

Bilan : Plan de surveillance 2018

Acyrtosiphon pisum sur pois protéagineux / résistance aux pyréthrinoïdes

Objectif : Mise au point d'une méthode pour rechercher une résistance liée à une modification de la cible

Rédacteurs : Séverine Fontaine, Laëtitia Caddoux, Benoit Barrès

Contexte

Le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum*, est un parasite majeur des légumineuses cultivées ou sauvages. Il est responsable de dégâts directs (avortement de fleurs, diminution du poids des grains) et de dégâts indirects, via la transmission d'une trentaine de viroses. Avec le retrait des néonicotinoïdes, la lutte chimique contre ce ravageur repose désormais uniquement sur l'utilisation de produits phytosanitaires à base de substances actives de la famille des pyréthrinoïdes. Ceci accroît le risque de développement de résistance vis-à-vis de cette famille d'insecticides. Le mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes le plus répandu chez les insectes repose sur une modification de la cible de l'insecticide : le canal sodium. La mutation, dite *kdr* (knockdown resistance), affecte le codon 1014 du canal sodium. Elle est responsable de la substitution d'une leucine par une phénylamine (mutation L1014F). Cette mutation a été détectée chez de nombreuses espèces d'insectes (Rinkevich *et al.*, 2013) dont des pucerons. Dans un contexte où le risque de développement de la résistance aux pyréthrinoïdes est accru, le développement d'une méthode permettant d'identifier l'allèle *kdr* chez l'espèce *A. psium* apparaît essentiel.

Matériels et Méthodes

1) Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés selon les modalités décrites dans la fiche de prélèvement (Annexe 1). Le nombre de prélèvements à réaliser par région a été défini dans l'Annexe 3 de l'instruction technique **DGAL/SDQSPV/2018-21**. En 2018, Le plan de surveillance prévoyait l'analyse de quatre prélèvements provenant de deux régions différentes. Seul deux prélèvements ont été reçus au laboratoire. (cf. Figure 1).

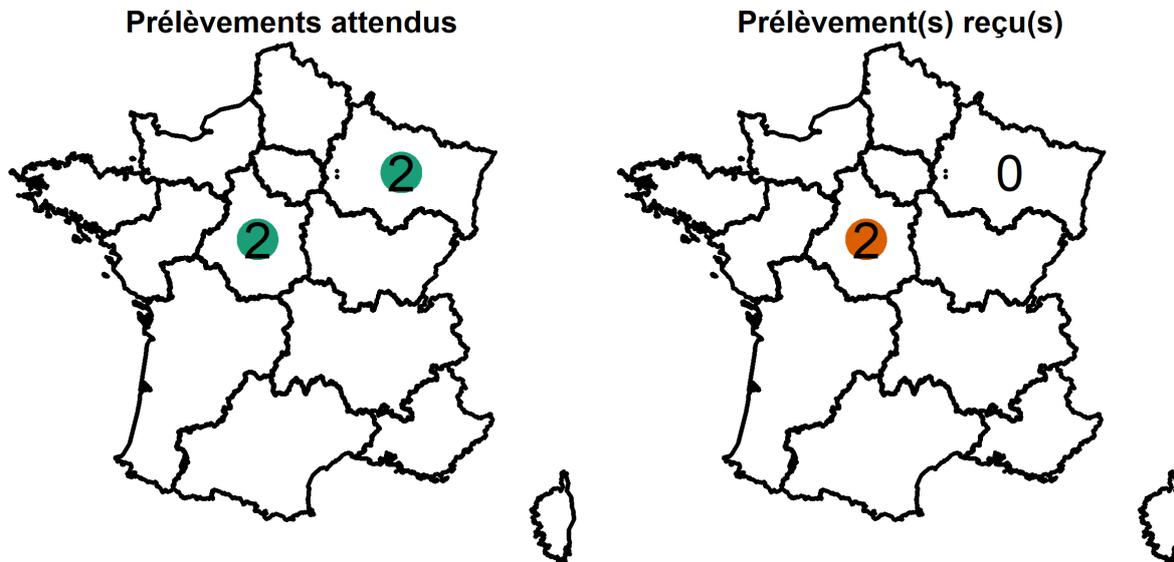


Figure 1 : Répartition des prélèvements prévus et reçus en fonction des régions.

2) Protocole de test

La méthode développée avait pour objectif le séquençage partiel du gène du canal sodium de *A. pisum*. Des essais de séquençage de la portion du gène du canal sodium comprenant le codon 1014 ont été réalisés dans un premier temps sur un clone de laboratoire aimablement donné par le laboratoire BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions) une unité mixte de recherche entre INSA de Lyon et l'INRA. Différents couples d'amorces ont été dessinés et testés en fonction de séquences d'ADN du gène de canal sodium présents dans des bases de données. *In fine*, le couple d'amorces obtenues permet le séquençage d'une portion du canal sodium d'environ 500pb qui contient trois codons (918, 932 et 1014) connus pour être impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez d'autres pucerons. Les produits PCR obtenus ont été séquencés (méthode Sanger) et les séquences ont été analysées et comparées à la séquence de référence obtenue avec le clone de laboratoire à l'aide du logiciel BioEdit (Figure 2).

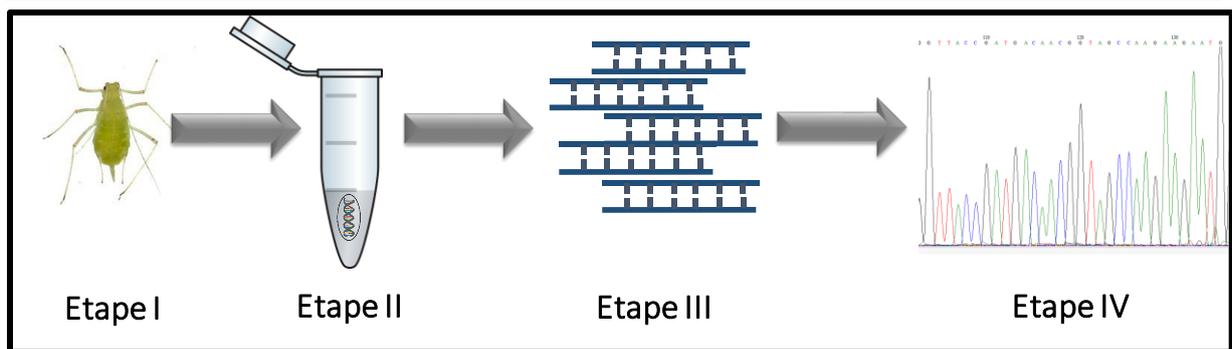


Figure 2 : Représentation des principales étapes du protocole de recherche d’une résistance aux pyréthrinoïdes liée à la modification de la cible de l’insecticide. Etape I : échantillonnage du puceron dans le prélèvement reçu- Etape II : extraction de l’ADN du puceron – Etape III : amplification d’une portion du gène du canal sodium susceptible de contenir des mutations impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes – Etape IV : séquençage de l’ADN et analyse par comparaison à la séquence de référence pour identifier d’éventuelles bases mutées.

Résultats et Interprétations

1) Résultats du plan

A l’arrivée au laboratoire, 30 pucerons ont été prélevés puis analysés pour chacun des deux prélèvements reçus (Annexe 2). Chez l’ensemble des pucerons analysés, aucune mutation n’a été détectée au niveau des trois codons connus pour être impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes (918, 932 et 1014).

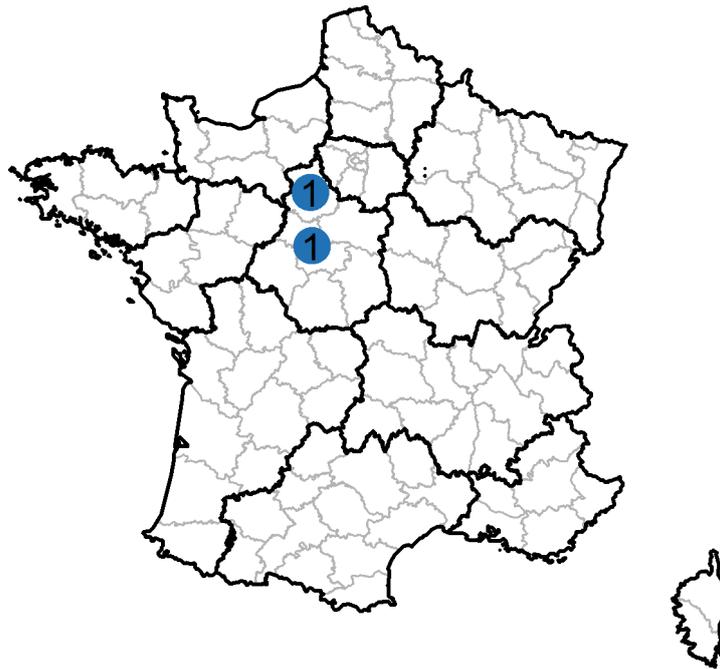


Figure 3 : Cartes des résultats de la recherche de mutation(s) liée(s) à la résistance aux pyréthriinoïdes chez *A. pisum*. La couleur bleue représente les prélèvements dans lesquels aucune résistance n’a été détectée. La couleur rouge représente les prélèvements dans lesquels une résistance a été détectée selon le protocole utilisé. L’aire des camemberts est proportionnelle au nombre de prélèvements reçus. Celui-ci est indiqué à l’intérieur de chaque camembert.

2) Interprétation

Le très faible nombre de prélèvements reçus et d’échantillons testés ne permettent pas de faire d’interprétation quant à la situation de la résistance d’*A. pisum* vis-à-vis des pyréthriinoïdes en France. Aucune des mutations déjà identifiées (y compris chez d’autres espèces de pucerons) n’a été détectée. D’autres mécanismes de résistance pourraient toutefois être impliqués.

Conclusions

L’objectif du plan pour cette thématique en 2018 visait à développer une méthode d’analyse pour détecter la résistance de cible impliquant la mutation dite *kdr* chez *A. pisum*. La méthode

développée permet également de génotyper deux autres codons connus (918, 932) pour être impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez d'autres pucerons. La méthode a pu être validée sur des prélèvements du terrain. Aucune mutation impliquée dans la résistance aux pyréthrinoïdes n'a été détectée dans les pucerons provenant du terrain. Les populations analysées ne présentent donc pas de résistance aux pyréthrinoïdes liée à une modification de la cible. Il est néanmoins impossible d'exclure l'existence d'une résistance aux pyréthrinoïdes impliquant un autre mécanisme (comme par exemple une résistance non liée à la cible) qui ne peut être mis en évidence avec la méthode utilisée.

Partenaires

Nous remercions Marc Delos, expert national grandes cultures, Jacques Grosman, expert national vigne et animateur du réseau des experts nationaux de la protection des végétaux et la FREDON et la Chambre régionale d'agriculture Centre-Val de Loire pour la réalisation et l'envoi des prélèvements.

Référence(s) citée(s)

Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide biochemistry and physiology*, 106(3), 93-100.

Instruction technique : DGAL/SDQSPV/2018-21 :

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2018-21>

Date de validation / dernière édition : 27/01/2020

Annexe(s)

Annexe 1 : Fiche de prélèvement

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Acyrtosiphon pisum / Pois protéagineux / pyréthriinoïdes

Objet : Identifier, chez *Acyrtosiphon pisum*, des phénomènes de résistances aux pyréthriinoïdes par des méthodes de tests biomoléculaires.

Choix des parcelles : Les prélèvements sont à réaliser dans des parcelles où il existe une pression de sélection aux substances actives de la famille des **pyréthriinoïdes**. Le nombre de prélèvements par région est précisé dans l'annexe 3 de la Note de Service **DGAL/SDQSPV/2018-21**.

Période(s) de prélèvement : dès le début du printemps jusqu'au « jaunissement de la culture »

Collecte :

Un prélèvement est constitué comme suit

- 40 à 50 feuilles de pois protéagineux porteuses d'*Acyrtosiphon pisum* provenant de 40 à 50 plants différents répartis sur la parcelle
- Ne pas prélever de feuilles humides
- Faire les prélèvements délicatement car les pucerons se laissent facilement tomber lorsqu'ils sont dérangés

Conditionnement :

- Empiler les feuilles pliées sur elle-même les unes sur les autres en intercalant régulièrement du papier absorbant.
- Envelopper le tout dans du papier absorbant et placer le prélèvement dans un sachet plastique fermé bien hermétiquement (type zip)
- Regrouper ensemble les sachets contenant les feuilles d'une même parcelle dans un carton rigide
- Conserver les sachets dans une glacière puis au réfrigérateur jusqu'à l'envoi

Expédition :

- Compléter la fiche pour chaque prélèvement de manière exhaustive
- Joindre cette fiche au prélèvement
- Envoyer par Chronopost les échantillons le plus rapidement possible après le prélèvement, **en début de semaine** (du lundi au mercredi)
- Prévenir le laboratoire par courriel juste avant l'envoi (severine.fontaine@anses.fr et laetitia.caddoux@anses.fr)

ANSES LYON - Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires

Secteur Biologie Moléculaire

31 avenue Tony Garnier – 69364 LYON Cedex 07

Tél : 04.78.72.65.43 (standard) – 04.78.69.68.37 (ligne directe)

Fax : 04.78.61.91.45

Annexe 2 : Liste et caractéristiques des prélèvements reçus

Référence échantillon Anses	Référence échantillon Expéditeur	Expéditeur	Commune prélèvement	Date de prélèvement
18-0079	18-28-001	Fredon Centre-Val de Loire	Damarie	18/05/2018
18-0080	18-41-002	Fredon Centre-Val de Loire	Saint Laurent en Beauce	22/05/2018