

PCR allèle spécifique : mise au point et application au génotypage SNP chez le thrips californien.

Jérôme OLIVARES¹ et Myriam SIEGWART¹

Jérôme OLIVARES



Technicien dans l'unité Plantes et Systèmes de cultures Horticoles d'Avignon (UR1115-PSH), en charge de la gestion des activités de biologie moléculaire de l'unité, particulièrement celles ciblant les populations d'insectes ravageurs des cultures ainsi que de leurs ennemis naturels : détection et identification moléculaire d'insectes, génotypage microsatellites ou SNP.

Myriam SIEGWART



Ingénieure d'étude dans l'unité Plantes et Systèmes de cultures Horticoles d'Avignon (UR1115-PSH), porteuse de projets de recherche sur la thématique des résistances d'insectes aux (bio)insecticides. Ces recherches s'étendent de l'analyse des populations résistantes à l'étude des mécanismes moléculaires en cause dans ces phénomènes adaptatifs.

Résumé. Nous présentons une technique d'extraction d'ADN adaptée aux très petits échantillons tel que le thrips californien ainsi que la mise au point et le génotypage par PCR allèle spécifique de la mutation G275E de la sous unité $\alpha 6$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine impliqué, chez ce ravageur, dans la résistance à un insecticide biologique : le Spinosad. Le double objectif de cette technique est de pouvoir génotyper rapidement,

¹ UR115 Plantes et Systèmes de cultures Horticoles, INRAE, Site Agroparc, 84914 Avignon jerome.olivares@inrae.fr (auteur référent)

économiquement et individuellement des insectes à peine visibles à l'œil nu et ce faisant, pouvoir établir la carte de distribution de la mutation G275E dans les populations françaises de *Frankliniella occidentalis*.

Mots clés : PCR, allèle spécifique, SNP, extraction d'ADN, génotypage, thrips, *Frankliniella occidentalis*.

Abstract. In this study we present a technique of ADN extraction adapted to very small samples like the californian thrips as well as the implementation and the genotyping by allele-specific PCR of G275E of the sub-unit $\alpha 6$ of the nicotine receptor of the studied acetylcholine, from this pest, in the resistance to a biological insecticide : Spinosad. The double objective of this technique is to be able to genotype rapidly, economically and individually insects that are very difficult to see and to be able to create a distribution map of the G275E among French population of *Frankliniella occidentalis*.

Keywords : PCR, allele-specific, SNP, ADN extraction, genotyping, thrips, *Frankliniella occidentalis*

Introduction

Le thrips californien *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) est actuellement le thrips le plus ravageur dans les cultures sous serre (Plate-forme INRAE d'épidémiologie Ephytia) légumières ou horticoles (poivrons, aubergines, plantes ornementales...). La mutation G275E de la sous unité $\alpha 6$ du récepteur nicotinique de l'acétylcholine a été décrite comme étant responsable de la résistance observée de ce ravageur au Spinosad (Puinean *et al.*, 2013). Depuis quelques années, en France, les traitements au Spinosad rencontrent des échecs notables dans la protection des cultures horticoles, nous avons donc décidé d'analyser la présence, la fréquence et la distribution de cette mutation au sein des populations françaises de thrips californien. Un test RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) étant impossible à cause de l'absence de site de digestion au niveau du point de mutation (SNP) et les coûts de génotypage par séquençage prohibitifs, nous avons décidé de génotyper cette mutation par PCR allèle spécifique. Nous nous sommes d'abord tournés vers une solution commerciale standard comprenant une extraction sur colonne (Qiagen) et un kit de génotypage de SNP par « Kompetitive allele specific PCR » (KASP™, LGC Biosearch Technologies). Un thrips mesure de 1 à 2 mm de long, nous nous sommes donc rendu compte très vite que cette taille ne permettait pas d'obtenir la quantité minimale d'ADN requise pour obtenir un génotypage à l'échelle de l'individu. Nous avons donc décidé de mettre au point une technique d'extraction d'ADN et de génotypage économique et adaptée à la taille de nos échantillons. L'objectif final étant de pouvoir faire l'état des lieux de la distribution de cette mutation chez ce ravageur dans le cadre du réseau de Surveillance Biologique du Territoire (<https://agriculture.gouv.fr/rapport-annuel-de-surveillance-biologique-du-territoire>).

Principe

La technique de la PCR Allèle Spécifique a été décrite à la fin des années 80 (Okayama *et al.*, 1989) et s'appuie sur le fait qu'une Taq polymérase a besoin d'avoir une amorce avec une extrémité 3' hybridée pour avoir un maximum d'efficacité, en cas de mismatch l'efficacité de la PCR peut se voir diminuer par un facteur 100 en fonction de la composition du mismatch (Kwok *et al.*, 1990), cet effet peut être amplifié de manière synergique en introduisant un mismatch supplémentaire à l'avant-dernière position 3' (Glaab *et al.*, 1999).

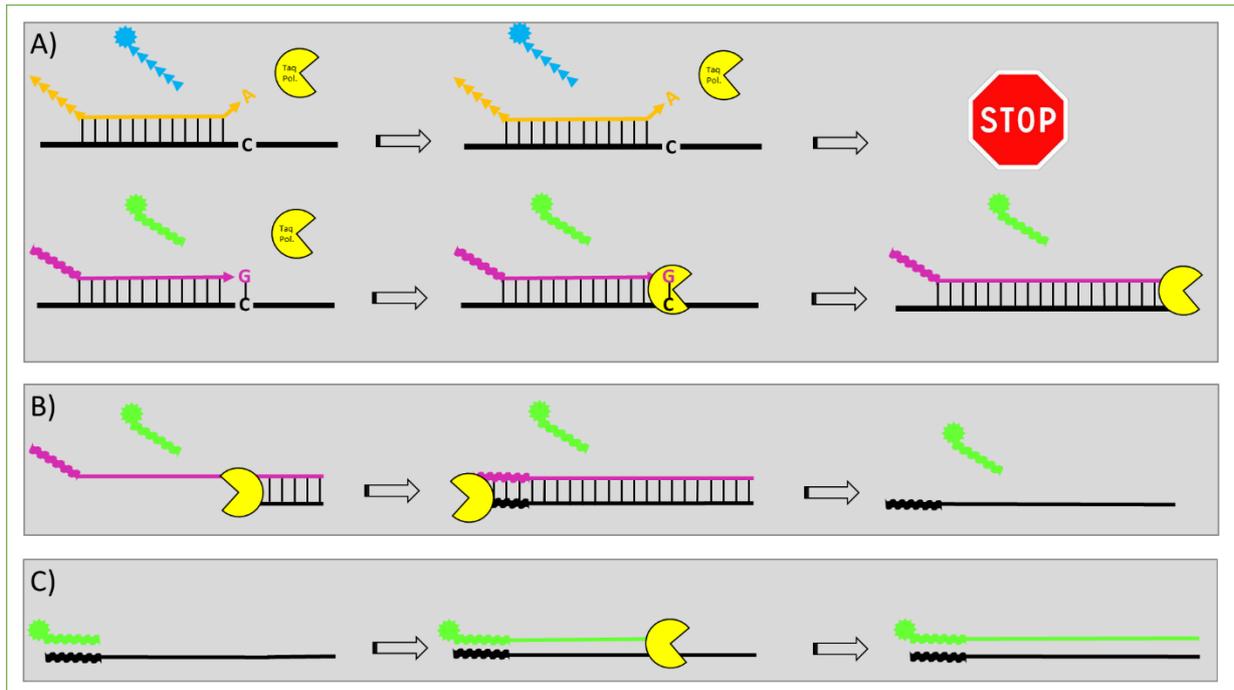
L'idée est donc de réaliser une PCR avec trois amorces : une amorce sens dont l'extrémité 3' matche avec le génotype sauvage de notre SNP, une amorce sens qui matche le génotype mutant et une amorce anti-sens commune aux deux premières. Les deux amorces sens entrent donc en compétition sur le même site d'hybridation mais seule celle dont l'extrémité 3' est parfaitement hybridée va initier une amplification et générer un produit PCR. En utilisant des amorces sens marquées avec un fluorochrome, on peut déterminer quelle amorce est à l'origine

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (103)

de l'amplification et donc le génotype de l'échantillon.

Par souci d'économie, nous avons décidé d'utiliser la méthode de marquage par queue M13 décrite par Schuelke (2000) en l'adaptant à notre besoin : les amorces spécifiques sont additionnées chacune d'une queue M13 spécifique en 5', cette même queue M13 est aussi présente, libre et marquée avec un fluorochrome. La réaction PCR ne se fait plus avec 3, mais 5 amorces, de ce fait le principe de la PCR s'en trouve sensiblement modifié (figure 1).

Figure 1. Principe de la PCR allèle spécifique couplée au marquage par QM13.



- A) Toutes les amorces sont présentes dans le milieu réactionnel :
- L'extrémité 3' de l'amorce orange ne correspond pas au génotype, la PCR ne se réalise pas.
 - L'extrémité 3' de l'amorce violette correspond au génotype, la PCR se réalise
 - Les 2 amorces fluorescentes bleue et verte restent libres à ce stade.
- B) L'amorce anti-sens commune permet la synthèse du brin complémentaire, faisant apparaître ainsi un site de fixation pour la queue M13 fluorescente libre et spécifique du génotype.
- C) La queue M13 fluorescente libre peut se fixer, l'élongation permet alors d'obtenir un produit PCR marqué, de taille attendue et analysable sur un séquenceur ADN.

Dessin des amorces

A partir des travaux de Puinean *et al.* (2013), nous avons identifié dans les données génomiques disponibles chez *Frankliniella occidentalis* (GenBank accession: JMDY03002810) la portion de gène comportant la mutation G275E. La mutation étant en bordure d'intron et la référence issue d'échantillons américains de laboratoire nous avons défini des amorces de séquençage et séquencé un fragment de 300 pb encadrant la mutation ciblée, chez deux échantillons issus d'une population française sensible au Spinosad et deux échantillons issus d'une population résistante.

Ce faisant nous avons validé d'une part le fait que les échantillons supposés résistants présentent bien la mutation et d'autre part la stabilité de la séquence intronique dans laquelle nous devons définir nos amorces de génotypages

qui s'avère être d'environ 99 % entre nos échantillons français et la référence américaine. Ces mêmes échantillons serviront de références et de témoins positifs dans toutes les étapes de mise au point ou de génotypage.

La définition des amorces s'est faite avec l'aide du portail web WASP (<http://bioinfo.biotech.or.th/WASP>) qui est un outil dédié à ce type de PCR. La solution que nous avons retenue est celle où nos deux amorces spécifiques sont dans l'intron et la reverse commune dans l'exon (figure 2).

Figure 2. Définition des amorces spécifiques.

Acide aminés	-----G--T--Y--F--N--C--I--M--F--M--V--A--S--S--V--V--L--T--V--V--V--
Exon-Intron	-----INTRON-----><-----EXON-----
Mutation G275E	-----GAA-----
Amorce sauvage	-----CTGCCTGCGTCTGTTTGTATG-----
Génotype sauvage	ATCGGCCACTGCCTGCGTCTGTTGTAGGAACTTACTTCAACTGCATCATGTTTCATGGTGGCCTCCTCCGTGGTATTAAACCGTGGTTCGTG
Génotype mutant	ATCGGCCACTGCCTGCGTCTGTTGTAGGAACTTACTTCAACTGCATCATGTTTCATGGTGGCCTCCTCCGTGGTATTAAACCGTGGTTCGTG
Amorce mutante	-----CTGCCTGCGTCTGTTGTATA-----
Amorce commune	-----CCGTGGTATTAAACCGTGGTC-----

Chacune des deux amorces sens est spécifique du génotype sauvage ou mutant, une fois défini, nous avons ajouté en 5' une queue de 20 bases différente pour chacune des amorces sens. Enfin, nous avons commandé ces mêmes queues de 20 nucléotides avec un marquage différent : un marquage FAM pour la queue spécifique de l'amorce mutante et un marquage HEX pour la sauvage (tableau 1).

Tableau 1. Liste des amorces utilisées.

La mutation G275E consiste en une substitution d'un nucléotide G en A. L'extrémité 3' des amorces spécifiques est positionnée sur le point de mutation, un T est substitué en avant-dernière position afin d'augmenter la spécificité.

nom	Séquence 5'-3'	Fluorescence
QM13-A-Mutante	GTTGTA ^{AAACGACGGCCAGT}	FAM / Bleu
Amorce Mutante	<i>GTTGTA^{AAACGACGGCCAGT}CTGCCTGCTGCTGTTTGTATA</i> A	
QM13-B-Sauvage	GTTGACCGGCAGCAA ^{AAATGT}	HEX / Vert
Amorce Sauvage	<i>GTTGACCGGCAGCAA^{AAATGT}CTGCCTGCTGCTGTTTGTATA</i> G	
Amorce R Commune	GACCACGGTTAATACCACGG	

Les amorces « mutante » et « sauvage » matchent en leur extrémité 3' le génotype recherché (en gras), une base en mismatch est intégrée (soulignée) pour renforcer la déstabilisation et la spécificité. Enfin on ajoute à l'extrémité 5' une extension dite en « queue M13 » (en italiques) permettant la fixation des amorces marquées.

Seules les amorces QM13-A et QM13-B sont marquées à leur extrémité 5' avec un fluorochrome adapté à notre séquenceur ADN : FAM (fluorescéine), fluorescence bleue, pour révéler les génotypes mutants et HEX (hexachlorofluorescein), fluorescence verte, pour révéler les génotypes sauvages.

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est une adaptation au format plaque 96 de la technique au Chelex® de Walsh *et al.* (1991) : un thrips est déposé à l'aide d'un pinceau au fond du puits d'une plaque PCR format 96, sont ajoutés ensuite 50 µl d'une solution à 10 % de résine Chelex® 100 et 3 % de protéinase K ainsi qu'une bille d'acier de 2 mm de diamètre. Une fois remplie la plaque est thermoscellée avec un film PCR, agitée à 1500 RPM pendant 30 secondes sur un homogénéisateur vertical 1600 MiniG™ (SPEX CertiPrep™), centrifugée 30 secondes à 6000 g et incubée 12

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (103)

heures à 55°C sur un thermocycleur. A la fin de l'incubation une étape à 98°C pendant 20 minutes inactive la protéinase K, l'extrait est alors directement utilisable en PCR et se conserve plusieurs semaines à 4°C ou plusieurs mois à -20°C.

Amplification PCR

La réalisation du mix réactionnel PCR se fait selon la composition du tableau 2 : le fluorochrome FAM étant plus intense que le HEX, la quantité d'amorce marquée FAM est réduite de 25 % pour équilibrer les signaux obtenus par la suite. L'Albumine Bovine Serique (BSA) et le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), sont des adjuvants de PCR que l'utilisation des kits commerciaux prêts à l'emploi a fait tomber dans l'oubli, néanmoins le premier stabilise la polymérase et le deuxième renforce la déstabilisation des mismatches entre les bases de nos amorces et leurs matrices (Bartlett *et al.*, 2003).

Tableau 2. Composition du mix réactionnel de PCR.

Produit	[initiale]	[finale]	V 1 échantillon	V 100 échantillons
GoTaq® Flexi Buffer (PROMEGA)	5X	1X	2,40 µl	240 µl
d'NTPs	4mM	200 µM	0,60 µl	60 µl
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (PROMEGA)	5 U/ µl	1U	0,20 µl	20 µl
QM13-A-Fam	25 µM	0,3 µM	0,15 µl	15 µl
QM13-B-HEX	25 µM	0,4 µM	0,20 µl	20 µl
Amorce Mutante	25 µM	0,2 µM	0,10 µl	10 µl
Amorce Sauvage	25 µM	0,2 µM	0,10 µl	10 µl
Amorce commune	25 µM	0,4 µM	0,20 µl	20 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,72 µl	72 µl
Bovine Serum Albumin	10 mg/ml	100 µg/ml	0,12 µl	12 µl
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM	20 mM	2,40 µl	240 µl
Eau MilliQ			2,81 µl	281 µl
Total			10,00 µl	1 000 µl

Pour chaque échantillon, on ajoute dans une plaque PCR, 2 µl de la fraction surnageante de l'extrait d'ADN au Chelex® et 10 µl de mix réactionnel. La plaque est thermoscellée et déposée sur un thermocycleur.

Le programme effectué est le suivant : 95°C/3 minutes de dénaturation initiale puis 35 cycles comprenant 95°C/30s (dénaturation), 56°C/30s (hybridation), 72°C/30s (élongation), enfin 10 minutes d'élongation finale à 72°C.

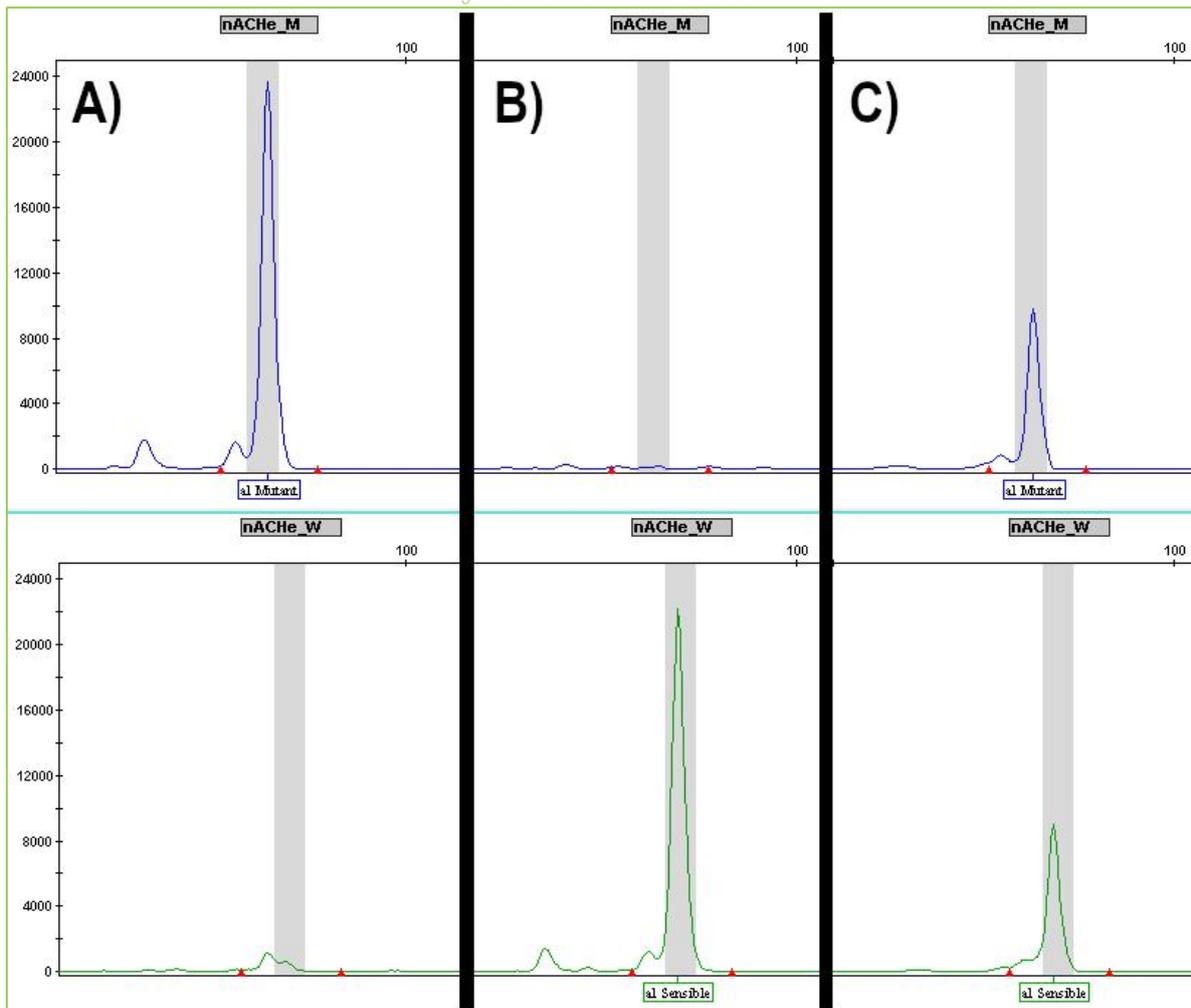
Révélation sur séquenceur

Pour chaque échantillon, 5 µl de produit PCR obtenu sont mélangés à 45 µl d'eau ultrapure (dilution au 1/10^e), puis 2 µl de cette dilution est ajoutée à 7,5 µl de formamide HiDi et 0,5 µl de marqueur de taille GeneScan™ - 600 LIZ® (Applied Biosystems) pour séquenceur. Après dénaturation 5 minutes à 95°C, les échantillons sont injectés 30 secondes à 1,6kV sur un séquenceur capillaire ABI3730XL (Applied Biosystems). L'électrophorèse s'effectue pendant 30 minutes avec des capillaires de 50 cm et un polymère POP-7™. Les produits PCR sont séparés en fonction de leur taille et de la fluorescence de leurs amorces. Les résultats sont analysés avec le logiciel GeneMapper™ v4.1(Applied Biosystems).

Résultats

Les résultats obtenus se présentent sous forme de chromatogramme (1 par fluorochrome compatible) dont l'abscisse correspond à la taille en paire de base et l'ordonnée à l'intensité du signal exprimé en Relative Fluorescence Unit (RFU). Les pics bleus correspondent au génotype mutant résistant, les verts au génotype sauvage sensible. Une fenêtre de lecture (BIN) de +/- 0.45 pb centrée sur les témoins de PCR permet d'exclure des résultats d'éventuelles amplifications non spécifiques (figure n°3).

Figure 3. Visualisation des résultats



A & B) Les génotypes homozygotes présenteront un seul pic dans l'une ou l'autre couleur (A = bleu/mutant ; B= vert/sauvage)

C) Les génotypes hétérozygotes ont un pic équivalent dans les deux couleurs.

Un BIN de lecture (bande grise) est défini pour synchroniser les lectures entre les échantillons et absorber les deltas de migrations. Sa largeur est de 0.90 pb centrée sur les témoins de PCR.

La taille relative moyenne des produits PCR des allèles mutants et sauvages sont respectivement 96.6 pb et 97.1 pb. Le léger décalage entre les deux couleurs est lié à la différence entre les fluorochromes qui impactent différemment la migration des produits PCR.

Les moyennes des intensités de fluorescence obtenues pour 126 échantillons génotypés en 2019 sont résumées dans le tableau 3.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (103)

Tableau 3. Moyenne des intensités de fluorescence obtenues.

	Homozygote		Hétérozygote	
	Mutant	Sauvage	Mutant /	Sauvage
	n= 104	n= 5	n= 17	
Intensité moyenne (RFU)	18 007	18 614	9 148	8 452
Ecart type	7 597	8 903	5 855	5 791

Les résultats de génotypage par population échantillonnée en 2018 et 2019 sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4. Résultats du génotypage de la mutation G275E.

Population	Culture	n	Mutant RR	Mutant RS	Sauvage SS	Fa G275E	Traitement	
							Spinozad	autres insecticides
18-49-001	Fleurs	20	20	0	0	100,0%	4	10
18-85-001	Fleurs	20	20	0	0	100,0%	4	22
19-47-004	Fleurs	24	23	1	0	97,9%	2	6
19-49-001	Fleurs	16	12	2	0	92,9%	0	5
19-49-002	Fleurs	16	16	0	0	100,0%	1	3
18-45-001	Alimentaire	16	0	5	10	16,7%	2	2
18-69-001	Alimentaire	20	19	1	0	97,5%	2	4
18-69-002	Alimentaire	20	12	5	1	80,6%	2	4
19-47-001	Alimentaire	24	12	8	4	66,7%	1	2
19-47-002	Alimentaire	24	21	2	1	91,7%	2	2
19-47-003	Alimentaire	24	20	4	0	91,7%	1	3
19-47-009	Alimentaire	32	20	10	2	78,1%	1	4
19-33-001	Alimentaire	32	30	0	0	100,0%	3	7

Fréquence allélique (Fa) de la mutation G275E dans des cultures florales (roses...) et alimentaires (fraises, aubergines...)

Discussion

Nous avons initialement testé le kit commercial de génotypage KASP™ de LGC Biosearch Technologies, mais les thrips sont des insectes dont la longueur n'est que d'1 à 2 mm (photo 1), en utilisant les méthodes classiques d'extractions sur colonnes, phénol/chloroforme ou Chelex® 100 il ne nous a pas été possible d'obtenir les 5 ng/μl requis pour le kit. Les seuls résultats positifs ont pu être obtenus en poolant 50 individus avec une concentration en ADN variant de 1,8 à 5,2 ng/μl (dosage picogreen), ce qui permet éventuellement un génotypage à l'échelle de la population mais pas à l'individu. Néanmoins l'association Chelex®/PCR QM13 a été utilisée pour le génotypage d'autres espèces de thrips (Rafter *et al.*, 2013 ; Herevard *et al.*, 2017) pour des analyses microsatellites, mais jamais à notre connaissance pour du screening de SNP ni sur *F. occidentalis* en particulier.

Photo 1. *Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895).



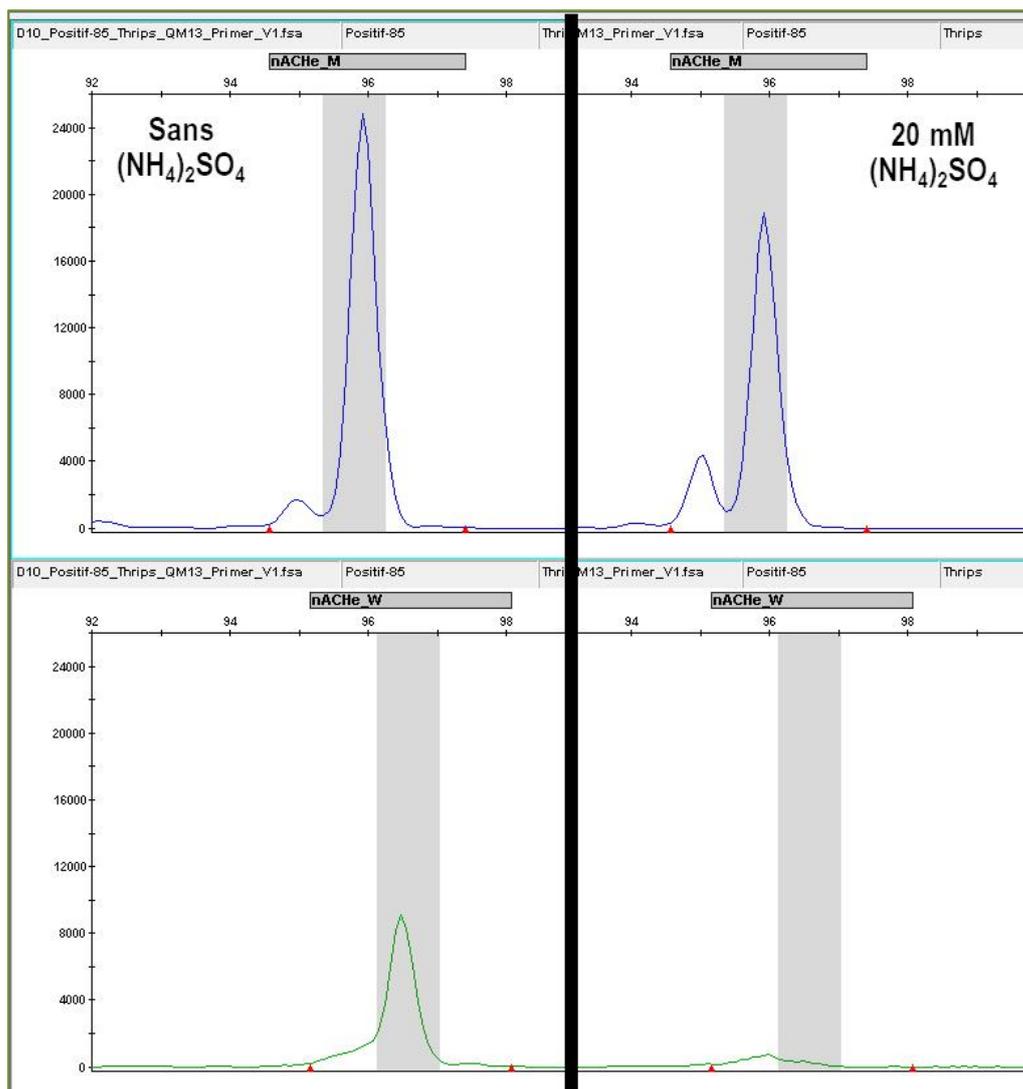
Les thrips sont des insectes ravageurs à peine visibles à l'œil nu.

Cette association, en plus d'avoir la sensibilité nécessaire, présente l'avantage d'être extrêmement économique avec un coût de six centimes par échantillon pour l'extraction d'ADN et la capacité de changer de combinaisons

d'amorces à souhait sans coûts supplémentaires grâce aux amorces QM13. Si théoriquement la spécificité des amorces est assurée par le match de l'extrémité 3', en pratique l'élément clef est le sulfate d'ammonium. En effet en condition PCR standard, sans sulfate d'ammonium, les signaux obtenus lors de nos tests étaient faussés, avec une surestimation du nombre d'individus d'hétérozygotes. Cette surestimation a été démontrée grâce au séquençage Sanger de nos individus références.

Par contre, en présence de sulfate d'ammonium la spécificité est presque parfaite (figure 4). On observe, épisodiquement, une amplification non spécifique de l'amorce mutante sur les génotypes sauvages. Dans tous les cas, ces amplifications non spécifiques ne dépassent pas 2 % du signal principal et n'impactent en rien les lectures.

Figure 4. Effet des ions ammonium sur la spécificité de la PCR.



Lorsqu'un échantillon mutant est amplifié en absence de sulfate d'ammonium (à gauche) un signal « sauvage » (vert) environ 3 fois plus faible est observé rendant la lecture ambiguë.

En présence de 20 mM de sulfate d'ammonium (à droite) le pic « sauvage » disparaît complètement, l'interprétation est parfaitement claire.

Nous avons testé des concentrations en sulfate d'ammonium, de 10 à 50 mM, 20 mM nous est apparu comme la concentration optimale assurant la spécificité sans impacter le rendement PCR, à partir de 40 mM les rendements chutent.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (103)

La seule ombre au tableau est la présence d'un pic non spécifique et systématiquement présent à environ 100 pb au-dessus de notre amplicon attendu qui n'est en rien lié au génotype des échantillons. Dans la mesure où celui-ci ne perturbe pas les lectures nous n'avons pas cherché à tester d'autres combinaisons d'amorces pour le faire disparaître.

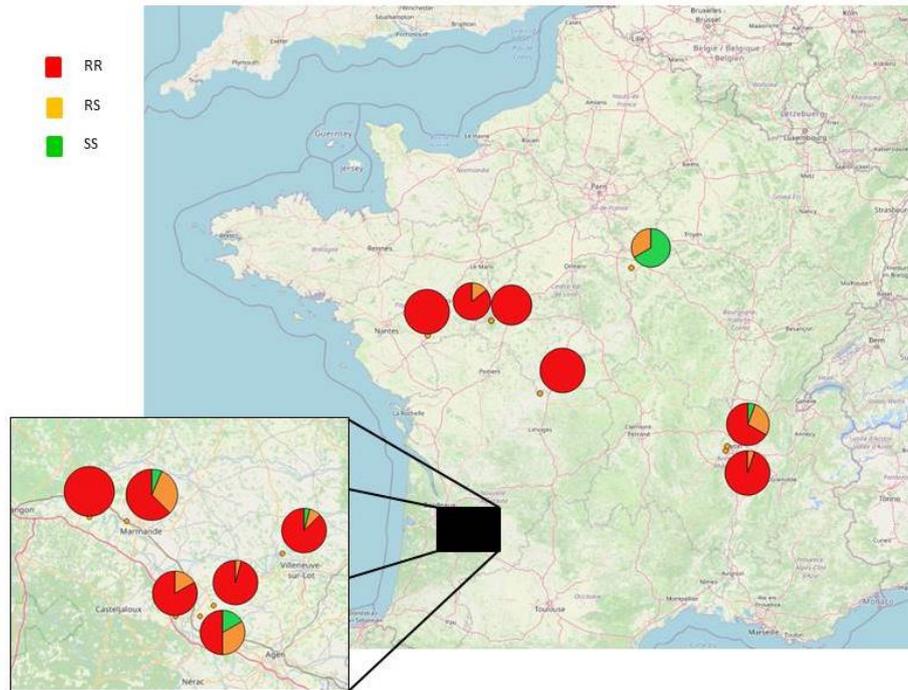
Sur les 344 échantillons testés, deux populations de 24 et 32 individus n'ont donné aucune amplification, après analyses d'une portion de la cytochrome oxidase I mitochondriale, il s'est avéré que les individus de ces populations appartiennent à deux autres espèces qui seraient *T.palmi* et *T.tabacci* ce qui confirme finalement la spécificité de nos amorces. Sur les 288 *F.occidentalis* confirmés, seuls sept sont en échec d'amplification soit environ 2,5 % ce qui nous conforte dans l'efficacité de notre méthode. D'un point de vue qualitatif, les moyennes des signaux obtenus sont presque identiques entre les génotypes homozygotes mutant et sauvage (tableau 3), le ratio signal mutant *versus* signal sauvage des génotypes hétérozygotes est très stable avec un ratio moyen de 53/47 ($\sigma=0,03$) et assez logiquement une intensité deux fois moindre par rapport aux homozygotes. Les écarts types traduisent une certaine hétérogénéité des résultats qui s'étalent entre 2000 et 32000 RFU (saturation) mais il est difficile d'espérer mieux en partant d'extrait d'ADN non purifiés, non dosés ni ajustés.

Dans nos phases de mises au point, nous avons adapté notre méthode à une révélation sur agarose/B.E.T. plus accessible et économique que l'utilisation d'un séquenceur. La PCR multiplex étant impossible dans ce cas, nous avons réalisé deux PCR simplex, une avec l'amorce mutante l'autre avec l'amorce sauvage puis nous avons groupé les résultats. La difficulté était alors de faire la différence entre un résultat nul lorsque l'allèle ciblé n'est pas présent et un échec purement technique de la PCR. Une manière d'y parvenir que nous n'avons pas testé, serait de co-amplifier un locus témoin qui servirait de témoin d'amplification pour chaque échantillon et permettrait de s'affranchir de l'utilisation d'un séquenceur.

Exemple d'application

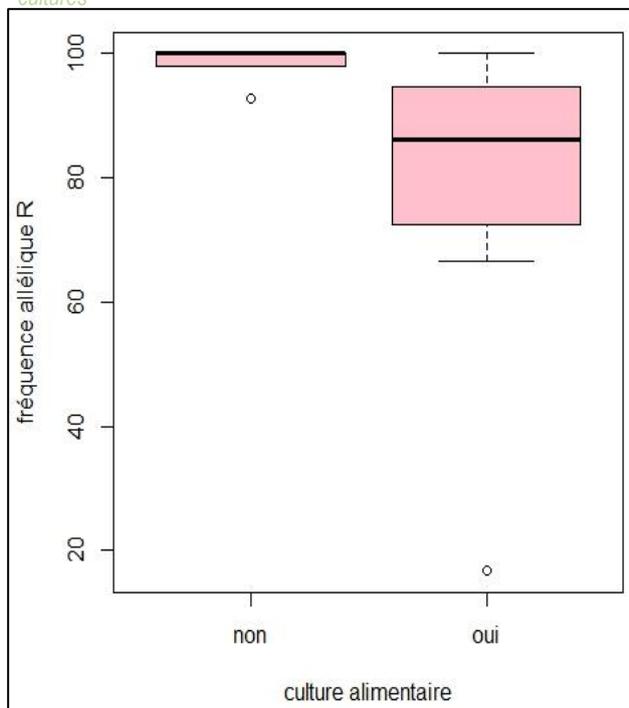
La détection des résistances aux insecticides et leur gestion par les autorités sanitaires du ministère de l'agriculture au niveau du territoire français est réalisé grâce au réseau de surveillance biologique du territoire (SBT). Des outils de détections performants comme celui présenté dans cet article sont tout à fait adaptés pour ce genre d'objectif. Cependant, pour pouvoir prodiguer des préconisations dans l'utilisation d'insecticides dans l'espace et dans le temps il faudrait pouvoir créer chaque année une « carte météo » des résistances se basant sur un échantillonnage massif et régulièrement réparti dans l'espace. L'actuel plan national de surveillance des résistances se base sur des biotests qui sont des méthodes lourdes, coûteuses et bas débit. Aussi l'échantillonnage est limité et réalisé dans les parcelles les plus à risque qui connaissent des échecs de traitements sur plusieurs années consécutives. L'exemple présenté ici correspond plus à un plan de vigilance que de surveillance. C'est-à-dire qu'il permet de donner le signal de l'apparition des premiers cas de résistance dans plusieurs régions françaises mais pas de faire un suivi exhaustif de l'état des résistances. Ainsi nous allons présenter ici la recherche de mutation dans treize populations de *Frankliniella occidentalis*, prélevées par battage dans toute la France dans des cultures utilisant le spinosad comme insecticide et ayant des problèmes d'efficacité de traitement. Les individus ont été mis dans l'alcool en pool et envoyés par la poste. Les résultats de la recherche de mutation nous a permis de cartographier son occurrence sur notre territoire (figure 5).

Figure 5 Répartition de la mutation G275E en France.



Cartographie de la mutation G275E entre 2018 et 2019 : chaque camembert correspond à une population, la proportion des individus homozygotes résistants est en rouge, celle des hétérozygotes en orange et les homozygotes sauvages en vert.

Figure 6. Fréquence de la mutation G275E en fonction du type de cultures



Les cultures non alimentaires (fleurs ornementales) présentent une fréquence allélique de la mutation quasiment fixée chez *F.occidentalis* contrairement aux populations attaquant les cultures alimentaires (fruits et légumes) qui ont une fréquence de l'allèle sensible sauvage plus importante.

Ici pour la première fois en France nous avons pu constater que cette mutation était présente dans toutes les régions échantillonnées. Nous avons donc cherché des corrélations entre pratiques culturales dans les parcelles échantillonnées et taux de mutations. Nous avons pu constater que la pression de sélection (nombre de traitement) fait varier la proportion d'allèle résistant. On peut ainsi voir que la fréquence d'individus mutants est plus grande sur des cultures florales recevant un nombre de traitement insecticide est plus important par rapport aux cultures de fruits et légumes (figure 6). Cette information va dans le sens d'une sélection forte de cette mutation en présence de traitements avec cette substance active. La présence de cette mutation dans toutes les populations testées montre également qu'elle est probablement très répandue. Un état des lieux plus complet devrait donc être envisagé dans les années à venir pour avoir une image plus complète de ce phénomène sur tout le territoire français.

Conclusion

D'un point de vue économique, notre méthode n'est pas plus rentable que la solution commerciale, les coûts de PCR sont équivalents, les coûts de migrations sur séquenceurs viennent tripler le prix de revient à l'échantillon. Néanmoins notre méthode n'est pas limitée aux SNP bi-alléliques, elle se contente d'une extraction d'ADN excessivement bon marché et conserve une sensibilité bien supérieure qui nous permet tout simplement d'obtenir des résultats fiables et c'est bien là l'essentiel. Les thrips étant des ravageurs présents en complexes d'espèces et la mutation G275E n'étant probablement pas exclusive de *F.occidentalis*, une de nos perspectives à court terme est d'adapter cette technique aux autres espèces de thrips rencontrés dans les bassins de production agricoles.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

Bartlett J MS et Stirling D (ed.) (2003) *PCR protocols*. Totowa, 226, NJ : Humana Press.

Plate-forme INRAE d'épidémiologie Ephytia : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19237/Biocontrol-Frankliniella-occidentalis-Thrips-californien>

Glaab W E et Skopek T R (1999) A novel assay for allelic discrimination that combines the fluorogenic 5' nuclease polymerase chain reaction (TaqMan®) and mismatch amplification mutation assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 430(1), 1-12.

Hereward J, Hutchinson J A, Mc Culloch G A, *et al.* (2017) Divergence among generalist herbivores: the *Frankliniella schultzei* species complex in Australia (Thysanoptera: Thripidae). *Arthropod-Plant Interactions*, 11(6), 875-887.

Kwok S, Kellogg D E, Mc Kinney N *et al.* (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic acids research*, 18(4), 999-1005.

Okayama H, Curiel D T, Brantly M L, Holmes M D and Crystal R G (1989) Rapid nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 114, 105-113.

Puinean A M, Lansdell S J, Collins T *et al.* (2013) A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Neurochemistry*, 124(5), 590-601.

Rafter M A, Hereward J P et Walter G H (2013) Species limits, quarantine risk and the intrigue of a polyphagous invasive pest with highly restricted host relationships in its area of invasion. *Evolutionary applications*, 6(8), 1195-1207.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18(2), 233-234.

Walsh P S, Metzger D A et Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.