

# Résistance du puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginae*) vis-à-vis des néonicotinoïdes

## Plan de surveillance 2016

### RESUME

Cette étude vise à rechercher un allèle impliqué dans la résistance de cible à la famille des néonicotinoïdes chez les pucerons. Le mécanisme de résistance recherché est lié à une mutation sur la sous unité  $\beta$  du récepteur nicotinique entraînant la substitution d'une arginine (Arg ou R) par une thréonine (Thr ou T) en position 81 (mutation R81T).

En 2016, 10 prélèvements ont été reçus et analysés. Les prélèvements provenaient des régions Aquitaine (1), Centre (1), Basse-Normandie (1), Languedoc-Roussillon / Midi-Pyrénées (3), Provence-Alpes-Côte-D'azur (4) et Rhône-Alpes/ Auvergne (1).

**L'allèle de résistance R81T, impliquée dans la résistance aux néonicotinoïdes chez *M. persicae*, n'a pas été détecté chez les 101 individus testés provenant de 10 parcelles différentes**

Mots clés : *Dysaphis plantaginae*, néonicotinoïdes, mutation R81T, résistance

## I. Rappel du contexte

Ce bilan concerne le plan de surveillance national 2016 de la DGAL : « Résistances de *Dysaphis plantaginea* aux néonicotinoïdes ». L'objectif était d'une part, d'acquiescer la méthode en test biologique afin de définir la sensibilité de base et, d'autre part, de rechercher en biologie moléculaire une mutation affectant la cible des néonicotinoïdes. Cette mutation affecte la sous unité  $\beta$  du récepteur nicotinique et entraîne la substitution d'une arginine (Arg ou R) par une thréonine (Thr ou T) en position 81 (mutation R81T). Cette mutation a déjà été identifiée comme étant impliquée dans la résistance aux néonicotinoïdes chez deux autres espèces de pucerons : *Myzus persicae* (Bass *et al.*, 2011) et *Aphis gossypii* (Hirata *et al.*, 2015). Cet allèle n'a jamais été identifié chez *D. plantaginea*, mais la conservation du gène entre espèces permet d'espérer que la même mutation provoquerait les mêmes effets. En l'absence de tests biologiques au point, cette méthode permet *a minima* de savoir si l'allèle est présent dans les populations testées.

Le plan de surveillance visait à détecter une éventuelle émergence de résistance au **néonicotinoïdes**. Les prélèvements ont été réalisés sur des parcelles où il existe une suspicion de résistance aux substances actives de la famille des néonicotinoïdes.

## II. Description brève de la méthode utilisée en biologie moléculaire

En 2015, une méthode de biologie moléculaire, existante chez *Myzus persicae* pour détecter la résistance de cible aux néonicotinoïdes, liée à la mutation R81T (Bass *et al.*, 2011) sur la sous unité  $\beta$  du récepteur nicotinique, a été transférée avec succès sur *Dysaphis plantaginea*.

Cette méthode repose sur un principe semblable à une **PCR RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism). Il s'agit d'effectuer une PCR en amplifiant la portion du gène susceptible de contenir la mutation recherchée et d'effectuer ensuite une digestion enzymatique permettant de couper soit l'allèle sauvage, soit l'allèle muté.

Dans le cas de la mutation R81T, l'allèle sauvage et l'allèle muté ne possèdent pas de site de restriction correspondant à celui d'une enzyme disponible sur le marché. Le site de restriction est donc créé, lors de la PCR, en insérant une amorce dont l'une des bases est dégénérée, c'est-à-dire qu'elle n'est pas complémentaire à celle de la séquence sauvage (initiale). Cette méthode est nommée dCAPs (derived cleaved amplified polymorphic sequences).

L'enzyme de digestion SmlI coupe le site de restriction ainsi créé sur l'allèle sauvage. Si l'allèle est muté, le site de restriction n'existera pas sur celui-ci et l'enzyme ne coupera donc pas. La taille des fragments obtenus permettra de connaître le profil de chaque individu pour la mutation R81T grâce à une migration sur gel. Les deux allèles (muté et sauvage) donneront des fragments de taille différente après digestion enzymatique, ce qui permettra de les différencier lors de la migration. Cette méthode permet de différencier les individus homozygotes des individus hétérozygotes.

## III. Echantillons analysés

Le plan de surveillance 2016 prévoyait 5 prélèvements sur des parcelles issues de 4 régions différentes. Au total, 10 prélèvements ont été reçus et ils se répartissent comme suit :

Régions	Prélèvements prévus	Prélèvements reçus
Aquitaine	1	1
Centre	1	1
Basse-Normandie	1	0
Languedoc-Roussillon/ Midi-Pyrénées	0	3
Provence-Alpes-Côte- d'Azur	1	4
Rhône-Alpes	1	1
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>10</b>

#### IV. Résultats 2016

Région	Référence échantillon Anses	Nombre d'individus testés	Nombre d'individus porteur de l'allèle R81T impliqué dans la résistance aux néonicotinoïdes chez <i>M.persicae</i> (R81T) et <i>A. gossypii</i>
Nouvelle Aquitaine	16-047	10	0
Auvergne-Rhône-Alpes	16-069	9	0
Centre	16-078	13	0
Languedoc-Roussillon/ Midi-Pyrénées	16-075	10	0
Languedoc-Roussillon/ Midi-Pyrénées	16-076	8	0
Languedoc-Roussillon/ Midi-Pyrénées	16-077	9	0
Provence-Alpes-Côte- d'Azur	16-040	7	0
Provence-Alpes-Côte- d'Azur	16-041	20	0
Provence-Alpes-Côte- d'Azur	16-043	5	0
Provence-Alpes-Côte- d'Azur	16-079	10	0

Tableau 1 : Résultats du génotypage pour R81T en fonction des prélèvements et des régions.

Aucun des 101 individus analysés, provenant de 10 parcelles différentes, ne possède la mutation R81T.

#### V. Conclusion

En 2016, une centaine de pucerons provenant de 10 parcelles a été analysée pour rechercher un allèle connu pour conférer la résistance aux néonicotinoïdes chez deux autres espèces de pucerons. Cet allèle R81T n'a pas été mis en évidence dans les échantillons de *D. plantaginea* analysés. Mais il est important de noter que ces résultats, bien qu'encourageants, ne prouvent pas que la résistance aux néonicotinoïdes, impliquant

d'autres mécanismes (par exemple une autre mutation ou des résistances métaboliques), n'existe pas dans les populations de *D. plantaginae* analysées. Pour cela, des tests biologiques doivent être mis au point et réalisés. La première étape de ce type de biotest a été initiée et réussie, à savoir la mise au point de l'élevage en laboratoire de *D. plantaginae* sur *Plantago lanceolata*.

## VI. Partenaires scientifiques et techniques

### Expert référent Résistances de la DGAL

M. Jacques Grosman – DRAAF-SRAL Rhône Alpes – 165 rue Garibaldi – BP 3202 – 69401 Lyon cedex 03 – France.

### Expert référent Arboriculture DGAL

M. Bertrand Bourgoïn – DRAAF-SRAL Midi-Pyrénées – Cité administrative – Boulevard Armand Duportal – 31074 Toulouse Cedex – France.

**Réseau des DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles de la Surveillance Biologique du Territoire** pour la participation aux prélèvements.

## VII. Bibliographie

- Bass C., Puinean AM., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul VL., Crossthwaite AJ., Denholm I., Field LM., Foster SP., Lind R., Williamson MS., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*, BMC Neuroscience. 12:51
- Hirata K, Kiyota R, Matsuura A, Toda S, Yamamoto A, Iwasa T, 2015. Association between the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor  $\beta 1$  subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid, J. Pestic Sci, 40:25–31
- Slater R., Paul VL., Andrews M., Garbay M., Camblin P., 2012. Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain, Pest Management Science. 68 : 634-638