

Résistance du puceron vert de pêcher (*Myzus persicae*) *vis-à-vis des néonicotinoïdes* Surveillance sur Pêcher

PLAN DE SURVEILLANCE 2013

Diffusion : Juin 2014

Introduction et mise en garde de la DGAL :

Ce bilan a été réalisé par l'Anses suite à l'analyse des échantillons prélevés dans le cadre du réseau national de surveillance biologique du territoire auquel participent les partenaires engagés dans l'axe 5 du plan Ecophyto. Ce bilan contribue au rapport national sur la surveillance biologique du territoire remis au Parlement conformément aux dispositions du Code Rural. Ce bilan a vocation à être diffusé largement au sein du réseau de partenaires de la surveillance biologique du territoire.

Les plans de surveillance « résistance » sont intégrés dans le volet « suivi des Effets Non Intentionnels » du dispositif national de surveillance biologique du territoire (axe 5 du plan Ecophyto). Ils concourent à l'analyse de risque phytosanitaire et au suivi des mécanismes de résistance, contribuant ainsi à l'objectif de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.

Ces plans de surveillance constituent un outil d'alerte pour la DGAL. C'est dans cet objectif que sont définis le nombre d'échantillons et la nature des parcelles et/ou pratiques de traitements recherchées dans chaque région (Note de service DGAL/SDQPV/N2013-8086 du 15 mai 2013). Ces programmes sont construits pour une lecture nationale principalement, et ils contribuent globalement à l'amélioration des suivis post-AMM.

Pour les professionnels, la valorisation de ces résultats s'effectue essentiellement au travers des notes communes nationales (ex: mildiou et oïdium de la vigne, tavelure du pommier, sclerotinia du colza...).

Cette source d'information doit être complétée par les résultats des essais « résistances » et des monitoring pilotés par d'autres opérateurs.



RÉSUMÉ

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

Ce bilan ne fait état que des résultats obtenus sur des populations de *Myzus persicae* prélevées sur Pêcher. Pour cette culture, en 2013, seules 3 parcelles ont été analysées. Elles provenaient toutes de la région Rhône-Alpes. Sur les 113 individus testés, 18,6 % se sont avérés homozygotes sensibles, 27,4 % homozygotes résistants et 54 % hétérozygotes. Ces derniers présentent un niveau de résistance qui est moins élevé que chez les pucerons homozygotes résistants, et, de ce fait, l'impact de la présence de ces individus hétérozygotes sur l'efficacité des traitements ne peut être clairement déterminé. Cependant, la fréquence de l'allèle de résistance observée au sein des populations étudiées (de 52,9 à 54,9%) est problématique. En effet, cela représente une réserve d'allèle muté importante qui pourrait conduire rapidement, compte tenu des capacités de recombinaisons génétiques de ce puceron, à une augmentation des individus homozygotes résistants, notamment dans des conditions de pression de sélection néonicotinoïdes.

Mots-clés : *Myzus persicae*, néonicotinoïdes, mutation R81T, résistance

I. Rappel du contexte

Dans le cadre du plan de surveillance national 2013 de la DGAL « RESISTANCES *Myzus persicae* sur PECHER », les prélèvements ont été réalisés dans **des parcelles où une inefficacité de traitement avec des substances actives (telles qu'imidaclopride, thiaclopride, acétamipride...) a été observée**. Le nombre de prélèvements prévus par région est précisé dans l'annexe 1 de la Note de Service « DGAL/SDQPV/N2013-8086 » du 15/05/2013, soit 4 parcelles en Languedoc Roussillon, 4 en région PACA et 4 en Rhône-Alpes. En fait, seuls des prélèvements sur trois parcelles de pêcher, provenant toutes de la région Rhône-Alpes, ont été reçus au laboratoire et analysés.

II. Description brève de la méthode utilisée

Tous les individus ont été analysés pour rechercher une résistance de cible aux néonicotinoïdes liée à la mutation R81T (Bass *et al.*, 2011) sur la sous unité β du récepteur nicotinique, qui entraîne la substitution d'une arginine (Arg ou R) par une thréonine (Thr ou T). La méthode de PCR dCAPS utilisée pour la recherche de cette mutation a été mise au point par l'unité RPP en 2012.



Cette méthode repose sur le principe d'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. Mais dans le cas de la mutation R81T, l'allèle sauvage et l'allèle muté ne possèdent pas de site de restriction qui corresponde 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 n'agira 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. Cette méthode permet de différencier les individus homozygotes des individus hétérozygotes.

III. Résultats 2013

Le tableau 1 et la figure 1 présentent les résultats et la cartographie obtenus à partir des échantillons analysés en 2013.

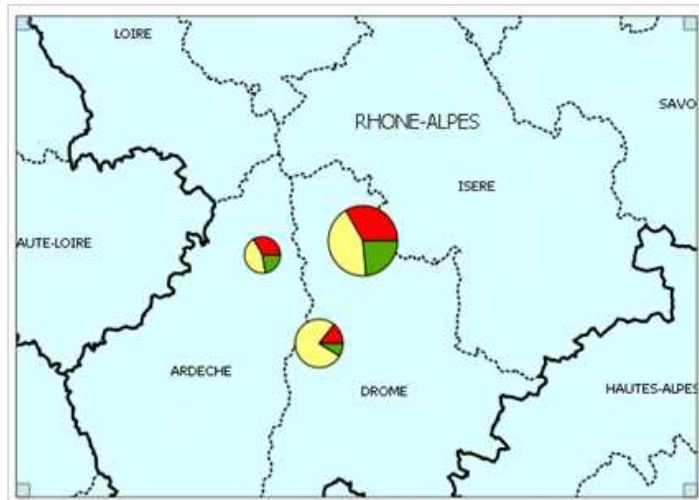
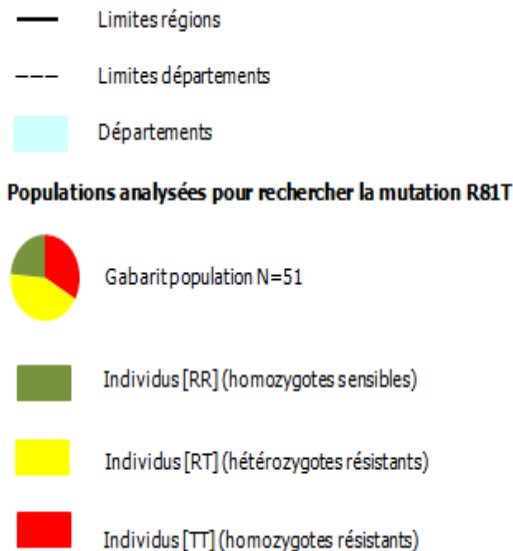
Tableau 1 : Répartition des différents génotypes pour la mutation R81T dans les trois vergers de pêcher testés en 2013

Référence Anses	Référence expéditeur	% d'individus homozygotes sensibles	% d'individus hétérozygotes résistants	% d'individus homozygotes résistants	Fréquence allélique de l'allèle de résistance
13-001	13-RA-26-01	23,5%	43,1%	33,3%	54,9%
13-011	13-RA-26-02	22,2%	44,4%	33,3%	55,6%
13-027	13-RA-26-03	8,6%	77,1%	14,3%	52,9%

Les trois parcelles présentent toutes une majorité d'individus hétérozygotes RS (43,1 % à 77,1 %) et une minorité d'individus homozygotes sensibles SS (8,6 % à 23,5 %). Quelle que soit la parcelle, les individus homozygotes résistants RR (14,3 % à 33,3 %) sont plus nombreux que les individus homozygotes sensibles SS.

La fréquence allélique de la mutation R81T, supérieure à 50% dans les trois parcelles, montre une importante dispersion de la mutation au sein de ces populations de *Myzus persicae*.

Figure 1 : Cartographie présentant les différents génotypes pour la mutation R81T chez 113 individus de *Myzus persicae* provenant de trois vergers de pêcher en 2013



Enfin, si l'on considère l'ensemble des 113 individus testés (toutes parcelles confondues), 54,0 % (n=61) s'avèrent hétérozygotes RS et 27,4 % (n=31) sont homozygotes résistants RR ce qui signifie que 81,4 % des pucerons analysés sont porteurs de la mutation R81T. Chez les pucerons hétérozygotes, le niveau de résistance lié à la présence de cette mutation serait faible à modéré (Bass *et al.*, 2011 ; Fontaine *et al.*, données non publiées) tandis que, pour les homozygotes résistants, le niveau s'avère très élevé (Bass *et al.*, 2011 ; Slater *et al.*, 2012). Les autres pucerons (18,6 % soit 21 individus) sont homozygotes sensibles SS. Ils ne présentent pas la mutation R81T et sont *a priori* sensibles aux néonicotinoïdes. Mais, des tests biologiques réalisés sur certains clones SS ont montré une certaine hétérogénéité de la mortalité face aux différents produits néonicotinoïdes testés. Les valeurs de Facteur (ou Niveau) de Résistance (FR) obtenus s'avèrent faibles à moyens pour ces clones (Fontaine *et al.*, en cours de rédaction). Aussi, l'existence d'une résistance de type métabolique ne peut pas être exclue dans ces populations, même chez les pucerons ne possédant pas l'allèle de résistance de cible aux néonicotinoïdes.

IV. Comparaison des résultats 2012/2013

En 2012, trois parcelles de pêcher avaient déjà été analysées vis à vis de cette mutation R81T, également en Rhône-Alpes et l'une d'entre elles fait partie des trois parcelles échantillonnées en 2013 (tableau 2). Cette parcelle a reçu deux traitements chaque année depuis au moins 2011 avec des produits de type néonicotinoïdes.

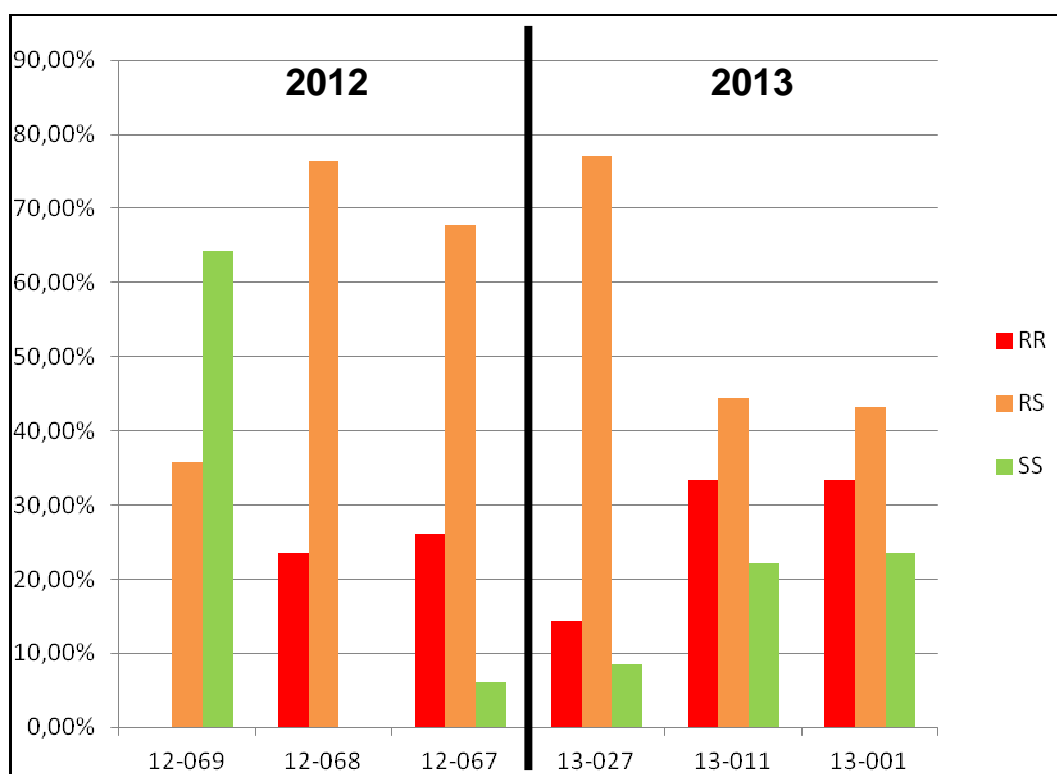
Entre deux années consécutives sur cette même parcelle, les données obtenues semblent témoigner d'une apparente augmentation (modérée) des profils génétiques hétérozygotes RS, au détriment, semble-t-il, des profils homozygotes résistants RR. Mais le nombre d'individus analysés était pratiquement deux fois moindre en 2013 qu'en 2012 et

l'analyse statistique ne montre pas d'évolution significative ($p = 0.3817$, test de Fisher) des trois profils génétiques entre les deux années.

Tableau 2 : Répartition des différents génotypes pour la mutation R81T en 2012 et 2013 dans le même verger

Année de prélèvement	Référence de la parcelle selon l'année	nombre d'individus analysés	% d'individus homozygotes sensibles	% d'individus hétérozygotes résistants	% d'individus homozygotes résistants
2012	12-067	65	6,2%	67,7%	26,2%
2013	13-027	35	8.6%	77,1%	14.3%

D'un point de vue plus général, si l'on considère l'ensemble des cinq parcelles analysées en 2012 et 2013 (figure 2), les éléments essentiels qui apparaissent sont la prédominance des individus hétérozygotes et la présence d'individus homozygotes résistants dans une proportion variant entre 15 et 30%. Une seule parcelle (n°12-069) fait exception, avec une majorité d'individus homozygotes sensibles SS et aucun homozygote résistant.





V. Conclusions

L'allèle de résistance recherché est présent dans toutes les populations de *M. persicae* prélevées sur pêcher en Rhône-Alpes. La majorité des individus analysés s'avère être hétérozygote pour cet allèle. Le niveau de résistance chez ce type d'individu hétérozygote est moins élevé comparé au niveau de résistance des individus homozygotes résistants (mais ces individus hétérozygotes pourraient posséder aussi des mécanismes de détoxification qui renforceraient leurs capacités de résistance).

La fréquence allélique de la mutation R81T, supérieure à 50% dans notre échantillonnage, indique qu'il existe une réserve importante de cet allèle de résistance dans les populations étudiées. Aussi, du fait de l'existence de recombinaisons génétiques avérées dans les populations vivant sur pêcher, il est évident que cette situation constitue un risque important et que ces réserves d'allèle muté peuvent conduire rapidement (notamment dans des conditions de pression de sélection) à l'augmentation du taux d'individus homozygotes dont la résistance très élevée aux néonicotinoïdes est démontrée.

En conclusion, cette étude montre une situation inquiétante pour la lutte contre *Myzus persicae* dans les cultures de pêcher échantillonnées. L'analyse d'échantillons provenant d'autres régions que la région Rhône Alpes aurait été souhaitable afin de compléter le plan de surveillance déjà réalisé sur ce thème l'année précédente.

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 de la 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 (axe 5 du plan Ecophyto) 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 β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*, BMC Neuroscience. 12:51



- 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

ANNEXE

PLAN DE SURVEILLANCE

Myzus persicae / Pêcher / Néonicotinoïdes

Résultats détaillés par prélèvement

Référence Anses	Référence expéditeur	Région	nombre d'individus analysés	nombre d'individus homozygotes sensibles	nombre d'individus hétérozygotes résistants	nombre d'individus homozygotes résistants
13-001	13-RA-26-01	Rhône-Alpes	51	12	22	17
13-011	13-RA-26-02	Rhône-Alpes	27	6	12	9
13-027	13-RA-26-03	Rhône-Alpes	35	3	27	5