



## Méthodes

### Méthodes de caractérisation des résistances de *Myzus persicae* aux carbamates, aux pyréthriinoïdes et aux néonicotinoïdes

Séverine Fontaine (severine.fontaine@anses.fr), Laetitia Caddoux, Annie Micoud  
Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Résistances aux produits phytosanitaires, France

**Le puceron vert du pêcher est un ravageur de nombreuses espèces végétales. L'utilisation des produits phytosanitaires, afin de limiter la prolifération de ce puceron dans les différentes cultures, peut conduire à la sélection d'individus résistants. Parmi les phénomènes de résistance, la modification de la protéine ciblée par l'insecticide est l'un des mécanismes le plus aisément mis en évidence via des tests reposant sur des méthodes de biologie moléculaire. Cet article vise à présenter trois méthodes permettant de détecter différentes mutations responsables de résistances à trois insecticides très couramment utilisés contre le puceron: les carbamates, les pyréthriinoïdes et les néonicotinoïdes.**

#### Introduction

Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, se caractérise par une très grande polyphagie puisqu'il est capable de coloniser plus de 400 espèces végétales sauvages ou cultivées (plantes herbacées, arbres fruitiers, arbustes...). Cet insecte phytophage provoque des dégâts directs via ses piqûres d'alimentation qui affaiblissent la plante et déforment les feuilles. Il occasionne également des dégâts, dits indirects, très dommageables. En effet, via ses piqûres, c'est un vecteur de viroses capable de transmettre plus de 120 virus phytopathogènes de diverses plantes ou arbres (CMV: Cucumber Mosaic Virus, CaMV: Cauliflower Mosaic Virus, Plum Pox virus affectant les arbres fruitiers à noyaux). De plus, l'excrétion de miellat par les pucerons favorise le développement d'un champignon (*Fumago salicina*) responsable de la fumagine qui rend les organes touchés impropres à la commercialisation. *Myzus persicae* se caractérise également par un cycle biologique dont la complexité résulte de sa capacité à se reproduire de façon sexuée ou asexuée et, également, par le fait que ce cycle varie selon les plantes colonisées et la situation géographique.

De par ses caractéristiques (mode de reproduction asexuée ou sexuée, polyphagie, vecteur de viroses), *Myzus persicae* est un ravageur très dommageable pour de nombreuses productions agricoles. L'utilisation d'insecticides est un moyen de lutte contre ce ravageur. Or l'application répétée de substances actives peut engendrer l'apparition de phénomènes de résistance à ces produits. Ainsi, chez l'espèce *Myzus persicae*, des résistances à plusieurs familles d'insecticides ont été décrites. Plusieurs mécanismes de résistance, affectant quatre familles d'insecticides homologués en France contre ce ravageur (les organophosphorés, les pyréthriinoïdes, les carbamates, les néonicotinoïdes) ont été décrits. Les résistances aux insecticides chez le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*) reposent sur deux grands types de mécanismes:

- **des résistances de type métabolique** qui sont induites par la duplication d'un gène qui engendre une synthèse accrue de la protéine correspondante. La protéine surexprimée est une enzyme capable de dégrader une ou des substance(s) active(s). Ainsi, chez *M. persicae*, des carboxylestérases (E4 ou FE4) sont impliquées dans une résistance modérée vis-à-vis d'un large spectre d'insecticides (carbamates, pyréthriinoïdes, organophosphorés) (Devonshire *et al.*, 1982) et un cytochrome à P450 (Puinean *et al.*, 2010) est

impliqué uniquement dans une résistance modérée aux néonicotinoïdes;

- **des résistances dites de cible**, dues à une modification de la protéine ciblée par l'insecticide ont également été décrites. Ces mécanismes de résistance sont généralement responsables d'une très forte baisse d'efficacité des insecticides concernés. Trois grandes familles d'insecticides sont concernées par ce type de résistance: les pyréthriinoïdes, les carbamates et plus récemment les néonicotinoïdes.

Concernant les carbamates, une mutation, responsable d'un fort niveau de résistance, a été identifiée sur le gène codant pour l'acétylcholinestérase 2 (Nabeshima *et al.*, 2003), cible de cette famille d'insecticide. Cette mutation, nommée Mace pour « *Modified acetylcholinesterase* », se traduit au niveau protéique par la substitution d'une sérine par une phénylalanine au niveau de l'acide aminé 431 de l'acétylcholinestérase 2 (S431F).

Pour les pyréthriinoïdes, trois mutations peuvent être en cause, chez *M. persicae*, dans la résistance de cible à cette famille. Elles affectent la cible de l'insecticide: le canal sodium voltage dépendant. Ces résistances sont nommées kdr (*knock-down resistance*) et s-kdr (super kdr). La mutation kdr se traduit au niveau protéique par le remplacement d'une leucine par une phénylalanine en position 1014 de la protéine (L1014F). Les mutations dites s-kdr affectent le codon 918 et elles se traduisent par la mutation de la méthionine. Différentes substitutions ont été décrites. Ainsi, la méthionine peut être substituée par une théonine (M918T) (Martines-Torres *et al.*, 1999). Cette mutation est toujours trouvée en association avec la mutation kdr (L1014F). La seconde substitution décrite plus récemment se traduit par le remplacement de la méthionine par une leucine (M918L) (Fontaine *et al.*, 2011). À ce jour, cette dernière a toujours été trouvée en l'absence de kdr.

Pour les néonicotinoïdes, la mutation se traduit par la substitution d'une arginine par une thréonine en position 81 (R81T) de la sous-unité  $\beta 1$  du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), protéine cible de cette famille d'insecticides (Bass *et al.*, 2011)

Dans le cadre de plans de surveillance élaborés par la DGAI (Direction générale de l'alimentation), l'unité Résistance aux produits phytosanitaire (Rpp) réalise des suivis de l'évolution et de la dispersion des résistances des bioagresseurs des cultures aux produits phytosanitaires. Ainsi, pour *M. persicae*, différents outils d'analyses ont été développés afin de rechercher quatre des mutations entraînant des résistances aux insecticides chez



## Méthodes

cet insecte. L'un de ces outils permet de détecter simultanément la résistance aux carbamates causée par la mutation Mace de l'acétylcholinestérase et la résistance aux pyréthriinoïdes liée à la mutation *kdr*. Un second outil vise à rechercher la mutation M918L affectant le canal sodium impliquée dans une forte résistance aux pyréthriinoïdes. Enfin, la dernière méthode présentée permet la recherche de la mutation R81T, de la sous-unité  $\beta 1$  du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), responsable d'une résistance aux néonicotinoïdes.

### Méthodes de caractérisation des résistances de *Myzus persicae* aux carbamates, aux pyréthriinoïdes et aux néonicotinoïdes

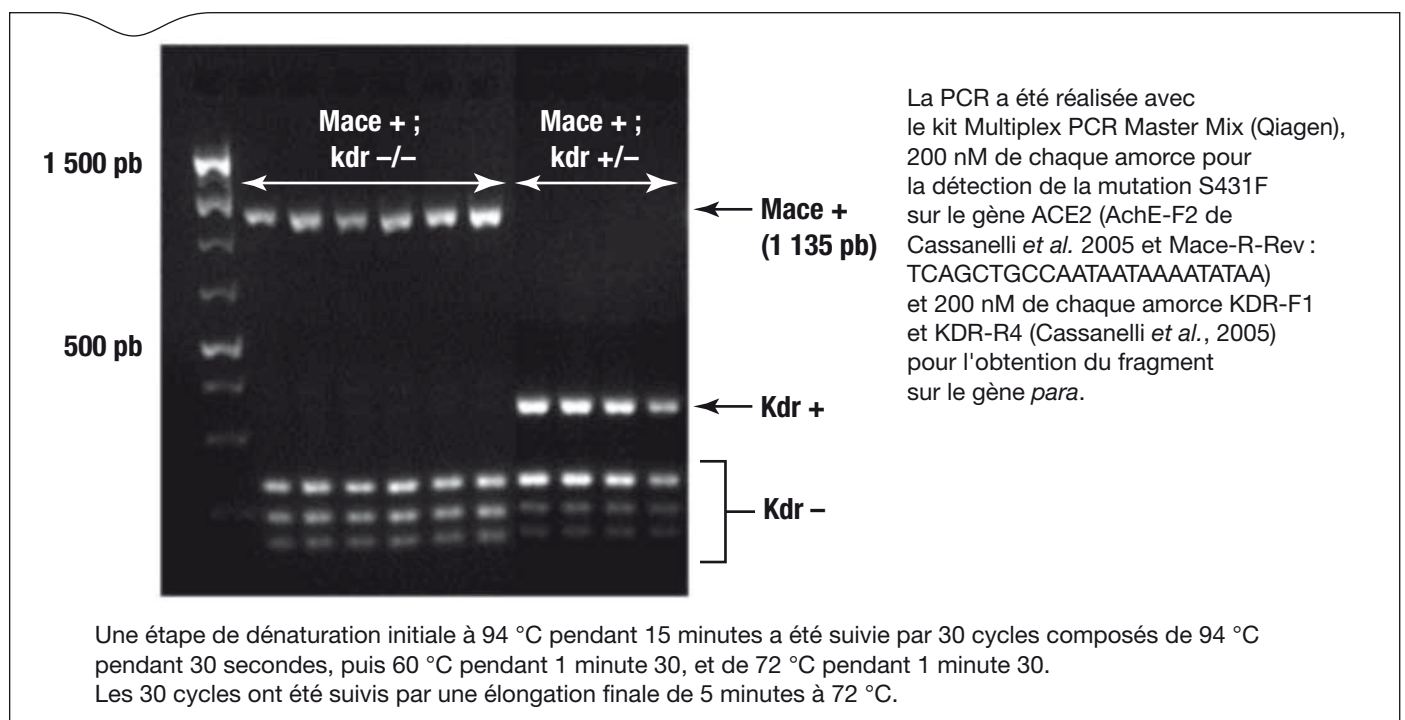
#### Recherche conjointe des mutations Mace de l'acétylcholinestérase et *kdr* du canal sodium impliquées respectivement dans une résistance aux carbamates et aux pyréthriinoïdes

Cette technique repose sur une PCR multiplexe qui permet, d'une part, l'amplification d'un fragment du gène canal sodium (*para*) comprenant le codon 1014 et d'autre part, l'amplification d'un fragment du gène de l'acétylcholinestérase 2 (*ace2*) uniquement lorsque la mutation S431F est présente. Le succès de l'amplification du gène *para* représente un contrôle d'extraction d'ADN positif dans le cas où l'allèle muté du gène *ace2* est absent. Pour la mutation *kdr*, la présence ou l'absence de la mutation est ensuite déterminée par une digestion enzymatique qui permet de différencier l'allèle sauvage (deux sites de restriction, trois fragments de 159 pb, 193 pb et 256 pb) de l'allèle muté (un site de restriction, deux fragments

de 256 pb et 352 pb) (Cassanelli *et al.* 2005). La recherche de l'allèle *kdr* permet de savoir si le puceron est hétérozygote, homozygote sensible ou homozygote résistant (Figure 1). La méthode pour rechercher l'allèle Mace permet uniquement de savoir si l'allèle est présent ou non et elle ne fournit donc pas d'information sur l'hétérozygotie ou l'homozygotie. Ces deux allèles de résistance Mace et *kdr* étant dominants, la présence de ces allèles à l'état hétérozygote est donc responsable d'un phénotype résistant, respectivement, vis-à-vis des carbamates et des pyréthriinoïdes.

#### Recherche de mutations M918L du canal sodium impliquée dans une résistance aux pyréthriinoïdes

La recherche de la mutation M918L est réalisée par qPCR (PCR quantitative) avec des sondes Taqman. Les amorces et les sondes ont été conçues selon des séquences nucléiques et des conseils aimablement fournis par M. Williamson (Rothamsted Research). La sonde pour la détection de l'allèle sauvage (918M) est liée au fluorochrome Cy3 à l'extrémité 5 « et à BHQ2 à l'extrémité 3 ». La sonde pour la détection de l'allèle résistant (918L) est liée au fluorochrome à FAM à l'extrémité 5 « et à BHQ1 à l'extrémité 3 ». Pour augmenter la spécificité, chaque sonde a été conçue avec trois LNA (Locked Nucleic Acids). Cette technique permet de rechercher deux allèles du canal sodium voltage dépendant. Elle permet de déterminer si le puceron est homozygote [MM], hétérozygote [ML] ou homozygote [LL] pour le codon 918. À l'issue de la qPCR, après vérification des courbes d'amplification, les ratios de fluorescence en point final pour chacune des sondes sont comparés entre eux (Figure 2) afin de définir le génotype de chaque puceron.



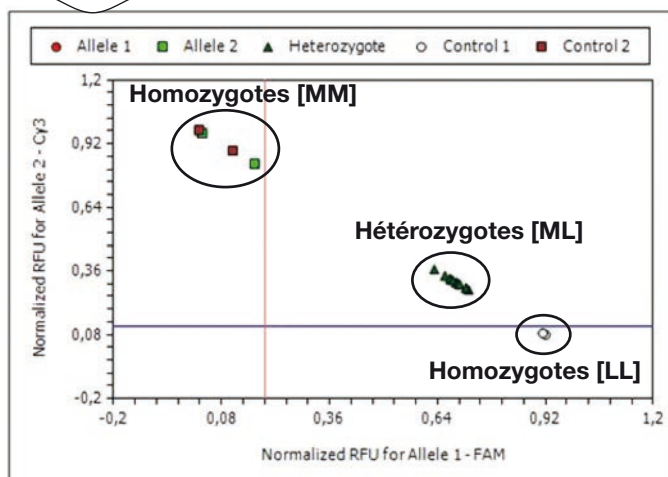
**Figure 1. Profils de migration, sur gel d'agarose à 2,5 %, des produits de digestion pour la recherche conjointe des mutations Mace de l'acétylcholinestérase et *kdr* du canal sodium.**

**Mace + ; *kdr* -/- :** individus possédant l'allèle Mace et ne possédant pas l'allèle muté « *kdr* ».

**Mace - ; *kdr* +/- :** individus ne possédant pas l'allèle Mace et hétérozygotes pour l'allèle muté « *kdr* ».



## Méthodes



Amorces et sondes pour la PCR Taqman, les nucléotides entre crochets sont des Locked Nucleic Acids (LNA) :

**qMP SKDR-F :**  
GTGGCCCACACTGAATCTTTTAAT

**qMP SKDR-R :**  
ACAAACGTTAGTTACCCAAAGCA

**Probe MPskdr-SBIS :**  
Cy3-ATGGTTCGACCC[+A][+T][+T]AT-[BHQ2]

**Probe MPskdr-R- 918L :**  
FAM-ATGGTTCGACC[+A][+A][+T]AT-[BHQ1]

La qPCR est réalisée dans un volume final de 25  $\mu$ L avec 12,5  $\mu$ L de Jumpstart Taqman (Sigma-Aldrich), 200 nM de chacune des amorces, 400 nM de chacune des sondes, 4,5 mM de  $MgCl_2$  et 1  $\mu$ L d'ADN. Le cycle PCR est composé d'une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C puis de 40 cycles avec une dénaturation à 94 °C pendant 15 secondes, une hybridation à 55 °C pendant 30 secondes, puis une élongation à 60 °C pendant 45 secondes.

**Figure 2. Résultat du génotypage des pucerons pour le codon 918 par sonde Taqman pour détecter l'allèle sauvage et l'allèle muté 918L.** En abscisse et en ordonnée sont représentées les intensités de fluorescence des deux fluorochromes FAM et Cy3 permettant de distinguer les trois génotypes : **Homozygote [MM]** : puceron ne présentant pas de mutation au niveau du codon 918 ; **Hétérozygote [ML]** : puceron avec un seul allèle muté au niveau du codon 918 (substitution de la méthionine par une leucine) ; **Homozygote [LL]** : puceron avec les deux allèles mutés au niveau du codon 918.

### Séquence sens d'individu sauvage

5' - TAGTTCTAACTTATTGCCTGCAGCTATTAATATCCAATTAATAATGT  
GTCTTAATATTGTTTTATTGTTTAATGAAAAGAGTCAAATAATGAAATCAAAC  
3' - AAAAGAGTCAAATAATGAAATCAAAC

Amorce sens **MPB1F-SmII** →

GTTTG**G**TTG**A**CTTGTGAGTAACCTACTTAATATATATATATATATATA  
GTTTGCTTGA - 5'

← Base dégénérée pour créer le site de restriction

TTTATTTTCAGTTTGTAACCTATAAAATTAATAAATAAAGAGTTTCCTTTCTA

← Amorce anti-sens **MPB1TMR**

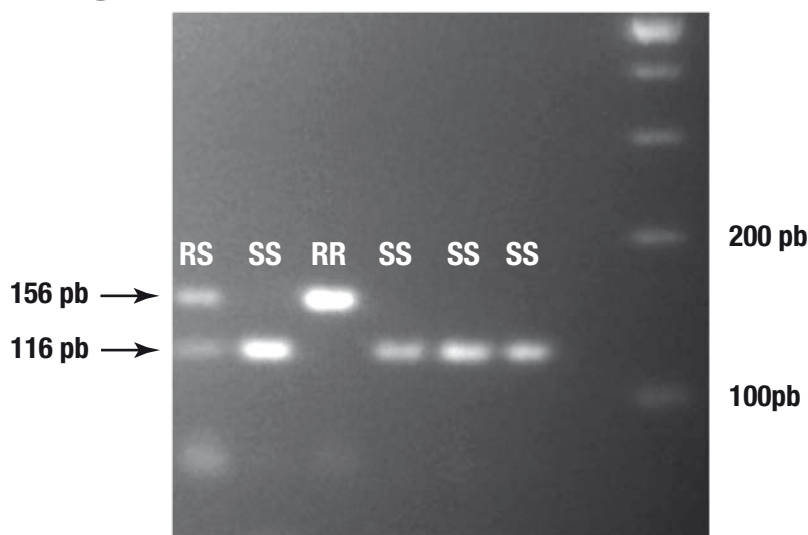
3' - ATAATCTGAAGGACTGGCG - 5'  
ACGATTAGACTTCCTGACCGC - 3'

**Figure 3. PCR-dCAPS, position des amorces MPB1F-SmII et MPB1TMR sur la sous-unité  $\beta$ 1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) comprenant le codon 81.**

En rouge, la base mutée pour l'amorce dCAPS : C. En bleu, la base concernée par la mutation R81T.



## Méthodes



La PCR est réalisée dans un volume final de 25  $\mu$ L, avec 200  $\mu$ M de dNTPs, 300 nM de chacune des amorces, 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA, 1,5 unité de Taq et 1  $\mu$ L d'ADN.

Le cycle PCR est composé d'une dénaturation initiale de 5 minutes à 94 °C, puis 35 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, une hybridation à 55 °C pendant 1 minute puis une élongation à 72 °C pendant 30 secondes. La PCR se termine par une élongation finale de 5 minutes à 72 °C. La digestion de 10  $\mu$ L de produits PCR est réalisée avec 5 unités enzyme SmlI à 55 °C pendant une nuit.

Figure 4. Profils de migration, sur gel d'agarose à 3%, des produits de digestion de la PCR-dCAPS pour détecter le mutation R81T affectant l'unité  $\beta$ 1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR).

**Homozygote SS**: puceron ne présentant pas de mutation au niveau du codon 81; **Hétérozygote RS**: puceron avec un seul allèle muté au niveau du codon 81 (substitution de l'arginine par une thréonine); **Homozygote RR**: puceron avec les deux allèles mutés au niveau du codon 81.

L'allèle de résistance 918L étant dominant, la présence de cet allèle à l'état hétérozygote est donc responsable d'un phénotype résistant vis-à-vis des pyréthrinoides.

La méthode présentée ici ne permet pas de mettre en évidence l'autre mutation pouvant affecter le codon 918 (M918T). Une méthode de qPCR existe pour détecter cette dernière mutation (Anstead *et al.*, 2004). Les essais de multiplexage avec les trois sondes pour détecter simultanément les trois codons possibles en position 918 (responsables de la présence des acides aminés méthionine, leucine ou thréonine) n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. De plus, récemment, d'autres mutations affectant le codon 918 ont été mises en évidence (données non publiées). De ce fait, lors des analyses réalisées avec les deux sondes spécifiques des allèles 918M et 918L, pour les individus ne donnant pas de mesure de fluorescence ou présentant un résultat ambigu, un séquençage d'une portion du gène du canal sodium contenant le codon 918 est réalisé afin de déterminer précisément le génotype.

### Recherche de mutations R81T de la sous-unité $\beta$ 1 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) impliquée dans une résistance aux néonicotinoïdes

La méthode utilisée est une PCR dCAPS (*Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*). Elle repose sur la création d'un site de restriction lorsque l'allèle est non muté. La création de ce site est réalisée grâce à une amorce placée à proximité du codon 81 et dont l'une des bases, non complémentaire

de la séquence à amplifier, entraîne la création d'un site de restriction lorsque l'allèle est non muté (Figure 3). La digestion enzymatique permet de discriminer l'allèle sauvage (116 pb et 37 pb) de l'allèle muté sans site de restriction (156 pb) (Figure 4). Chez les individus hétérozygotes, la présence de la mutation R81T se traduit par une baisse de sensibilité aux néonicotinoïdes mais à un niveau moindre que celui observé chez les individus homozygotes. Cet allèle semble donc être co-dominant (données non publiées).

### Conclusion

*Myzus persicae* est une espèce de choix pour l'étude des résistances aux insecticides. Présent sur de nombreuses cultures, il est soumis à des pressions phytosanitaires variées. Son cycle biologique, au cours duquel peuvent alterner une reproduction sexuée (permettant des recombinaisons génétiques) et des cycles de reproduction asexuée (offrant une multiplication rapide des génotypes les plus avantageux) représente un avantage d'un point de vue évolutif. Les outils présentés ici permettent une recherche ciblée de quelques-uns des mécanismes de résistance connus chez ce puceron. Ils ont été conçus pour répondre au besoin d'étudier des allèles de résistance chez *Myzus persicae* à trois grandes familles d'insecticides. Cependant, l'absence de l'allèle de résistance recherché n'indique pas forcément que l'individu est sensible à l'insecticide. Le puceron peut avoir d'autres mécanismes de



## Méthodes

résistance non détectés par l'une des méthodes développées ici. Seuls les tests de sensibilité aux insecticides réalisés en laboratoire, par pulvérisation ou ingestion de l'insecticide en conditions contrôlées, permettent de déterminer de façon exhaustive le phénotype sensible ou résistant du puceron. Les outils moléculaires, moins fastidieux à mettre en œuvre, conduisent à déterminer la présence ou l'absence d'un allèle reconnu comme responsable d'une résistance à une ou des substances actives. Leur avantage est de détecter, chez un même individu, plusieurs mécanismes vis-à-vis de différentes substances actives. Noter néanmoins que compte tenu des capacités évolutives de ce ravageur et des changements dans l'utilisation des familles d'insecticides, ces méthodes d'analyses sont amenées à être modifiées ou à être remplacées par de nouvelles méthodes. Ainsi, pour la résistance aux pyréthrinoïdes, le développement d'une méthode d'analyse par HRM visant à identifier les différentes mutations affectant le codon 918 du gène *para* est en cours de réflexion afin d'être plus exhaustif dans la recherche des différents allèles impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes.

### Références bibliographiques

- Anstead JA, Williamson MS, Eleftherianos I and Denholm I. 2004. High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochem Mol Biol*; 34(8): 871-877
- 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*, 31: 12-51.
- Cassanelli S, Cerchiari B, Giannini S, Bizzaro D, Mazzoni E and Manicardi GC. 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 61(1): 91-96.
- Devonshire AL and Moores GD. 1983. A carboxylesterase with Broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 18: 235-246.
- Fontaine S, Caddoux L, Brazier C, Bertho C, Bertolla P, Micoud A and Roy L. 2011. Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. *Pest Management Science*, 67(8): 881-885.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Williamson MS and Devonshire AL. 2005. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and insecticides in the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Molecular Biology*, 8: 339-346.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T and Kono Y. 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307: 15-22.
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS and Bass C. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genetique*, 6(6): e1000999. doi: 10.1371.
- Vorburger C, Lancaster M, Sunnucks P. 2003 - Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two 'superclones' in Victoria, Australia.