant differences between populations in terms of hatching rate, egg-to-adult survival and female adult size were found ($F_7 = 73.8$, 72.6 and 1.51 , respectively, $P > 0.05$). Importantly, no correlation between resistance levels to acetamiprid (estimated with LC_{50}) and fitness-related traits was found ([Figure V-2 \(a\) - \(f\)](#)). In addition, there was no significant relationship between background mortality and LC_{50} to acetamiprid estimated on the 15 bioassayed populations, even if background mortality significantly differed between populations ($LR_7 = 707$, $P < 0.0001$).

V.6. Discussion

This is the first report of resistance status to acetamiprid and pymetrozine in *B. tabaci* species of La Réunion populations, and it is of importance for IO species, which have never been tested elsewhere before. MEAM1 and IO *B. tabaci* populations in La Réunion displayed very different insecticide resistance profiles. The native IO species populations were all found to be sensitive to both acetamiprid and pymetrozine. During our survey, we had difficulty in finding pure IO populations in cultivated areas, as observed in previous studies ([Delatte et al. 2005](#), [Delatte et al. 2009](#)). Therefore, only a limited number of IO populations could be tested and we were unable to completely rule out the existence of resistant IO populations at a low frequency in La Réunion. In stark contrast, a vast majority of MEAM1 populations were found to be resistant to one or both insecticides.

Twelve out of 14 MEAM1 field-collected populations in La Réunion were found to be resistant to acetamiprid (a neonicotinoid), with RR_{50} varying from 15.7 to 148.2. The first case of resistance of a *B. tabaci* species to a neonicotinoid insecticide – imidacloprid – was reported in Spain in 1995 ([Cahill et al. 1996](#)). Since then, other resistance cases of MEAM1 species to neonicotinoids have been reported elsewhere ([Basit 2019](#), [Whalon et al. 2019](#)). Nonetheless, few studies have specifically tested the resistance to acetamiprid in MEAM1 species: it was often investigated because of the cross-resistance existing with thiamethoxam and imidacloprid ([Rauch and Nauen 2003](#), [Horowitz et al. 2004](#), [Prabhaker et al. 2005](#)). Similarly, 12 out of 14

MEAM1 field-collected populations tested were found to be resistant to pymetrozine. Resistance to pymetrozine was first described in a mixed population of MEAM1 and MED species collected in Europe, in Southern Spain in 1998 ([Elbert and Nauen 2000](#)). Since then it has been reported in other countries, e.g. in Cyprus, Guatemala and Mexico ([Gorman et al. 2010](#)), China ([Rao et al. 2012](#)) and Malaysia ([Shadmany et al. 2015](#)). Our results are similar to those of [Bielza et al. \(2018\)](#), who selected a lab pymetrozine-resistant population and a lab spiromesifen-resistant population, both highly resistant to pymetrozine with $LC_{50} > 10 \text{ g L}^{-1}$. For both tested insecticides, our results are in line with reports of loss of efficacy in the fields of La Réunion.

Three main hypotheses could explain the discrepancy between the resistance statuses of MEAM1 and IO species: (i) the two species live in different niches and are not subjected to the same selective pressure, (ii) the intrinsic ability to evolve insecticide resistance is different between the two species and/or (iii) pre-existing resistance conferring alleles are present in the MEAM1 invading population. The first hypothesis is unlikely since these two species can be found in close vicinity in La Réunion. Some of the sampled populations even consisted of a mix of the two species, therefore allowing hybridization ([Delatte et al. 2006](#)) and potential introgression of resistant alleles from one species to the other. Nevertheless, the scarcity of hybrids in the field ([Delatte et al. 2005](#), [Thierry et al. 2011](#)) prevented any measurement of sensitivity to insecticides in the hybrids.

The second hypothesis of different intrinsic evolutionary potential would require some further biological characterization of the two species, already knowing that MEAM1 field population size is larger than IO ([Delatte et al. 2006](#), [Delatte et al. 2009](#), [Thierry et al. 2011](#)), it has a capacity to develop under a broader range of temperatures ([Delatte et al. 2009](#)) and it is highly polyphagous ([Malka et al. 2018](#)). As an example, the evolution of resistance may be hindered in IO species by molecular constraints. Such a case has been reported on other insects such as mosquitoes (*Aedes aegypti*), where a particular codon constraint prevented the apparition of the required mutation in the acetylcholinesterase gene to confer resistance to organophosphates and carbamates ([Weill et al. 2004](#)). Whole genome sequencing of the IO species and comparison with MEAM1 (as performed by [Hussain et al. 2019](#)) could give insights into such molecular constraints to insecticide resistance by identifying high-impact variants in resistance related genes. Further investigations will be needed to better understand the mechanisms underlying the high susceptibility of the indigenous species IO.

The last hypothesis suggests that it might very well be that MEAM1 was introduced in La Réunion with its accompanying spectrum of insecticide resistances. To confirm or disprove

this hypothesis, it would be necessary to study the colonization history of the MEAM1 species and compare the mutation involved in insecticide resistance in MEAM1 populations in different countries. It has been shown that several underlying mechanisms are involved in the resistance to acetamiprid and pymetrozine ([Nauen and Denholm 2005](#), [Bass et al. 2015](#), [Nesterov et al. 2015](#)). A detoxification mechanism with overexpression of cytochrome-P450-dependent monooxygenase, encoded by an overexpressed CYP6CM1 gene, is one of them, and it has been shown that it confers resistance to neonicotinoid insecticides and pymetrozine ([Karunker et al. 2008](#), [Roditakis et al. 2011](#), [Nauen et al. 2013](#)). This mechanism might be involved in the 10 out of 14 populations from La Réunion showing resistance to both acetamiprid and pymetrozine. However, the occurrence of other resistance mechanisms cannot be ruled out since 4 out of 14 MEAM1 populations were found to be resistant to either acetamiprid or pymetrozine only ([Gorman et al. 2010](#), [Rao et al. 2012](#)). Target-site resistance to neonicotinoids has been described in other insect species. For example, in the green peach aphid, *Myzus persicae*, a single point mutation in the gene coding for the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) resulted in high levels of resistance to several neonicotinoids ([Bass et al. 2011](#)). However, no such mutation in the corresponding genomic region of *B. tabaci* has been described so far ([Bass et al. 2015](#), [Satar et al. 2018](#)). It could be interesting to investigate those populations further in order to identify the mechanism involved.

Insecticide resistance mutation is generally associated to a fitness cost, in the absence of pesticide use. Among fitness-related traits, background mortality (estimated from bioassays) as well as fecundity, female adult life expectancy and lifetime reproductive success varied between the tested MEAM1 populations. Such differences in female life history traits between populations may reflect local adaptation to contrasted environments ([Lenormand 2012](#)). Nevertheless, differences in fitness-related traits were not correlated with differences in resistance to acetamiprid. Similarly, background mortalities estimated on all bioassayed populations were not linked with LC₅₀. Hence, we could not detect any fitness cost associated with resistance.

It should be noted that experiments on fitness cost measured in the laboratory cannot predict the effective fitness cost in the natural environment ([Bass and Ffrench-Constant 2017](#)). An absence of fitness cost may be due to favourable rearing conditions in the laboratory, failing to reveal costs that would be measurable under more stressful conditions ([Lenormand et al. 2018](#)). Despite potential experimental limitations, our results are in line with [Basit et al. \(2012\)](#), who found no detrimental impact of the resistance to acetamiprid when comparing susceptible populations to an acetamiprid-selected population. Likewise, in the MEAM1 species, resistance

to pyriproxyfen was not associated with fitness cost ([Crowder et al. 2006](#)). On the contrary, [Feng et al. \(2009\)](#) found that after 36 generations of selection for resistance to thiamethoxam, a *B. tabaci* selected population showed reduced fitness (in development time, adult longevity and fecundity) compared to the susceptible laboratory population.

The lack of fitness cost found in our study may be due to various mechanisms: the emergence of new mutations elsewhere in the genome acting as modifiers ([Davies et al. 1996](#)), the replacement of the adaptive allele by less costly ones ([Guillemaud et al. 1998](#)), the duplication of the targeted gene ([Labbé et al. 2005](#)) or the pre-existence of resistance mutations prior to insecticide pressure ([Hartley et al. 2006](#)). The first three mechanisms require several generations to occur, indicating that resistance to acetamiprid is not recent in La Réunion.

The high occurrence and the high level of insecticide resistance in the La Réunion populations of a whitefly species reflect the failure of actual pest management strategies. The absence of fitness cost measured in the laboratory should theoretically translate into a maintenance of insecticides resistance in the populations, even if the selection pressure is suppressed. The recent ban on neonicotinoids in Europe in general, and in France in particular, will provide an open-air evolutionary experiment to test this hypothesis in the La Réunion field. The difference in the insecticide resistance profiles of these two species should result in different resistance management strategies. Unfortunately, it is not possible to distinguish these two species easily in the field. In addition, strategies based on alternation of insecticides would probably not be efficient on *B. tabaci* MEAM1 populations because of the high occurrence of multiple resistances in La Réunion. Other control measures, such as biological control, use of resistant varieties or modification of cultural practices, should be applied.

V.7. Acknowledgments

The authors are grateful to all farmers from La Réunion who welcomed us in their fields for sampling whitefly. We would like to thank Aëla Vancassel for her technical support during leaf-dip bioassays and life history traits monitoring. The authors acknowledge Myriam Siegwart for her advice and valuable comments on the bioassay experimental protocol. This study was funded by the CIRAD, the ‘Conseil Régional de La Réunion’ and the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD). A. Taquet is a recipient of a PhD fellowship from the CIRAD and Anses. The authors acknowledge the Plant Protection Platform (3P, IBISA) where all experiments were conducted.

V.8. Supporting information

Table V-S1. *B. tabaci* field populations sampling in La Réunion: species, collection date, location, environment, host plant, survey of farmers' usage of insecticides and experiments conducted on the population.

Species	Population	Collection date	GPS coordinates		Environment	Host plant	Farmer survey		Tested for insecticide resistance		Life history traits
			Latitude	Longitude			Insecticides	Families	Acetamiprid	Pymetrozine	
IO	P35	24/10/2017	21° 6'4.21"S	55°44'58.39"E	Non-cultivated	Weeds	No		X		
IO + MEAM1	P60	24/11/2017	21°15'46.3"S	55°27'20.3"E	Non-cultivated	Weeds	No		X	X	
IO + MEAM1	P64	22/12/2017	21°21'41.91"S	55°34'51.80"E	Non-cultivated ^a	Weeds	No		X	X	
MEAM1	P13	21/11/2017	21°18'49.62"S	55°25'25.70"E	Greenhouse	Tomato	NA	NA	X	X	X
MEAM1	P18	24/10/2017	20°58'15.49"S	55°40'2.19"E	Greenhouse	Tomato	Yes	EO, NEO, PY-A	X	X	X
MEAM1	P21	07/11/2017	21°21'27.50"S	55°46'39.13"E	Greenhouse	Tomato	Yes	AVE	X	X	X
MEAM1	P23	17/11/2017	21°16'29.39"S	55°22'43.24"E	Field surroundings	Weeds	NA	NA	X	X	
MEAM1	P25	07/11/2017	21°21'45.58"S	55°32'25.80"E	Greenhouse	Melon	Yes	NEO, PY-A, SPI, TAD	X	X	X
MEAM1	P31	07/11/2017	21°22'5.20"S	55°40'27.56"E	Open field	Tomato + Eggplant	No		X	X	X
MEAM1	P32	23/11/2017	21°16'45.15"S	55°27'35.90"E	Open field	Eggplant	Yes	NEO, PY-C, PYR, SPI	X	X	
MEAM1	P55	31/10/2017	21°21'52.63"S	55°41'8.43"E	Greenhouse	Tomato	Yes	NEO, PY-A, PY-C	X	X	
MEAM1	P56	21/11/2017	21°15'8.68"S	55°20'34.19"E	Open field	Pumpkin	No		X	X	X
MEAM1	P58	21/11/2017	21°19'9.59"S	55°28'56.36"E	Open field	Eggplant	Yes	EO, NEO, PY-A, SPI	X	X	
MEAM1	P65	22/12/2017	21°21'58.64"S	55°34'11.30"E	Greenhouse	Melon	Yes	NA	X	X	X
MEAM1	P66	22/12/2017	21°16'31.74"S	55°28'25.77"E	Field surroundings	Weeds	Yes	NA	X	X	

Weeds: Mexican fireplant *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae), bean *Vigna sp.* L. (Fabaceae), lantana *Lantana camara* L. (Verbenaceae), innoxia *Datura innoxia* Mill. (Solanaceae); Crops: tomato *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae), melon *Cucumis melo* L. (Cucurbitaceae), eggplant *Solanum melongena* L. (Solanaceae), pumpkin *Cucurbita moschata* L. (Cucurbitaceae).

AVE, avermectins; EO, essential oils; NEO, neonicotinoids; PY-A, pyridine azomethine derivatives; PY-C, pyridine carboxamide derivatives; PYR, pyrethrinoids; SPI, spinosyns; TAD, tetronic acid derivatives.

NA, not available.

^a Sugarcane field without any insecticide treatment.

Table V-S2. Effect of population on fitness-related traits.

Fitness-related trait	<i>N</i>	F or Chi ²	<i>P</i> value
Fecundity	75	902	1.60E-5
Female adult life expectancy	75	14.2	0.047
Hatching rate	72	73.8	0.062
Egg-to-adult survival	72	72.6	0.063
Female adult size	160	1.51	0.169
Lifetime reproductive success	66	4.98	1.83E-4

N, number of whiteflies tested; *F*, *F* test; Chi², Chi-square test.

VI. Discussion générale et perspectives

VI.1. Discussion générale

Dans l'étude des résistances aux produits insecticides chez les insectes ravageurs des cultures, ce travail de thèse apporte une contribution certaine à l'édifice, et plutôt singulière, du fait du contexte et du cadre de notre étude. En effet c'est la première fois, dans le monde, qu'une espèce indigène du complexe d'espèces cryptiques *Bemisia tabaci* est testée afin d'évaluer sa résistance aux produits insecticides. Bien que les populations des espèces envahissantes MEAM1 et MED-Q aient fait l'objet de nombreux tests de résistance à travers le monde, il s'agit également d'une première pour les populations, désormais établies (MEAM1) ou en cours d'établissement (MED-Q), à La Réunion. Les résultats sont sans appel : l'espèce indigène était sensible à tous les insecticides testés, alors que les espèces envahissantes étaient majoritairement résistantes (voire très résistantes). De plus, la résistance à l'acétamipride semblerait ne pas avoir de coût : celle-ci peut alors se diffuser au sein des populations de La Réunion. L'utilisation d'outils moléculaires a également permis de mettre en évidence que la résistance aux pyréthrinoïdes est quasi fixée au sein des populations de MEAM1 et MED-Q étudiées.

Le milieu insulaire qui constitue le cadre de notre étude, ainsi que le contexte d'invasions biologiques successives qui le structure, nous ont offert l'opportunité d'intégrer à notre réflexion des concepts relevant de l'écologie des populations, qu'elles soient envahissantes ou indigènes. Contrairement aux études précédemment réalisées sur l'île, nous nous sommes efforcés d'analyser en particulier les agrosystèmes, environnements dans lesquels l'espèce MEAM1 s'est révélée être prédominante. Enfin, ce qui rend nos travaux particulièrement originaux, c'est aussi et surtout l'étude de l'hybridation interspécifique, ayant lieu en conditions naturelles (en faible proportion), entre l'espèce MEAM1 et IO. Cela nous a amenés à devoir évaluer l'importance de la contribution de ce phénomène dans la dynamique d'acquisition et l'évolution des résistances aux insecticides au sein du complexe d'espèces étudié.

Résistance aux insecticides : du génotype au phénotype ?

Notre étude de la résistance aux insecticides s'est faite à travers deux approches : un phénotypage par bioessais (obtention d'une courbe dose-réponse) et un génotypage. Ces deux approches sont complémentaires et renseignent sur deux étapes évolutives importantes :

l'apparition de mutations et la réponse de la sélection (qui s'applique sur les phénotypes et leur adéquation aux pressions de l'environnement).

Estimation des niveaux de résistance par courbe dose-réponse

Nos résultats d'estimation des niveaux de résistance dans les populations de MEAM1 et IO, échantillonnées dans une diversité d'environnements, confirment nos hypothèses d'une espèce envahissante résistante et d'une espèce indigène sensible. Ils sont en fait plus tranchés que ceux que nous attendions. IO ne montre aucun signe, même faible, de résistance et MEAM1 a une résistance tellement élevée à la pymétozine qu'il était impossible de déterminer la CL₅₀ pour la moitié des populations. La résistance phénotypique de MED-Q et des hybrides n'a pas pu être estimée en raison de leur faible nombre lors des échantillonnages.

Certaines populations de MEAM1 étaient à la fois résistantes au Plenum et au Suprême, ceci correspond sans doute à l'implication d'un mécanisme de résistance croisée, déjà décrit chez l'aleurode, et lié à la surexpression du gène codant pour une enzyme de détoxification (la monooxygénase cytochrome-P450-dépendante ; [Karunker et al. 2008](#), [Roditakis et al. 2011](#)). Cependant, comme quatre autres populations n'étaient résistantes qu'à l'une des deux molécules testées, il est probable que d'autres mécanismes de résistance, non encore décrits à ce jour chez *B. tabaci*, soient également impliqués. La mise en évidence de résistances croisées est fréquente dans la littérature (par exemple [Wang and Wu 2007](#), [Feng et al. 2010](#), [Basit et al. 2013](#)), et traduit en général une résistance de type métabolique, impliquant des enzymes de détoxification, dont la quantité ou encore l'activité serait augmentée et agirait sur plusieurs insecticides.

Bioessais et populations en mélange

Une des difficultés rencontrées pour l'estimation des niveaux de résistance des différentes populations d'aleurodes à La Réunion concernait le fait de ne pas pouvoir identifier immédiatement les espèces, et d'avoir des populations en mélange (MEAM1, IO ou MED-Q). Cela nous a conduits à choisir des populations supposées pures pour réaliser les tests. Cette supposition a été vérifiée *a posteriori* par génotypage, pour une partie des individus. Dans deux populations ce n'était pas le cas, et il a fallu génotyper la totalité des individus testés pour reconstituer les niveaux de résistance des deux espèces. Les courbes représentées dans la figure ci-après illustrent ce processus : en ignorant qu'on a un mélange de MEAM1 et IO, on obtient une courbe à mi-chemin entre les courbes reconstituées pour chaque espèce ([Figure VI-1](#)). Cela donne l'impression qu'il suffit de génotyper tous les individus, après un bioessai mené sur une

population en mélange, pour obtenir des estimations de résistance. Malheureusement, cela n'est pas aussi simple : le nombre d'individus testés pour chaque espèce est largement diminué par rapport à la taille d'échantillon initialement prévue, et cela induit des imprécisions fortes dans les estimations de CL_{50} . Il faut noter que le choix de travailler sur des populations pures amène en contrepartie un biais de représentativité dans les résultats : ils n'indiquent pas totalement ce qui se passe dans les zones d'interface entre les deux espèces (où les populations sont le plus mélangées et où il y a des hybrides).

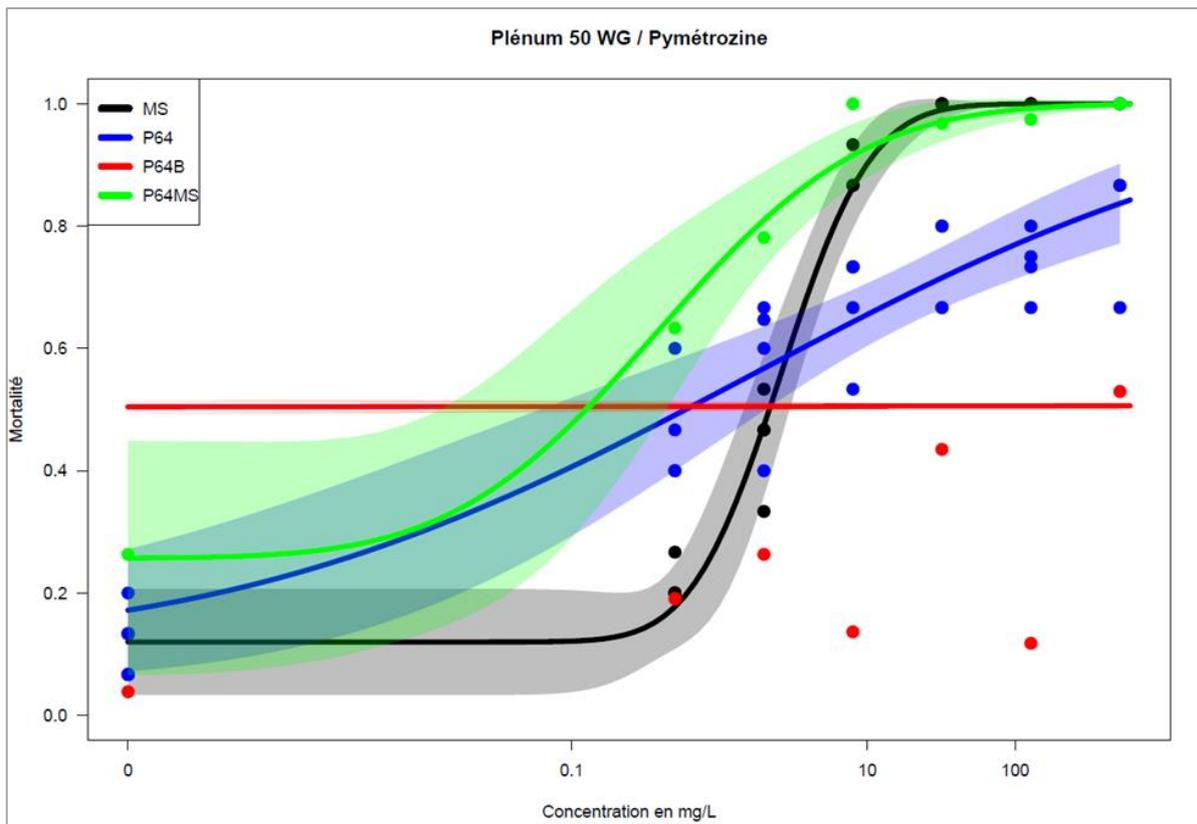


Figure VI-1: Courbes dose-réponse de la population P64 testée au Plenum avant génotypage (courbe bleue) et après séparation des individus IO (courbe verte) et MEAM1 (courbe rouge). La courbe noire notée 'MS' est celle de notre population IO de référence.

Approche dose-réponse ou dose-discriminante ?

Au début de ma thèse, une autre option que l'estimation des CL_{50} par courbe dose-réponse avait été envisagée et testée. Il s'agissait de tests avec dose discriminante ([Figure VI-2](#)) : on teste la mortalité des individus face à une seule dose, correspondant ici à la CL_{50} de la population de référence. J'avais alors testé 24 populations de MEAM1 avec 4 insecticides : le Plenum® 50 WG, le Suprême® 20 SG (comme pour l'étude en dose-réponse publiée), mais

aussi le Decis Protech® (deltaméthrine, molécule insecticide de la famille des pyréthrinoïdes) et le Prev-Am® (huile essentielle d'orange douce). Les résultats obtenus mettaient déjà en évidence des résistances pour les trois insecticides conventionnels, mais posaient aussi des questions de répétabilité des résultats. Les problèmes de répétabilité des tests insecticides sont des difficultés couramment rencontrées, même si ceux-ci sont peu souvent reportés dans la littérature. Même en standardisant tout ce qui peut l'être et en travaillant sur des clones (pucerons), la répétabilité n'est pas parfaite (communication personnelle). Cette difficulté technique nous a poussés à choisir des mesures en dose-réponse. Nous avons alors testé la résistance de deux populations MEAM1 au Decis Protech®, en comparaison à notre population de référence ([Figure VI-3](#)). Les ratios de résistance étaient faibles, mais les CL_{50} étaient importantes ; supposant ainsi un niveau de résistance déjà élevé dans la population de référence ($5,5 \text{ mL.L}^{-1}$), et des résistances fortes sur le terrain. La résistance aux pyréthrinoïdes est donc la seule que j'ai testée, d'un point de vue phénotypique et génotypique à travers la mutation *kdr*.

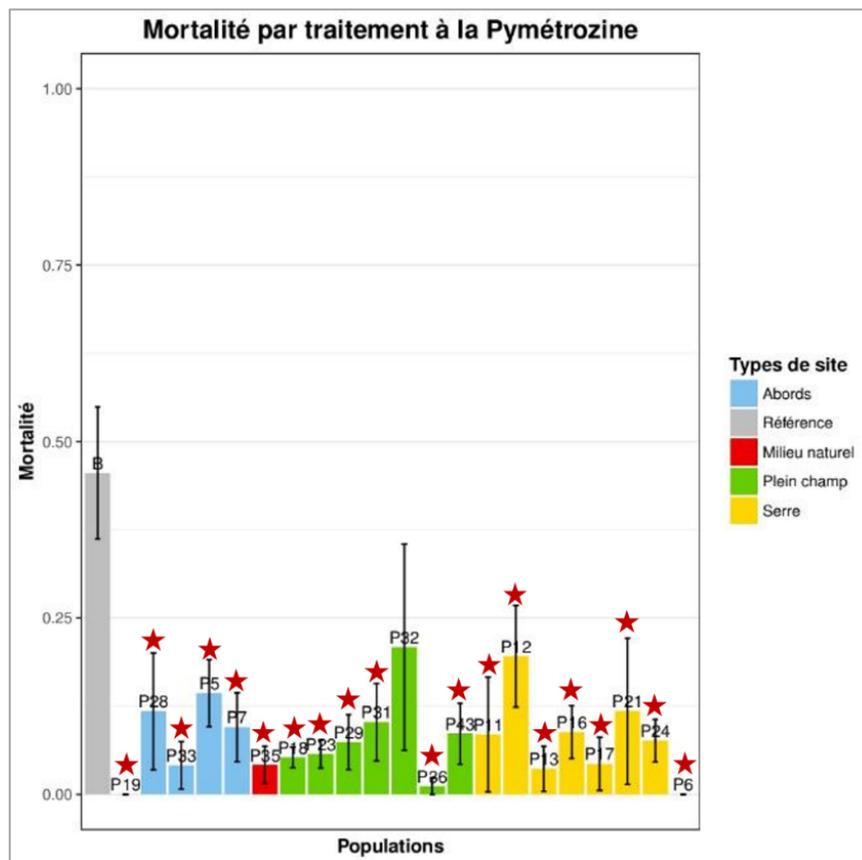


Figure VI-2 : Exemple de résultats expérimentaux obtenus à la suite de tests de résistance de type dose-discriminante sur des populations d'aleurodes MEAM1. Les 21 populations de terrain sont traitées avec une dose correspondant à la CL_{50} de la population de référence (en gris). Les étoiles rouges désignent les populations pour lesquelles nous obtenons une mortalité significativement différente de celle de la population de référence.

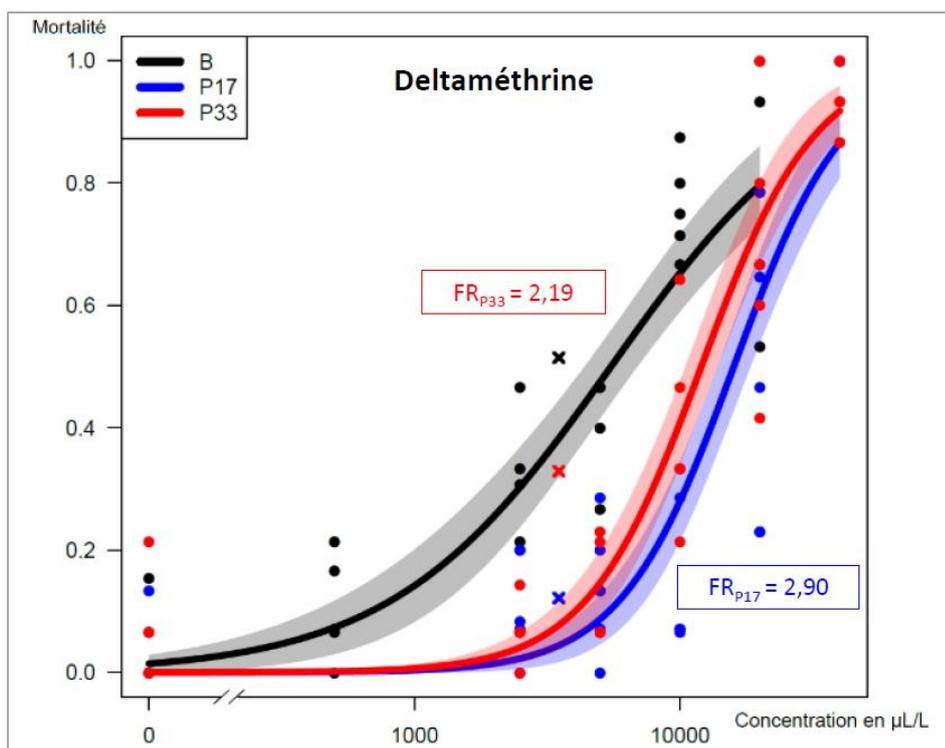


Figure VI-3 : Courbes dose-réponse obtenues suite au traitement des populations MEAM1 P17 (en bleu) et P33 (en rouge) au Decis Protech® (molécule active : deltaméthrine), et comparées à la courbe obtenue pour la population MEAM1 de référence (en noir). L'acronyme « FR » correspond au facteur de résistance, calculé par rapport à la population de référence.

*Etude de la mutation *kdr**

Il existe en fait deux mutations *kdr*, conférant une résistance aux pyréthrinoïdes, décrites chez l'aleurode *B. tabaci* : elles se situent dans le gène qui code pour le lieur entre les segments transmembranaires 4 et 5 de la sous-unité α II (IIS4-5) du canal sodique voltage-dépendant. La première mutation, notée T929V, n'a jamais été décrite chez MEAM1, contrairement à la seconde L925I ([Alon et al. 2006](#)). Un diagnostic moléculaire simple de la mutation L925I existe, et consiste en la réalisation d'une PCR-RFLP ([Tsagkarakou et al. 2009](#)).

Nous avons ainsi pu génotyper les 1537 individus de nos 56 populations (espèces MEAM1, MED-Q et IO, ainsi que les hybrides MEAM1-IO). Ceci nous donne une vision beaucoup plus large de la résistance (géographiquement et en termes d'espèces) que pour l'étude en bioessai. Ces données vont dans le même sens que les résultats de phénotypage de résistance pour IO et MEAM1 : les individus IO sont tous sensibles, alors que la mutation résistante *kdr* est quasiment fixée chez MEAM1. Une hypothèse serait que les rares individus présentant l'allèle sensible seraient issus de croisements avec IO, et que les individus MEAM1 introduits à l'origine sur l'île portaient tous la mutation à l'état homozygote.

Il n'y a pas d'études portant sur la dominance des allèles *kdr* résistants chez l'aleurode. La plupart des échantillonnages de terrain trouvent peu d'hétérozygotes, à tel point que [Tsagkarakou et al. \(2009\)](#) ont mélangé des mâles sensibles et résistants pour obtenir des profils de digestion de type hétérozygotes, de façon à pouvoir vérifier l'efficacité de leur méthode de diagnostic PCR-RFLP. La revue de [Bourguet et al. \(1996\)](#) indique que les résistances *kdr* dans le canal sodique sont des mutations semi-récessives, variant de la codominance à une presque totale récessivité. Cette récessivité a une explication physiologique : les pyréthriinoïdes induisent l'ouverture permanente du canal sodique, entraînant la mort des individus. Ainsi, des individus hétérozygotes possédant 50% de canaux sensibles à l'insecticide seraient donc phénotypiquement similaires à des individus homozygotes sensibles. En cas de codominance (comme dans l'étude de [Bouvier et al. 2001](#) concernant *Cydia pomonella*, le carpocapse des pommes et poires), les hétérozygotes RS ont une moins bonne *fitness* face à un traitement insecticide que les individus homozygotes sensibles SS. Selon ces informations, on peut supposer que les individus hétérozygotes RS sont (partiellement) contre-sélectionnés. Ainsi les hybrides entre IO et MEAM1, portant l'allèle sensible, seraient contre-sélectionnés par les traitements insecticides. Cette plus faible *fitness* des hybrides pourrait réduire leur proportion, au moins dans les agrosystèmes, apportant un élément de plus pour comprendre la baisse de la fréquence des hybrides au cours du temps à La Réunion.

Chez les individus MED-Q, les deux mutations L925I et T929V sont retrouvées, d'après les données de séquençage. Cependant, elles ne sont jamais retrouvées sur une même séquence (comme déjà mentionné), mais 26 individus portent les deux mutations. Dans l'ensemble, tous les individus MED-Q portent au moins une mutation conférant la résistance. [Alon et al. \(2006\)](#) proposent que les mutations L925I de MED-Q et MEAM1, ainsi que la mutation T929V de MED-Q, aient des origines indépendantes (et que les deux espèces sont bien séparées). Cependant, dans notre jeu de données, nous trouvons une occurrence de la mutation T929V chez un individu identifié comme MEAM1. Evidemment, un seul individu ne permet aucune conclusion, mais indique qu'il peut être intéressant de regarder de plus près ce qu'il se passe. Une explication pourrait être que cet individu serait un hybride MEAM1-MED-Q, et signerait une potentielle introgression de l'allèle résistant de MED-Q vers MEAM1. Cependant, cela contredirait les observations faites jusqu'à lors concernant l'incapacité à l'hybridation de ces deux espèces.

Le séquençage de la région *kdr* du canal sodique a permis de noter la présence systématique d'une mutation (L3) dans un intron chez les espèces IO et MED-Q, à la différence de l'espèce MEAM1 pour laquelle seulement 15,5% des individus avaient cette mutation. [Alon](#)

[et al. \(2006\)](#) décrivent ces mutations ponctuelles dans l'intron comme étant phylogénétiquement informatives pour distinguer les espèces MEAM1 et MED-Q. De façon très intéressante, chez MEAM1 cette mutation était uniquement associée à des génotypes RS ou SS. Elle est également présente chez les hybrides dont un est rétrocroisé vers MEAM1 (avec un haplotype mitochondrial IO) et un génotype *kdr* RS. L'ensemble de ces informations amène l'idée suivante : la mutation L3 signifierait bien l'appartenance aux espèces MED-Q ou MEAM1, et les 15,5% d'individus portant cette mutation chez MEAM1 seraient issus d'hybridations (même lointaines) ; ils auraient acquis l'allèle L3 en même temps que l'allèle sensible. Ceci conforterait les hypothèses (i) d'introgession d'allèles sensibles, de IO vers MEAM1, responsables des quelques individus RS et SS observés parmi l'ensemble des individus RR ; et (ii) de l'introduction d'individus MEAM1 sur l'île (invasion) chez lesquels la mutation *kdr* était déjà fixée. Une autre hypothèse pour expliquer la présence d'individus MEAM1 possédant l'allèle L3, serait que cette mutation était bien présente dans la population envahissante (i.e. à l'origine de l'invasion). Il faudrait pouvoir vérifier plus largement la présence de cet allèle dans d'autres populations de MEAM1 à travers le monde, afin de pouvoir trancher entre ces scénarii.

Les coûts de la résistance

A la suite des expériences de courbe dose-réponse, nous avons profité des nombreuses populations de terrain présentes au laboratoire et montrant différents niveaux de résistance à l'acétamipride, pour aborder la question du coût associé à cette résistance. Le postulat de départ était que des populations plus résistantes auraient des valeurs de *fitness* plus faibles, en raison d'un coût infligé par les mécanismes de résistance (modification de l'efficacité d'une protéine, énergie requise pour cette résistance...). Cette notion de coût de la résistance peut être liée à deux idées majeures : (i) la *fitness* d'un individu dépend de l'environnement dans lequel il se trouve ; (ii) les ressources d'un individu sont limitées, ce qui se traduit par des compromis évolutifs ([Lenormand et al. 2018](#)).

Dans notre cas, les populations testées montrent bien des différences marquées de traits d'histoire de vie. Mais ceci n'est pas corrélé avec le niveau de résistance. En particulier, la population la plus sensible, celle du laboratoire, a des traits d'histoire de vie moins efficaces que les autres populations. Ceci dénote assez probablement de la dépression de consanguinité dans l'élevage. Les autres différences entre populations pourraient résulter d'adaptations locales à des environnements contrastés, mais il n'est pas possible de conclure sur ce point.

A partir des mesures effectuées, il n'y a pas d'indication de coût associé à la résistance à l'acétamipride chez MEAM1. Ceci pourrait être lié à des conditions expérimentales inappropriées pour mettre en évidence un coût. Il est tout à fait possible que le coût de la résistance ne s'exprime pas sur les quelques traits explorés. Nous avons aussi mesuré une croissance démographique pour une mesure plus inclusive de la *fitness*, mais cela ne change pas les résultats. D'autres traits que les traits d'histoire de vie pourraient être impactés, comme les comportements d'accouplement ou de recherche d'hôte, la capacité de vol ou la capacité vectrice (par exemple [Berticat et al. 2002](#), [Berticat et al. 2004](#), [Guedes et al. 2009](#), [Alout et al. 2013](#)). Une autre limite expérimentale est celle des conditions environnementales dans lesquelles sont menées les mesures. Ainsi, si les coûts de résistance sont faibles, il est possible qu'ils passent inaperçus. On peut alors mettre les individus en conditions plus contraignantes, pour mieux faire apparaître les coûts, mais c'est aussi prendre le risque d'avoir beaucoup de mortalité.

La dernière remarque sur notre protocole expérimental concerne le fait d'avoir comparé des populations ayant à la fois des différences de niveau de résistance à l'acétamipride et des différences génétiques. En effet, la grande majorité des études mesurant un coût de la résistance se base sur la comparaison d'une population sensible et d'une population résistante, issues d'une même souche soumise ou non à pression insecticide. Une des limites de ce type d'approche est que la sélection appliquée ainsi au laboratoire a tendance à sélectionner, en même temps que la résistance, d'autres types de traits. En effet, la pression de sélection imposée induit aussi des différences de mortalité et de densité entre traitements, qui peuvent résulter en des changements de traits d'histoire de vie (sans lien avec le coût de la résistance).

Finalement, il est fréquent de ne pas trouver de coût de la résistance, et cela a déjà été rapporté plusieurs fois chez l'aleurode ([Crowder et al. 2006](#), [Basit et al. 2012](#)). Cette absence de coût (ou plutôt atténuation du coût avec le temps) est souvent expliquée par l'émergence de nouvelles mutations moins coûteuses, ou de gènes modificateurs ([Kliot and Ghanim 2012](#)). Elle permet le maintien de la résistance dans une population, même quand la pression de sélection est supprimée, ce qui est maintenant le cas avec l'acétamipride.

Dynamique temporelle d'acquisition de la résistance

Un envahisseur venu avec sa résistance ?

Une question qui reste en suspens à l'issue de ce travail est celle qui concerne la dynamique temporelle d'acquisition de la résistance, à la fois chez MEAM1 et chez IO. Une même question, qui émerge de deux constats on ne peut plus opposés. L'espèce invasive MEAM1 présente sur le sol réunionnais démontre des niveaux de résistance très élevés à la pyméthrozine ($RR > 100$), ainsi qu'à l'acétamipride ($RR > 10000$) : comment peut-on expliquer l'existence de tels niveaux de résistance ? On peut raisonnablement considérer deux scénarii : dans le premier, les individus MEAM1 qui ont été introduits sur l'île, à la fin des années 90, étaient des individus résistants (i.e. ils ont évolué leur(s) résistance(s) sur un autre territoire). Dans le second scénario, les premiers individus introduits à La Réunion étaient sensibles aux insecticides, et ont développé leur(s) résistance(s) sur place, sous la pression des traitements insecticides. Mais alors, si l'on considère cette seconde possibilité, cela supposerait que l'espèce MEAM1 ait pu en très peu de générations acquérir une telle mutation. Des travaux en laboratoire ont montré qu'il suffisait de 36 générations à l'espèce MEAM1 pour acquérir la résistance à un néonicotinoïde, le thiaméthoxame ([Feng et al. 2009](#)). Cette seconde hypothèse ne peut donc être complètement écartée.

Une espèce indigène qui demeure sensible

L'espèce IO est fréquemment retrouvée dans les abords d'agrosystèmes et en très faible quantité dans les agrosystèmes eux-mêmes. Ainsi ces populations pourraient avoir été et être en contact avec des traitements insecticides, mais à de faibles doses qui pourraient être considérées comme sublétales. Ces expositions répétées à des doses sublétales pourraient avoir des conséquences potentielles pour l'acquisition de résistances aux insecticides. En effet, l'exposition à des doses très faibles d'insecticides peut fortement stresser une population, sans forcément la décimer, et retarder la sélection d'une résistance majeure, tout en favorisant les résistances multifactorielles ou polygéniques ([Gressel 2011](#), [Ram and Hadany 2014](#)).

Toutefois, d'autres mécanismes peuvent être mis en jeu lors de l'application de doses sublétales, comme la possibilité d'induction d'enzymes de détoxification. Ces enzymes sont largement reconnues comme d'importants mécanismes de résistance aux insecticides, et cela a même été démontré vis-à-vis des néonicotinoïdes ([Bass et al. 2015](#)). Cependant, les enzymes de détoxification sont inductibles : ce phénomène est souvent décrit pour des populations résistantes, mais l'induction peut également se produire dans des populations non résistantes,

ce qui leur permet une meilleure tolérance aux insecticides ([Hua et al. 2014](#)). Ce type de mécanisme a récemment été mis en évidence chez le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*), en réponse à de faibles doses d'imidaclopride avec l'implication des estérases (E4) et du cytochrome P450 (CYP6CY3 ; [Rix et al. 2016](#)).

De nombreuses populations de l'espèce IO, échantillonnées dans les agrosystèmes, n'ont pu être testées en bioessais au laboratoire en raison de leur faible nombre d'aleurodes, ou encore en raison de populations en mélange. Ainsi pour ces populations, nous n'avons pu reporter que les résultats de la recherche de mutations de cible conférant une résistance aux pyréthriinoïdes. Nous ne pouvons donc pas exclure l'hypothèse que la présence des individus IO dans les agrosystèmes serait liée à une résistance de type métabolique (détoxication). Une autre hypothèse (non exclusive) expliquant la présence de ces individus ne portant pas la mutation *kdr*, serait leur capacité à adopter un comportement d'évitement ([Nansen et al. 2016](#)). Ce mécanisme a déjà été décrit chez de nombreuses espèces d'insectes, et pourrait à terme permettre à l'espèce IO d'accumuler des allèles de résistance de faible ampleur, distincts de la sélection d'une mutation majeure. L'espèce IO, a été en contact avec des insecticides depuis au moins l'arrivée de l'espèce MEAM1, mais semble toujours sensible malgré tout. Ainsi l'une des dernières hypothèses serait le manque de plasticité génomique de cette espèce, qui pourrait par exemple s'évaluer sur la quantité de ses éléments transposables ([Chénais et al. 2012](#)), ou l'existence de contraintes moléculaires ([Weill et al. 2004](#)).

La résistance aux insecticides favorise-t-elle le succès d'invasion ?

Le processus d'invasion, comme nous l'avons vu précédemment, peut être considéré comme une série d'étapes qui sont initiées lorsque les propagules d'une espèce sont transportées vers une nouvelle zone. Après cette étape de transport, les nouveaux arrivants subissent des contraintes biotiques et abiotiques, et seule une petite fraction de ceux-ci s'établit et persiste. A ce stade, les espèces sont considérées comme établies ou encore « naturalisées ». Ce n'est qu'après une dernière étape, qui comprend des mécanismes de dispersion à large échelle et d'augmentation des populations (pouvant causer des dommages écologiques et économiques), qu'elles sont considérées comme envahissantes ([Blackburn et al. 2011](#)).

Sur l'île de La Réunion, l'espèce MEAM1 a franchi ces différentes étapes en un temps record. En effet, dès 1997, les premiers symptômes de Begomovirus sur tomate (le TYLCV) sont décrits ([Peterschmitt et al. 1999](#)), et en parallèle des niveaux de populations d'aleurodes encore jamais observés sur le territoire ont alerté les agriculteurs ([Reynaud et al. 2003](#), [Delatte](#)

[et al. 2005](#)). En 2003, cette espèce d'aleurode avait parcouru l'ensemble de la zone maraîchère de la côte ouest de l'île, et trois ans après elle était établie et devenait problématique dans l'ensemble des agrosystèmes de l'île ([Delatte et al. 2005](#), [Delatte et al. 2009](#)). Avec ce travail de thèse, nous avons pu constater que cette espèce, 20 ans après son arrivée, est toujours dominante dans l'ensemble des agrosystèmes de l'île. Sa distribution n'a pas évolué depuis la dernière évaluation de sa distribution ([Thierry et al. 2011](#)) : il est toujours le ravageur principal sur culture de tomate ([Agreste DAAF de La Réunion 2016](#)). Il est l'espèce dominante en plein champs comme sous serre, dans l'ensemble des sites échantillonnés. Nous pouvons donc en conclure que cette espèce s'est établie durablement et peut être considérée comme résidente. De même, nous avons aussi pu mettre en évidence que l'espèce indigène IO n'avait pas vu sa niche évoluer, tout comme ses préférences écologiques (plus forte présence dans les zones non-agricoles, et sur adventices ou autres dicotylédones non-cultivées ; [Delatte et al. 2009](#)). Cet état des lieux montre une stabilité de la niche écologique pour ces deux espèces.

En comparaison, la distribution de l'espèce MED-Q est restreinte à quelques sites et, depuis sa première description en 2010 ([Thierry et al. 2015](#)), elle n'a pas beaucoup changé (dans un rayon de moins de 30 km). De plus, elle a été retrouvée exclusivement dans les agrosystèmes et sur plantes cultivées ([Thierry et al. 2015](#)). Cette restriction géographique et de gamme de plantes hôtes est assez surprenante. En effet cette espèce, bien qu'invasive mondialement dans les agrosystèmes, a aussi beaucoup été décrite sur des plantes non cultivées ou ornementales dans sa zone d'origine ([Saleh et al. 2012](#), [Laarif et al. 2015](#)) ou dans les zones nouvellement envahies ([Zhang et al. 2014](#), [McKenzie et al. 2020](#)) : cela n'est pas le cas à La Réunion.

Dans tous les sites où l'espèce MED-Q a été collectée, elle se trouvait en sympatrie et dominée par le MEAM1, à l'exception d'un seul site. L'espèce MED-Q est supposée plus compétitive face à l'espèce MEAM1, dans des agrosystèmes subissant de fortes pressions insecticides. En Israël, la dynamique de ces deux espèces dans les plein champs était expliquée par leurs spectres différentiels de résistance, favorisant une espèce par rapport à l'autre selon les molécules utilisées ([Horowitz and Ishaaya 2014](#)). La même année, des expérimentations en laboratoire ont montré le même phénomène : MED-Q était capable de remplacer MEAM1 lorsque les populations étaient soumises à de fortes doses de traitements insecticides ([Sun et al. 2013](#)). Plus globalement, MED-Q est entré en compétition avec MEAM1 dans de nombreux pays, jusqu'à ce que celui-ci ne soit plus considéré comme l'espèce cible prioritaire.

De nombreuses populations de ces deux espèces ont été identifiées dans le monde comme résistantes, toutefois, le MED-Q semble acquérir plus rapidement des résistances aux insecticides, comme aux régulateurs de croissance (par exemple le pyriproxifène), aux

néonicotinoïdes ([Horowitz et al. 2020](#)), mais aussi à de nouvelles matières actives récemment mises sur le marché comme les diamides ([Ran et al. 2018](#)). Ainsi, l'espèce MEAM1 serait moins compétitive sous forte pression insecticide, mais en cas de faible niveau de traitement, c'est elle qui dominerait.

Il est possible que les matières actives utilisées dans les agrosystèmes de La Réunion favorisent l'espèce MEAM1, et aussi que leur fréquence soit moindre que dans certains agrosystèmes étudiés ailleurs dans le monde ([Horowitz and Ishaaya 2014](#), [Horowitz et al. 2020](#)). Cette hypothèse pourrait être corroborée par le fait de la présence, même en faible quantité, de l'espèce IO dans les agrosystèmes, malgré sa sensibilité aux matières actives étudiées au cours de cette thèse. Cela expliquerait aussi la dominance des espèces MEAM1 ou MED-Q sur l'espèce IO dans les agrosystèmes.

A ce jour, la plupart des publications comparent des niveaux de résistance entre les espèces du complexe les plus présentes dans les agrosystèmes, MED-Q et MEAM1. Il a été suggéré que leur succès d'invasion à l'échelle mondiale serait favorisé par (i) leur capacité biotique (meilleure *fitness*, comportement d'accouplement, polyphagie... [Liu et al. 2007](#), [Delatte et al. 2009](#), [Himler et al. 2011](#), [Malka et al. 2018](#)), mais aussi (ii) leur forte capacité à développer des résistances aux molécules insecticides couramment utilisées ([Horowitz et al. 2020](#)). Les résultats obtenus au cours de ma thèse confirment en partie cette hypothèse, puisque les deux espèces invasives se retrouvent presque exclusivement dans les agrosystèmes, et semblent plus compétitives face à l'espèce résidente dans ces milieux.

L'espèce IO fait partie du groupe phylogénétique des espèces invasives MED-Q/MEAM1. Elle est très polyphage tout comme celles-ci ([Malka et al. 2018](#)), a une *fitness* un peu moindre que MEAM1 ou MED-Q en conditions de laboratoire ([Bonato et al. 2007](#), [Delatte et al. 2009](#)), mais a une forte fécondité par rapport à d'autres espèces du complexe *B. tabaci*. De plus, des pullulations de l'espèce IO ont été observées en Afrique de l'Est sur des plantes cultivées comme le manioc (espèce rarement traitée aux insecticides), ou des adventices ([Ally 2019](#)). Cette espèce aurait donc le potentiel d'un très bon envahisseur, toutefois, elle n'a pas étendu sa distribution. Ainsi, nous pourrions nous demander si l'une des contraintes qui la restreint à sa répartition actuelle ne viendrait pas, en partie, de sa plus grande sensibilité aux insecticides.

Molécules appliquées et pratiques alternatives utilisées à La Réunion pour la gestion des aleurodes

Au début de ce projet, le choix des insecticides à tester était dicté par l'importance de leur utilisation à La Réunion, et le fait d'avoir des insecticides issus de différentes familles chimiques. Nous nous étions alors basés sur le rapport Agreste de la DAAF ([Agreste DAAF de La Réunion 2016](#)). Parmi les insecticides étudiés, 2 sur 3 sont maintenant interdits : le Suprême et le Plenum. Le premier (un néonicotinoïde avec pour molécule active l'acétamipride) a été interdit dès 2018, comme l'ensemble des néonicotinoïdes, avec une dérogation pour certains usages jusqu'au 1^{er} juillet 2020. Le deuxième résulte de l'interdiction de la pymétozine à partir de janvier 2020. Le Decis Protech (deltaméthrine) est toujours autorisé. On peut alors se demander s'il est pertinent de présenter des résultats pour des insecticides à présent interdits. En premier lieu, l'objectif était d'estimer des résistances issues de réponses à la sélection dans le temps par traitement insecticide, et non d'évaluer la résistance de base avant le début des traitements (comme c'est parfois le cas pour prédire l'efficacité du traitement). Ainsi la pymétozine et l'acétamipride ont eu une autorisation de mise sur le marché en fin 2001 et fin 2004, respectivement. De plus, les processus décrits sur Suprême et Plenum sont en partie généralisables et alertent sur les hauts niveaux de résistance chez l'espèce MEAM1 à La Réunion. Finalement, les mécanismes de résistance existants peuvent être peu spécifiques, comme c'est le cas pour la résistance métabolique, et permettre des résistances croisées avec des molécules toujours utilisées ([Basit 2019](#)).

A présent, plusieurs méthodes de lutte sont développées afin de diminuer la pression insecticide sur les cultures. Le premier moyen, largement mis en œuvre dans le monde et aussi à La Réunion, est l'utilisation de barrières mécaniques avec des serres étanches aux insectes. Une autre option aussi adoptée dès l'arrivée de l'espèce MEAM1 à La Réunion fut l'utilisation de variétés résistantes aux virus transmis ([Reynaud et al. 2003](#)). La dernière méthode qui connaît un développement croissant est la lutte biologique. Elle permet de limiter la taille des populations d'aleurodes grâce à l'utilisation de prédateurs ou parasitoïdes des aleurodes en serre. A La Réunion la Coccinelle, une biofabrique, dispose d'élevages d'*Encarsia formosa* et d'*Eretmocerus eremicus*, deux parasitoïdes de l'aleurode, et développe des élevages de *Nesidiocoris volucer* et *Amblyseius swirskii*, une punaise et un acarien prédateurs des œufs et larves d'aleurodes. L'ensemble de ces pratiques permettent des conduites de culture selon un cahier des charges de « lutte raisonnée », avec une diminution très forte du nombre de traitements insecticides, notamment en culture sous abris.

VI.2. Perspectives

Parmi les résultats obtenus à l'issue de ce travail de thèse, nous avons apporté des réponses non seulement au sujet de la répartition des trois espèces d'aleurode du complexe *B. tabaci* présentes sur l'île de La Réunion, mais aussi sur leurs niveaux de résistance à certaines molécules insecticides, testées par bioessais et sur la présence d'allèles conférant une résistance aux pyréthrinoïdes (*kdr*). L'espèce indigène IO a été la plus sensible aux insecticides. Elle fut retrouvée en très faible quantité dans les agrosystèmes, mais distribuée sur toute l'île et dans les différents écosystèmes échantillonnés. L'espèce MEAM1 s'est révélée dominante dans les agrosystèmes, même face à l'espèce MED-Q, présumée meilleure compétitrice dans les milieux fortement soumis à pression de sélection insecticide. Afin de pouvoir aller plus loin dans la compréhension des mécanismes limitant le succès de l'invasion de l'espèce MED-Q, et l'établissement durable de l'espèce IO dans les agrosystèmes, il serait utile de pouvoir :

- i) Tester une plus large gamme de produits insecticides sur les deux espèces MEAM1 et MED-Q, et ainsi pouvoir avoir les spectres différentiels de résistance vis-à-vis des molécules insecticides usitées ;
- ii) Cibler des sites où les populations de MED-Q ont été retrouvées en sympatrie avec du MEAM1, et faire un suivi de cette dynamique tout au long d'un cycle de culture complet. Il sera alors possible d'évaluer si cette dominance MEAM1/MED-Q perdure au cours du temps, ou bien si elle fluctue en fonction de la pression des traitements insecticides et des conditions abiotiques ;
- iii) Etudier en milieu semi-contrôlé les capacités de remplacement de MEAM1/MED-Q et IO sans pression insecticide, afin d'essayer de comprendre l'absence de MED-Q en dehors des agrosystèmes, ou encore la faible fréquence du MEAM1 dans ces zones. En fonction des résultats obtenus, des hypothèses liées à la pression des ennemis naturels (parasitoïdes ou prédateurs) dans ces zones pourraient être avancées (un exemple : des phénomènes de compétition par interférence induits par ces auxiliaires) ;
- iv) Réaliser de la sélection expérimentale sur l'espèce IO, afin de voir si cette espèce est capable d'acquérir des allèles de résistance et si oui en combien de générations ;
- v) Suivre dans le temps l'évolution de la distribution du MED-Q.

De même, au cours de cette thèse, nous n'avons finalement pas pu trancher sur le fait que les deux espèces invasives seraient ou non arrivées avec leurs résistances, et que la pression

insecticide des agrosystèmes de La Réunion aurait permis de conserver ces résistances (ou de les faire apparaître). Il serait intéressant de tester certaines idées comme :

- i) Analyser des populations anciennes (en collection au laboratoire) datant des années 2001-2008, pour voir si la résistance aux pyréthriinoïdes était déjà fixée chez MEAM1,
- ii) Réaliser un échantillonnage dans 4 à 5 ans et vérifier si la distribution des mutations aux pyréthriinoïdes est stable dans les populations de MEAM1 et MED-Q.

Finalement, l'hybridation interspécifique incomplète observée n'a pas démontré son rôle dans l'acquisition d'allèles de résistance pour l'espèce IO. Toutefois, l'inverse a été observé chez un très faible nombre d'individus rétrocroisés MEAM1. Cependant, ces observations ont été faites sur un faible nombre d'hybrides. Ainsi il serait intéressant :

- i) D'obtenir davantage d'hybrides, de tester leur *fitness* et leur résistance à divers insecticides ;
- ii) De poursuivre le suivi des populations pour voir si des hybrides interspécifiques de première génération sont encore trouvés. Dans cette optique, la mutation située dans l'intron et spécifique aux espèces IO et MED-Q, pourrait être un bon marqueur de l'hybridation, même lorsque les populations seraient rétrocroisées sur de nombreuses générations.