

Les mécanismes de résistance aux insecticides chez le puceron *Aphis gossypii*



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Sur le plan agronomique

- 20 ans

Ravageur secondaire → Ravageur principal

Modifications de densité de populations liées à :

- Phénomène d'adaptation des populations à de nouvelles plantes hôtes
- Diminution du cortège d'ennemis naturels (prédateurs, parasitoïdes, entomophorales)
- Modification de la sensibilité d'*A. gossypii* aux insecticides conventionnels dirigés au départ contre d'autres espèces d'insectes nuisibles



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Caractéristiques évolutives d'*Aphis gossypii*

Reproduction par parthénogénèse apomictique

↔ reproduction clonale

Potentiel d'accroissement démographique fort

Propagation rapide d'un mécanisme adaptatif

Potentiel adaptatif fort

- Nombreux habitats hétérogènes / latitudes très différentes
- Spectre de plantes hôtes très large
- Phénomènes de résistance aux insecticides et contournement de la résistance des plantes



Mise en évidence de populations d'*A. gossypii* résistantes à trois grandes familles d'insecticides

Organophosphorés

1964 sur cotonniers en Chine (Demeton)

Carbamates

1975-1980 en serres de chrysanthèmes en GB, en serres de concombres, melons et aubergines au Japon (Pyrimicarbe)

Pyréthrinoïdes

1990 sur cotonniers aux Etats-Unis et en Chine
(Cypermethrin, Deltamethrin)



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Mécanismes de résistance aux insecticides identifiés chez *A. gossypii*

- Forte activité carboxylestérase et quantité d'estérase → détoxication des OP et carbamates
- Absence d'inhibition de l'acetylcholinestérase par les OP et les carbamates ← modification de la cible
- résistance aux pyréthrinoïdes ← modification de la cible = canal Na^+ voltage dépendant, mutation kdr ou superkdr



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Multiples formes d'AChE insensibles

- L'enzyme AChE est inhibée par le demeton-S-méthyl et le pyrimicarbe : clones à phénotype sensible **S**
- L'enzyme AChE est inhibée par le DSM mais pas par le pyrimicarbe : clones à phénotype résistant **MACE_A**
- L'enzyme AChE n'est inhibée par aucun des deux : clones à phénotype résistant **MACE_B**

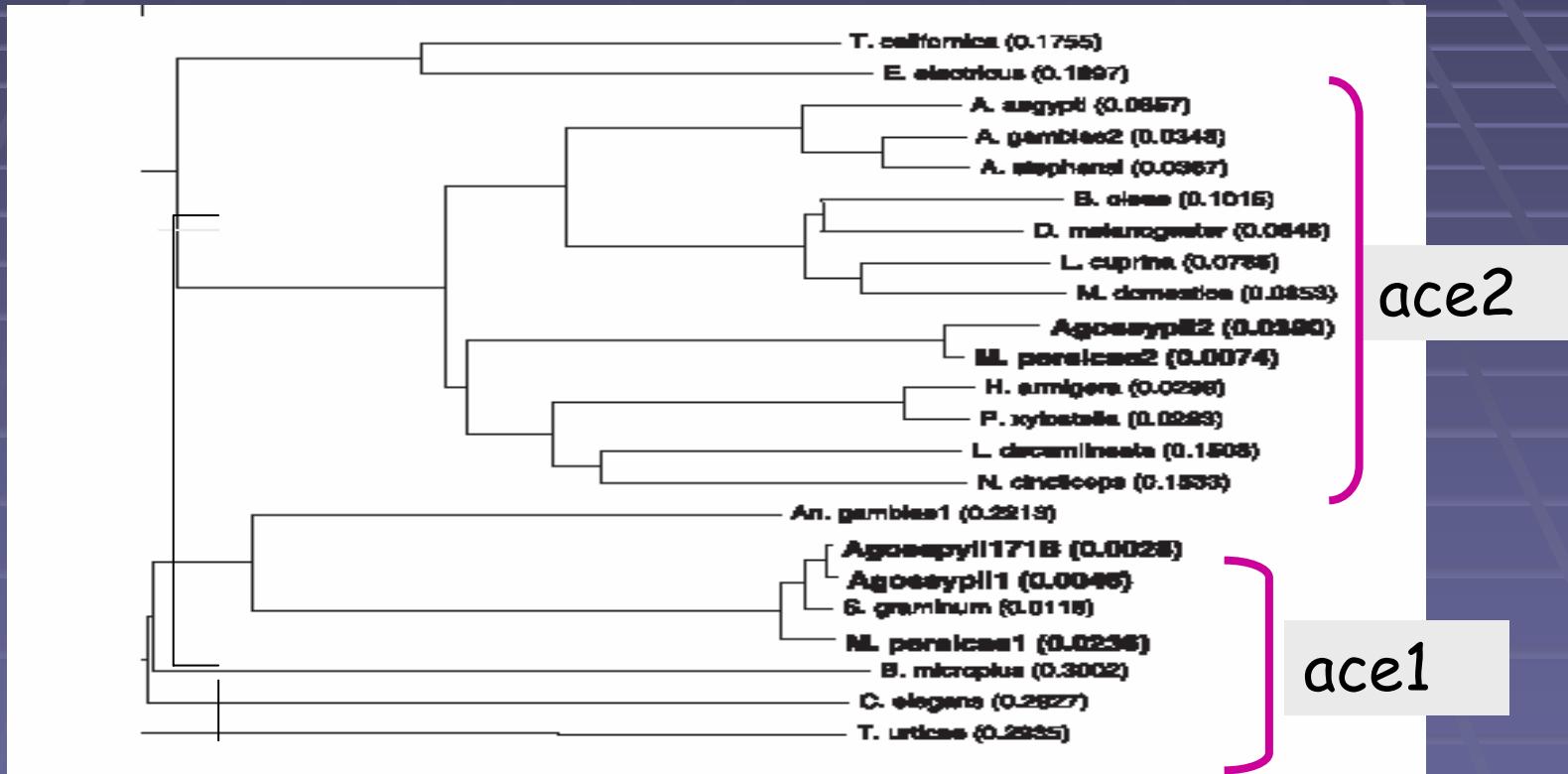


Identification des gènes codant l'AChE

- Deux gènes codent pour une acétylcholinestérase chez *Aphis gossypii* (Li & Han 2002)
- *ace1* : ORF 2031 bp \leftrightarrow 676 aa.
 - Forte homologie de séquence avec MpAChE2 de *Myzus persicae* (96 %) et le gène AChE de *Schizaphis graminum* (98%)
- *ace2* : ORF 1992 bp \leftrightarrow 664 aa.
 - Homologie de séquence avec *ace1* de 41%
 - Forte homologie de séquence avec MpAChE1 de *M. persicae* (>90%). Orthologues de *ace* de *Drosophila melanogaster*



Relations phylogénétiques entre les séquences des gènes d'AChE



Andrews et al. 2004, Ins. Mol. Biol. 13, 555-561



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Identification des mutations responsables de la modification de sensibilité de l'AChE

- Aucune substitution dans le gène *ace 2* entre clones résistants et clones sensibles d'*Aphis gossypii* ne peut être associée à la résistance
- Dans le gène *ace 1* : 2 mutations sont associées aux phénotypes résistants :
 - S431F est spécifique de la résistance au pyrimicarbe
 - A302S (toujours en tandem avec F431) est associée à la résistance à divers autres carbamates et organophosphorés



Liaison coefficient de résistance et mutations

Souche	Pyrimicarbe	Triazamate	Demethon S methyl	Omethoate
1081k/171B S431F	340	3	4	25
968E/171B S431F A302S	4500	9	76	150
GSM/S S431F	>600	?	?	?
H-16/S S431F A302S	>600	?	?	?
Colliot/NM1 S431F	3800	?	?	Diméthoate 116



Identification du génotype pour la mutation S431F par PCR-RFLP (*Ssp*I: AATATT)

Sensible : AATATT Résistant: TATATT



Identification de A302S par PCR-RFLP avec *Nae*I

Andrews et al. 2004, Ins. Mol. Biol. 13, 555-561



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Résistance aux pyréthrinoïdes chez *Aphis gossypii*

- Tests toxicologiques réalisés par R. Delorme (INRA Versailles)

Souche Burkina (coton en 1996) CR = 650 pour la deltaméthrine

Etudes de synergie avec le Pipéronyl Butoxyde => coefficient de synergie de 5.25 pour la souche sensible NM1 et de 6.40 pour Burkina ⇔ pas d'intervention des CytP450 donc probablement modification du canal Na⁺ voltage dépendant



Deux phénotypes résistants aux pyréthrinoïdes ont été identifiés chez les insectes: kdr et Super-kdr

- Liaison avec deux mutations ponctuelles dans le gène *Para* codant pour le canal Na⁺ voltage dépendant chez la mouche domestique :
 - L1014F dans le segment transmembranaire 6 du domaine 2 du gène *Para* est liée au phénotype kdr, **mutation kdr**
 - M918T dans la boucle entre les segments 4 et 5 du domaine 2, **mutation super-kdr**, en tandem avec **kdr**



Distribution des mutations chez les insectes

- Mutation en position kdr L1014F ou H ou S :

Heliothis virescens

Blatella germanica

Haematobia irritans

Leptinotarsa decemlineata

Plutella xylostella

Anopheles gambiae,

Culex pipiens

Myzus persicae

- Mutation en position super-kdr :

Haematobia irritans et Myzus persicae (M918T avec kdr)

Bemisia tabaci (M918V sans kdr : pas responsable de la résistance aux pyréthrinoïdes / L925I sans kdr est associée à la résistance)



Séquence de 1739 bp (Aph6 - Dg2) chez *Aphis gossypii*

Alignement des séquences NM1 (sensible) avec Collio (Résistant)

Aph6 ->

CATGGCAATGGATCATCACGACATGGATCCAAATTGGATTCATACTCAACAAGGCTAACGTT **GTAAGTATGACAATACGACATTAATAACAATATAAT** 100
 136
 GTCTATCGATCAACATGAAACCGGTTGAAATGGATGTCGAGCTTACCGAATTAAATTGAATTCTGCTAATTGAATTCCTGCTAATTGAATGCATAACAG **TTTTCAGTG** 200
 Aph8/aph8.2 ->
 CTACGTTGGCGTTGAAGCAGCTCTGAAACTTATGGCTATGAGTCCTAAGTATTACT **TTCCAATGGGCTGGAACATCTTGACTTCATTATCGTAATTCT** 300
 TTCTGTAGTAGAATTGCTCTCGGGTTACCAAGGACTCTCCGTATTGCGTTCATTCGTTGGTGTATTATTTAGTGCCTAACGGTCACTATGC 400
 85
 GATTAAATAAAATCACACTTAACATAATGATTAAAATGTTAACATAGCTTCGAGTATTAAAGTGGCAAATCTGGCC **CACACTTAATCTTTAATA** 500
 AphS2 ->
 Superkdr <- AphR3
 TCAAAAT**ATG**GGTCGAACCATTGGTGCCTTGGTAACCTAACGTTGTGTTGGGCATAATCATATTATTCGCCATTGGTATGCAGCTATTGGAA 600
 TTG 67
 AAAACTACACAG **GTAATCTATAATGTTACAAACAAACAAACGACGGATTGCAAATAAAATTGTGTTTTCACAGAAAAAATGTACTTATTCAAAG** 700
 ACCACGAGCTCCCCGGTGGAACTTCACCGATTTTGCACTCGTTATGATAGTATTGAGTATTATGTGGTGAATGGATTGAATCAATGTGGACTG 800
 <- Aph10 kdr
 CTTACACGTGGAGAACCAACGTGTATACCATTCTTGGCTACTGTTGTACCGTAAC **CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGCATAATGTGT** 900
 ATTACTTAGGAAACATATTAAAGATGCAAACGGCAGGTGGATGACAATTAGGTTAAATGTGGCATAATATTACTCTTGAATTACA 1000
 ATCATCATCCATTATCATTAGGCAATGAAGTTATGTCTCTTACATAACATTTATCACATTAAAAGCCAAAATAATTAAACATACAAATT 1100
 TAATAAATTGTATTGTAAGATAATCTATGGAATATTCTAAATTAAATTAGGTTATTATGCCAAATAATTATTATAATATTGATGTTATTATATA 1200
 770
 TAACTAGTATAAAATAACTATAGTTACAATTAGTGTACTACATGTATTATGTATAGAAAATCTTAATGTAGTTAACCTAACGTTAAAAACA 1300
 AATCAACATAATTATTAATATAACTAATTACGCTTAGTTATTAAATTCAATCATACATTAAATATAGCCATTATTTTATTCGTTA 1400
 TTTTATTACTTTTACTTGATTGATAATTCTGAAAACATTAGCATATTACAATGACTAGTAAAATAAAAAAATATGTGGCGCAGATTCT 1500
 AAAAATTAGCCATAAAACAGATTGAATTACTGTTCTATAAAATTAAATAATTAAATTATTTATGATAAGCCTGAAGCCACATGA 1600
 CGTATGCACTTACGCTCAAATAATGATTATTAGTACTTAATCTTCTGGCGTTGCTGAGTAATTGGCTCGTCAATTACGGTGCCT 1700
 ACGGCT**GATAACGAAACCAATAAGATCGC** 1739
 <- Dg2

Pas de mutation en position kdr

Position Super-kdr Met ATG
 ↓
 Leu TTG
 CTG



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Différences de séquence entre clones sensibles et résistants

Séquence de 140 aa

NM1	AKSWPTLNLLISIMGRTIGALGNLTFLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYTEKM
Colliot	AKSWPTLNLLISILGRTIGALGNLTFLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYTEKM

NM1	YLFKDHELPWNFTDFLHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCLVHGEPCTCIPFFL
Colliot	YLFKDHELPWNFTDFLHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCLVHGEPCTCIPFFL

NM1	ASVVIGNLVVNLFLALLLSNFGSSNLSVPTADNETNK
Colliot	ASVVIGNLVVNLFLALLLSNFGSSNLSVPTADNETNK



Gericou Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Distribution des mutations parmi les clones d'*Aphis gossypii*

Super-kdr

		490	500	510	520	530	540
NM1 de ref.						
c9-6 20.2/3.2	481	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	540				
c9-2 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
pdt 2-6 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAACTGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
pdt 3-6 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAGCCATTGGTGCTTG	507				
pdt 3-7 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAACTGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
pPdt 4-6 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAGCCATTGGTGCTTG	507				
pdt 6-6 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
pdt 6-7 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
liban 4 3.2/20.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
NM1-10 3.2/20.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
reunion 3 3.2/20.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
tunisie2-2 3.2/20.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAACTGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
pdt 4-7 20.2/3.2	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
nm1-9	448	AAATCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	507				
burkina	448	AAACCTGGCCCACACTT---CTTTAATATCAATAATTGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	504				
pdt 2-6 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAACTGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	57				
pdt 4-6 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	57				
c9-2 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	57				
liban 4 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	57				
reunion 3 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAATGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	57				
tunisie2-2 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATAACTGGGTCGAACCATT---CTTG	53				
t25 50 1/21	1	---TCTGGCCCACACTTAATCTTTAATATCAATACTGGGTCGAACCATTGGTGCTTG	57				



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Distribution des mutations parmi les clones d'*Aphis gossypii*

		Kdr	
NM1 de ref.	841	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 900
nm1-9	808	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 867
burkina	805	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 864
pdt 2-6 1/21	358	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 417
pdt 4-6 1/21	358	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 417
c9-2 1/21	358	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 417
liban 4 1/21	358	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 417
reunion 3 1/21	358	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 417
tunisie2-2 1/21	354	ATTCTTCTTGGCTACTGCTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 413
t25 50 1/21	358	ATTCTTCTTGGCTACTGTTGTACATCGGTAAC	CTTGTGGTATGTATAAGTACTGACAATGC 417

Aucune mutation en position kdr chez les résistants

La mutation en position super-kdr M918L suffisante pour conférer la résistance chez *Aphis gossypii*?



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Distribution des mutations parmi les clones *d'Aphis gossypii*

- Les clones sur pomme de terre: CTG (Leu)
- Les clones sur chrysanthèmes: TTG (Leu)
- Les clones sur coton Burkina : TTG (Leu)
- Les clones sur Cucurbitacées: ATG (Met) sensibles



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Mise au point d'un test PCR-RFLP pour génotyper les individus

- Amplification par PCR d'un fragment de 500 bp
... TCAATAATGGGTC...
- RFLP avec *SspI* AATATT => ... TCAATATTGGGTC...
2 fragments, 300 bp et 200 bp ⇔ R1
1 fragment de 500 bp ⇔ S
- RFLP avec *BsrI* ACTGGN => ... TCAATACTGGGTC...
2 fragments, 300 bp et 200 bp ⇔ R2
1 fragment de 500 bp ⇔ S



Résultats préliminaires du génotypage des populations d'*Aphis gossypii* pour *ace1* et pour *Para*

- Sur coton au Burkina :
 - RR *ace1* et R₁S pour Superkdr
- Sur cucurbitacées en France
 - SS *ace1* et SS pour Superkdr
 - RS *ace1* et SS pour Superkdr
- Sur pomme de terre en France
 - RR *ace 1* et SS pour Superkdr
 - RR *ace 1* et R₂S pour Superkdr
 - RR *ace 1* et R₂R₂ pour Superkdr



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Perspectives à court terme

- Vérifier par des tests toxicologiques la corrélation entre résistance aux pyréthrinoïdes et mutation superkdr chez *Aphis gossypii*
- Estimer la fréquence des mutations conférant la résistance au pyrimicarbe et autres carbamates et OP et celle conférant la résistance aux pyréthrinoïdes dans les populations d'*Aphis gossypii*
- Tester l'hypothèse de l'origine multiple de ces mutations parmi des clones d'*A. gossypii* génétiquement divergents.



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti

Remerciements

- INRA Versailles Robert Delorme
- INRA Sophia Antipolis, UMR ROSE
 - Equipe Biopesticides : David Pauron
 - Equipe Biologie des Populations en Interaction :
 - Michèle Salles
 - Pascal Chavigny
 - Jérôme Carletto
 - Roland Vergilino
 - Thomas Guillemaud
 - Laurent Lapchin



Gerico Ouagadougou Dec 2004

Flavie Vanlerberghe-Masutti