

Bilan : Plan de surveillance 2019

Acyrtosiphon pisum sur pois protéagineux et maraicher/ résistance aux pyréthriinoïdes

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 pyréthriinoïdes. La pression de sélection exercée par les pyréthriinoïdes accroît le risque de développement de résistance. Le mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes 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 phénylalanine (mutation L1014F). Cette mutation a été détectée chez de nombreuses d'espèces d'insectes (Rinkevich *et al.*, 2013) dont des pucerons. Dans un contexte où le risque de développement de la résistance aux pyréthriinoïdes 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

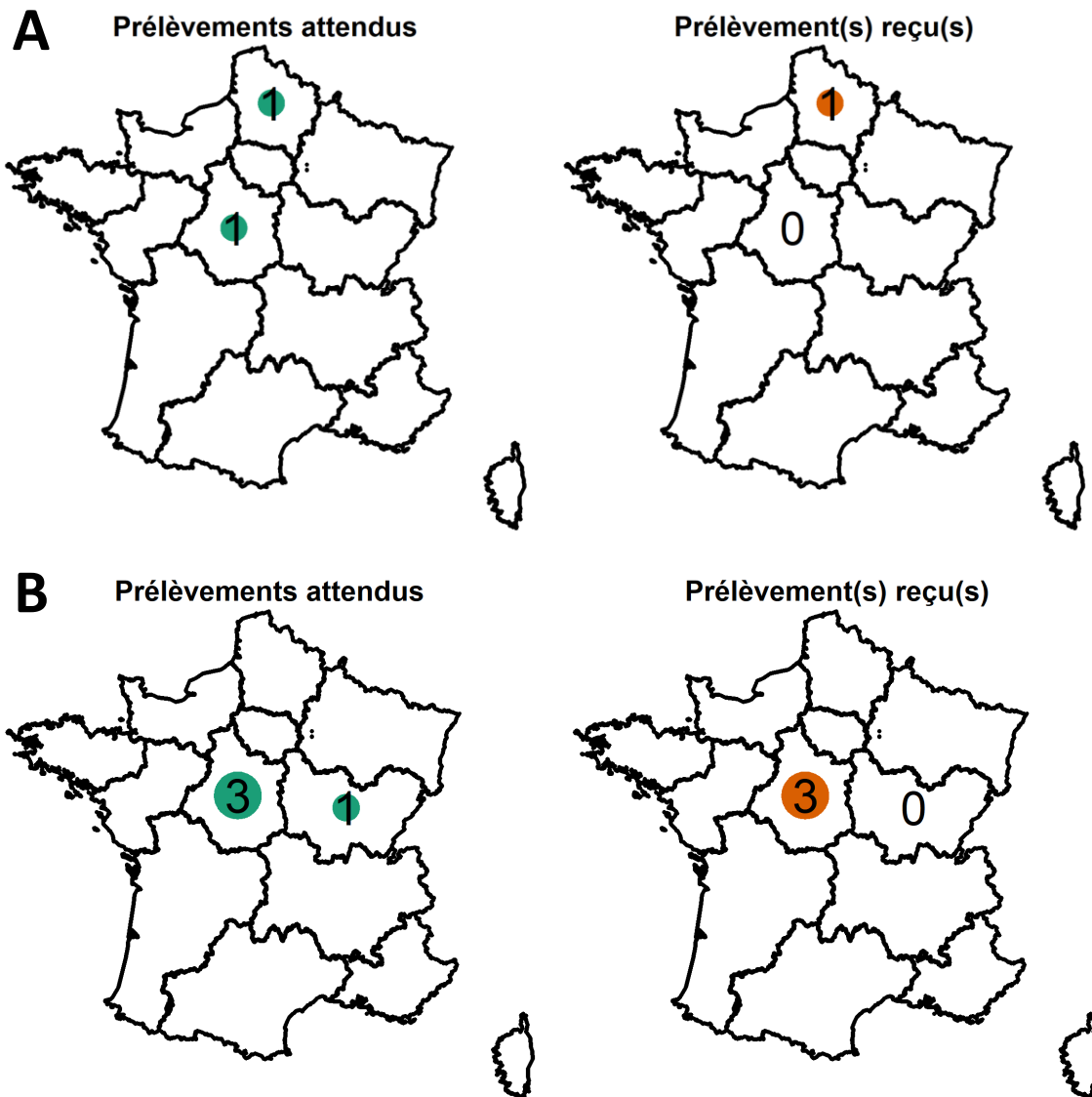


Figure 1 : Répartition des prélèvements attendus et reçus en fonction des régions. A : pour les prélèvements provenant de pois maraichers ; B : pour les prélèvements provenant pois protéagineux.

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/2019-31**. En 2019, Le plan de surveillance prévoyait l'analyse de deux prélèvements pour la région Hauts de France provenant de pois maraichers et quatre prélèvements pour la région Centre-Val de Loire (pois protéagineux). Quatre

prélèvements ont été reçus au laboratoire (cf. Figure 1) : 1 provenant de pois maraichers et 3 des pois protéagineux.

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, UMR INSA Lyon/INRAE). 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 obtenue permet le séquençage d’une portion du canal sodium d’environ 500 pb qui contient trois codons (918, 932 et 1014) connus pour être impliqués dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez d’autres espèces de pucerons. Les produits PCR obtenus ont été séquencés (par la méthode dite « 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).

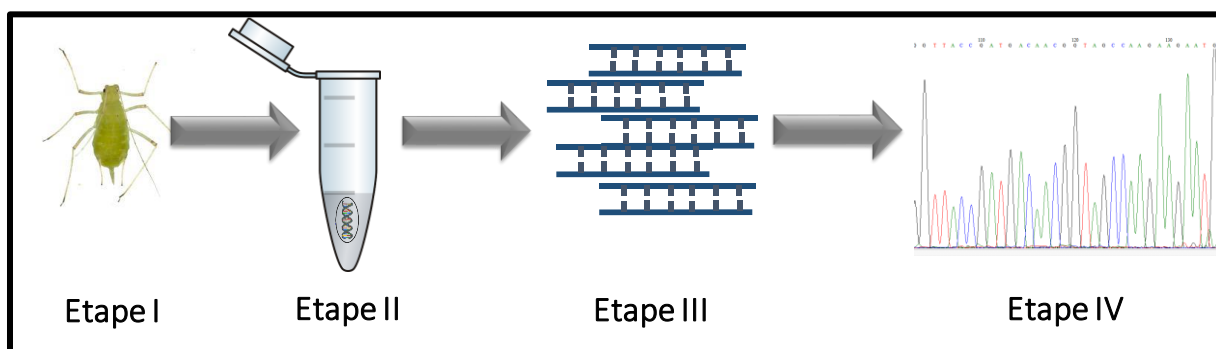


Figure 2 : Représentation des principales étapes du protocole de recherche d’une résistance aux pyréthriinoïdes liée à la modification de la cible de l’insecticide. Etape I : échantillonnage du puceron dans le prélèvement reçu- Etape II : extraction de l’ADN du puceron – Etape III : amplification d’une portion du gène du canal sodium susceptible de contenir des mutations impliquées dans la résistance aux pyréthriinoïdes – 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 et Interprétation

A l'arrivée au laboratoire, de 18 à 30 pucerons ont été prélevés puis analysés pour chacun des 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). D'autres mécanismes de résistance qui n'impliquent pas une modification de la cible pourraient toutefois être présents dans les populations. A ce jour, seul un test biologique permettrait de mettre en évidence ces mécanismes de résistance.

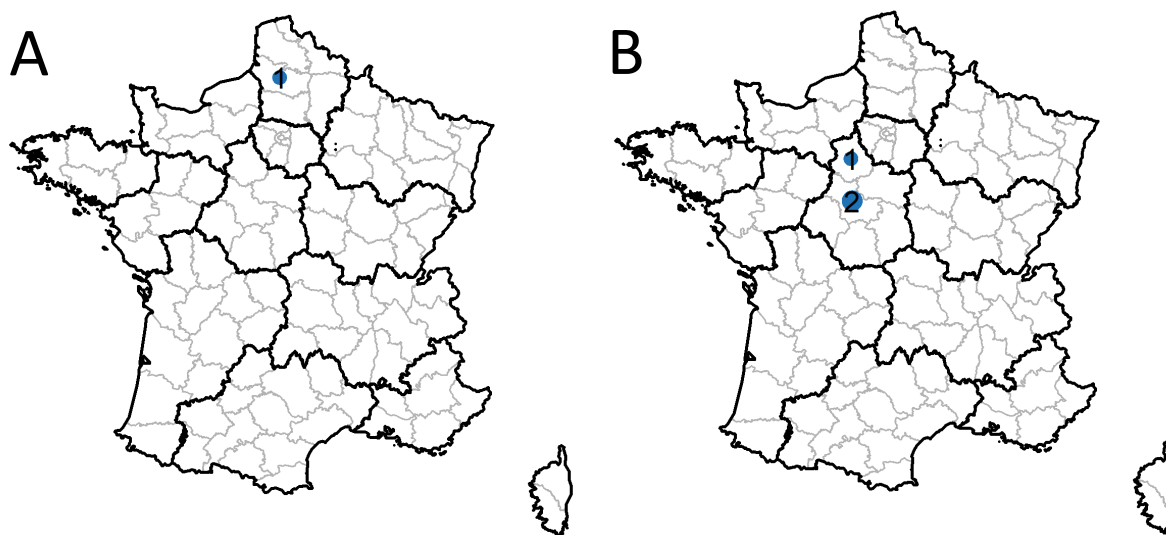


Figure 3 : Cartes des résultats de la recherche de mutation(s) liée(s) à la résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. pisum*, A : provenant de pois maraichers ; B : provenant de pois protéagineux. La couleur bleue représente les prélèvements dans lesquels aucune résistance n'a été détectée. La couleur rouge 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.

Conclusion

L'objectif du plan pour cette thématique en 2019 visait à appliquer une méthode d'analyse mise au point en 2018 pour détecter la résistance de cible impliquant la mutation dite *kdr* chez *A. pisum*. La méthode développée permet également de connaître deux autres codons (918, 932) connus 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 qui ne peut être mis en évidence avec la méthode utilisée (par exemple de la résistance par détoxification).

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/2019-31** :

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2019-31>

Date de validation / dernière édition : 05/06/2020

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/2019-31.

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)

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Acyrtosiphon pisum / Pois maraîcher / 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/2019-31.

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 maraîcher 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)

Annexe 2 : Liste et caractéristiques des prélèvements reçus

Référence ANSES	Référence Expéditeur	Organisme expéditeur	Origine prélèvement	Date prélèvement
19-0160	19-41-001	FREDON CENTRE VAL DE LOIRE SITE ORLEANS	BEAUCE LA ROMAINE	15-mai-19
19-0161	19-41-002	FREDON CENTRE VAL DE LOIRE SITE ORLEANS	BEAUCE LA ROMAINE	15-mai-19
19-0163	19-28-003	FREDON CENTRE VAL DE LOIRE SITE ORLEANS	MARBOUE	20-mai-19
19-0190	19-80-001	U.N.I.L.E.T. UNION NATIONALE INTERPROFESSIONNELLE LEGUMES TRANSFORMES	GRIVILLERS	19-juin-19