



# Devenir du bioinsecticide Bti dans l'environnement et impact sur le développement de résistances chez le moustique

Guillaume Tetreau

► **To cite this version:**

Guillaume Tetreau. Devenir du bioinsecticide Bti dans l'environnement et impact sur le développement de résistances chez le moustique. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. <NNT : 2012GRENV020>. <tel-00813611v2>

**HAL Id: tel-00813611**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00813611v2>**

Submitted on 2 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biodiversité, Écologie, Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Guillaume TETREAU**

Thèse dirigée par **Mme Laurence DESPRES** et  
codirigée par **M. Jean-Philippe DAVID**

préparée au sein du **Laboratoire d'Écologie Alpine (LECA)**  
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV)**

# Devenir du bioinsecticide *Bti* dans l'environnement et impact sur le développement de résistances chez le moustique

Thèse soutenue publiquement le **30 Mai 2012**,  
devant le jury composé de :

**M. Didier FONTENILLE**

Directeur de recherche à l'IRD, Montpellier - Rapporteur

**Mme Christina NIELSEN-LEROUX**

Directrice de recherche à l'INRA, Paris - Rapporteur

**M. Roger FRUTOS**

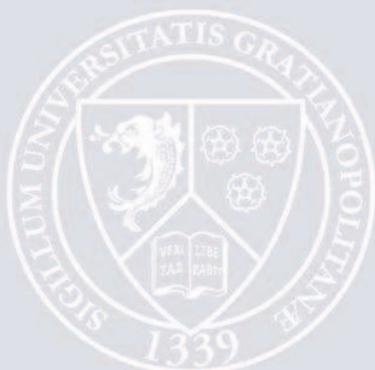
Directeur de recherche au CIRAD, Montpellier - Examineur

**M. Christophe LAGNEAU**

Directeur Recherche et Développement à l'EID, Montpellier - Examineur

**M. Jean-Louis SCHWARTZ**

Professeur à l'Université de Montréal, Québec – Examineur





*« Ce n'est pas dans la science qu'est le bonheur,  
mais dans l'acquisition de la science. »*

*Edgar Allan Poe*



# Remerciements

---

Depuis que je suis au Laboratoire d'Ecologie Alpine, c'est-à-dire depuis mon stage de Master 1, de nombreuses personnes m'ont aidé à faire de ce travail ce qu'il est aujourd'hui. Je vais à mon tour essayer de n'oublier personne et remercier tous ceux qui ont su m'accorder un peu de leur temps et de leur savoir.

Je commencerai tout naturellement par remercier **Laurence DESPRES**, ma directrice de thèse. Tu as su me faire confiance et m'a donné « carte blanche » pour nombre de mes propositions, idées et projets. Cette liberté, difficile à appréhender la première année, a été énormément épanouissante et formatrice tout le reste de ma thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné les moyens d'aller au bout de ce que je voulais et pouvais faire dans cette thèse.

J'aimerais également remercier **Jean-Philippe DAVID**, mon co-directeur de thèse. Tes conseils avisés et ton savoir-faire en transcriptomique et en rédaction d'articles auront été précieux pour moi.

Mes plus sincères remerciements vont à **Didier FONTENILLE** et **Christina NIELSEN-LEROUX** pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à **Roger FRUTOS**, **Christophe LAGNEAU** et **Jean-Louis SCHWARTZ** pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse. J'espère que vous aurez pris autant de plaisir à lire cette thèse que moi à la réaliser et à l'écrire. Merci pour vos remarques constructives et votre implication dans cette tâche. Je tiens également à remercier **Roger FRUTOS** et **Yvan RABHE** qui m'ont particulièrement aidé lors de mon comité de thèse.

Enfin, il convient de remercier ceux sans qui je n'aurais pas pu faire cette thèse. Je remercie donc le jury de l'**Ecole Doctorale Chimie et Science du Vivant**, présidé par **Serge PEREZ**, pour m'avoir octroyé une Allocation Ministérielle me permettant de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions. Merci pour votre confiance, j'espère en avoir été digne.

Je tiens à remercier **Pierre TABERLET** et **Irène TILL-BOTTRAUD** pour leur accueil au sein du laboratoire. Merci d'avoir supporté mon franc-parler, notamment lors des comités de coordination !

Je remercie également **Patrick RAVANEL** pour m'avoir grand ouvert les portes de l'équipe PEX à laquelle je n'appartenais qu'à moitié ! Merci pour ta bonté et ta patience.

## Remerciements

---

Merci à **Stéphane REYNAUD** d'avoir poursuivi cette intégration au sein de l'équipe P3E. Merci à toi, frère Limougeaud, pour m'avoir aidé dans le développement du test ELISA ainsi que pour tous ces moments de rigolades et de délires au café !

Comment oublier **Sylvie VEYRENC**, ma « seconde maman » du labo ? Celle dont les portes se souviennent des coups de gueule ? Celle dont le rire résonne encore dans tous les murs ? Celle dont la bonté et la dévotion à la tâche ne connaissent aucune limite ? Celle sans qui cette thèse n'aurait pas avancé autant qu'elle a avancé ? Dans les moments parfois chaotiques des débuts, tu as su me redonner confiance, m'aider à me poser les bonnes questions, à construire des bases techniques solides qui ont permis à cette thèse de prendre la forme qu'elle a aujourd'hui. Merci « Madame Propre » d'avoir aidé « Monsieur Plus » dans tout ce travail et d'avoir été là du début jusqu'à la fin !

Je ne peux oublier tous mes amis et collègues des 400 coups ! Faisons par ordre chronologique pour éviter tout oubli ou jalouserie :-)) Je commencerai donc par **Fabien LAURENT**, avec qui nous avons formé ce duo de choc, complice et bigrement efficace en Master. Merci pour ces années de délires et pour tout ce qu'on a vécu ! Je remercie également notre Viking, **Aurélien DESAUNAY**, véritable ours comme on n'en fait plus et toujours d'humeur joviale. **Angélique SAN MIGUEL**, merci à toi pour ces blagues espagnoles toujours hilarantes et pour ton sincère dévouement pour les gens qui comptent pour toi ! Merci à **Rodolphe POUPARDIN** dont le vocabulaire, aussi riche soit-il, est étonnamment dépourvu du mot « non ». Merci à toi « MacPoupi la Brocante » pour tous ces moments déliro-ludiques ! N'oublions pas son acolyte et autre monsieur « oui » du labo, **Muhammad Asam RIAZ**. Que serait le laboratoire sans **Mickaël CATINON**, unique inventeur des blagues à plusieurs niveaux de compréhension et véritable « fou volant » en concerts ! Merci à **Thomas BOUCHARDY** pour ses interprétations vocales originales et pour nos délires cinématographiques à bases d' « éther démoniaque » et de tapis souillé sur fond de bowling. Un grand merci à Madame Biochimie **Alexia CHANDOR-PROUST** pour sa gentillesse et cette douce folie. Enfin, merci à **Mathieu FAURE**, mon partenaire de tous les délires mais surtout la personne sur laquelle je pourrai toujours compter, quoi qu'il arrive.

Je remercie également les nouveaux arrivants : **Frédérique FAUCON**, un savant aussi fou mais doué que son prédécesseur, **Christophe REGNAULT**, la personne la plus habile de ses moignons que je connaisse, **Jessica ROUX** à l'accent toulousain enchantant les salles de manip, **Idir AKHOUAYRI**, dont je soupçonne l'ecstasy d'être produit et purifié à partir de son sang, **Myriam REGENT** pour m'avoir aidé lors du « rush » des derniers mois et tous les autres pour m'avoir accompagné cette dernière année ou ces derniers mois de ma thèse !

Un grand merci à tous mes amis de longue date (**Simon, Mélanie, Laurie, Coralie, Tarik**) et plus récents (**Kévin, Claire, Emma, Marie-Audrey**) pour les bons moments passés avec vous !

Merci à mes collègues passés et présents du **Bureau 308** ! Ce fameux sauna où de nombreuses générations de stagiaires, doctorants, post-doctorants et autres chercheurs invités ont pu défiler. Merci à **Anthony PEGARD** pour son humour, ses quiches et son sens poussé de la politesse ; merci à **Bruno LAFOURCADE** pour nos bonnes tranches de rigolade et cette passion commune pour le poireau (et surtout sa chanson !) ; merci à **Sophie PRUD'HOMME** pour son altruisme et ses fous-rires impromptus (et merci à ces pigeons qui les ont permis !) ; merci à **Frédéric LAPORTE** dont l'appétit et le délire sont grands ! Merci à **Carole POILLOT** pour sa bonne humeur et pour avoir supporté toute cette bande de zigotos que nous sommes (que je suis ?!). Merci à **Wasim SHEHZAD** pour être LA gentillesse incarnée ; tous mes efforts pour te rendre méchant auront tous été voués à l'échec... et heureusement !

Je remercie également **Margot PÂRIS** pour son encadrement lors de mon stage de Master 1 et **Aurélié BONIN**, notamment pour avoir managé avec brio l'article issu de mon stage de Master 2.

Je tiens à remercier celles sans qui les chercheurs crouleraient (encore plus) sous les formalités administratives, je veux parler du secrétariat. Merci à **Joëlle CLAUSTRE**, ta joie de vivre même quand je t'ai (souvent ?) apportésyles justificatifs à la dernière minute nous manquent terriblement ! Merci à **Florence SAGNIMORTE** d'avoir repris avec brio cette place vacante et à **Kim PLA**.

Merci à tout le personnel technique, à commencer par le plateau MarMol à savoir **Ludovic GIELLY, Christian MIQUEL, Delphine RIOUX** et **Armelle MONIER** pour leur rigueur et leur aide dans les expérimentations. Merci également à **Joëlle PATOURAUX** pour son aide dans l'élevage des moustiques et la mise en place de bioessais.

Je remercie également **tous les doctorants du laboratoire** pour leur soutien en m'ayant permis de les représenter pendant plus de deux ans au comité de coordination du laboratoire. J'espère avoir été digne de votre confiance et avoir joué mon rôle d'intermédiaire comme il le fallait.

Durant cette thèse, j'ai également eu la chance de collaborer avec différents laboratoires. Je tiens ainsi à remercier **Bernard PRIEM** du CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Vegetales) pour m'avoir aidé lors de mes toutes premières productions de *Bti* et de toxines séparées. Merci également à **Céline LAMPREIA** de l'IAB (Institut Albert Boniot) pour m'avoir initié aux Western Blot. Je souhaite également remercier **Christopher JONES** du Vector Group de la Liverpool School of Tropical Medicine (Liverpool, Royaume-Uni) pour avoir réalisé les hybridations sur les puces à ADN.

## Remerciements

---

Je tiens particulièrement à remercier **Michael ADANG** pour m'avoir chaleureusement accueilli pendant 2 mois au sein de son laboratoire (Université de Géorgie, Etats-Unis) ainsi que dans sa propre maison au début de mon séjour. Merci à **Krishna BAYYAREDDY** pour m'avoir appris tous les secrets des DIGE et pour m'avoir aidé à m'en sortir dans ce monde américain démesuré ! Je remercie également tous les « guys » du labo : **Gang HUA, Qi ZHANG, « doctor » Youngjin PARK, Mohd Amir ABDULLAH, Reben** et **Lohitash** pour leur accueil.

Je tiens également à remercier les EIDs (Entente Interdépartementale pour la Démoustication) Je tiens donc tout particulièrement à remercier **Delphine REY** et **Gilles BESNARD** de l'EID Rhône-Alpes pour leurs précieux conseils, pour m'avoir appris à identifier les différentes espèces de moustiques et pour m'avoir aidé à coordonner l'échantillonnage des larves. Merci à **Christophe LAGNEAU, Claire DUCHET, Yvon PERRIN** et **Albane MARIE** de l'EID Méditerranée pour leur enthousiasme et leur implication dans ce projet. Un grand merci à tous les agents de démoustication (**Jean-Noël, Stéphane, Gilles, Jérôme**) qui m'ont grandement aidé lors des campagnes d'échantillonnage des moustiques.

Je remercie également **Nathalie ARGOUD**, du service de valorisation de la délégation Alpes du CNRS, ainsi que l'ensemble des **services de valorisation du CNRS** pour avoir accepté de déposer notre brevet, même au nom d'une autre structure ! Je remercie donc **Séverine IFFLAND** de la société France Innovations Scientifiques et Transfert ainsi que **Katherine HINTERBERG** de la société REGIMBEAU pour leur rapidité, leur efficacité et leur professionnalisme.

A cheval entre recherche et enseignement, j'ai eu l'occasion d'encadrer plusieurs stagiaires. Je remercie ainsi **Mattia ALESSI** qui a su s'impliquer dans son stage malgré sa déception suite à un refus de dernière minute pour son stage d'origine. Merci également à **Dylann KERSUSAN** pour son aide lors de bioessais et de sélections, toujours faits avec beaucoup d'entrain, de bonne humeur et de rigueur. Je te souhaite bon courage pour ton master en Suède et, qui sait, peut-être reviendras-tu pour une thèse ? Enfin, je tiens tout particulièrement à remercier **Renaud STALINSKI** qui fut mon stagiaire lors de son Master 1 et 2. Notre complicité tant dans les gîtes à moustiques que dans les salles de labo fut un réel plaisir. J'ai ainsi découvert un chercheur en devenir de qualité et un véritable ami.

Si la recherche est une passion, elle ne serait rien sans cette autre flamme qu'est l'enseignement. J'ai toujours aimé partager et communiquer, mais je tiens tout particulièrement à remercier **Agnès GERMOT** et **Daniel PETIT**, de l'Université de Limoges, qui ont su, par leur implication et leur passion, me donner l'envie d'enseigner. Daniel, merci également d'avoir été le premier à m'initier aux joies de la recherche ; avoir mon nom à tes côtés sur cette publication est une grande fierté pour moi.

Je remercierai donc ceux qui m'ont aidé dans cette mission d'enseignement à commencer par les directeurs du CIES, **Pierre THIBAUT** et feu **Didier RETOUR**. Je tiens à saluer l'homme que vous étiez : humain, compréhensif et visionnaire ; c'est un grand honneur d'avoir pu travailler avec vous. Je remercie également celles sans qui les rouages du CIES n'auraient pas tourné : **Michelle VUILLET** et **Régine HERBELLES**. Merci pour votre aide dans la compréhension des (nombreuses et complexes) réformes !

Je remercierai en tout premier lieu **François POMPANON** pour avoir accepté d'être mon tuteur lors de mes trois années de monitorat. Je remercie également **Stéphane BEC** pour m'avoir permis de refondre plusieurs TD et ainsi m'avoir laissé expérimenter de nouvelles approches d'enseignement. Merci à **Muriel RAVETON** pour m'avoir permis de réaliser des cours magistraux en Ecotoxicologie, expérience qui a cristallisé tout ce que j'adore dans le métier d'enseignant. Je remercie tous ceux avec qui je suis intervenu au long de mes quatre années d'enseignement ; **Guy WITTEBOLLE** et son roulage de cigarette légendaire, **Guillaume ALLORENT** pour notre duo humoristique décalé mais rigoureux, **Jean-Christophe CLEMENT**, le « sexy boy » strict mais juste, et merci à tous les autres dont les noms ne me reviennent pas !

Je tiens particulièrement à remercier les différents intervenants du CUBE (Centre Universitaire de Biologie Expérimentale) pour leur disponibilité lors des enseignements mais également pour m'avoir aidé au niveau du matériel lors de grosses expérimentations de ma thèse. Je remercie ainsi tout particulièrement **Patrick MERESSE** et **Nelly BOURRIN**.

Je tiens également à remercier toutes les personnes des services administratifs de l'Université Joseph Fourier. Je commencerai par **Laurence SALSON-RIVIERE** pour ses réponses rapides et toujours complètes aux (nombreuses ?) questions que j'ai pu lui poser. Merci à tous ces sourires qui peuplent le bureau des Licences et des Masters de l'UFR de Biologie à savoir **Liliane ESCOFFIER**, **Maryse GEORGES** et **Brigitte SABIN**. Votre entrain et votre dynamisme sont toujours un plaisir ! Je remercie également **Magali POURTIER**, secrétaire de l'EDCSV, pour sa réactivité et sa disponibilité.

Qui dit faire une thèse, dit aussi être capable de faire autre chose que sa thèse. La procrastination est cet art dans lequel nombre m'ont aidé et accompagné ! Je remercie ainsi blondin, Psyca, Gaasama, BlackPanther, Steel, Bubulinette, Ladyhawke, Miss Univers, draxtome, kazkapointe, Gillou Penfaou, minaco, et tous ces autres « **Moustiques Hémophiles** » qui ont su me changer les idées et nous permettre d'atteindre notre 2<sup>ème</sup> place bien méritée au panthéon des meilleures guildes de Shakes & Fidget !

## Remerciements

---

Dans cette même idée, je remercie le café et le thé, ainsi que les pains au chocolat, croissants, pains aux raisins, gâteaux en tous genres (sujets à concours ou non !) et autres gourmandises et occasions propices à des rassemblements informels de gens dont la compagnie ne me lassera jamais ! Merci à tous pour ces pauses et moments de franches rigolades qui ont été des bouffées d'oxygène durant ma thèse.

Je finirai ces remerciements par les gens qui comptent le plus à mes yeux. Ainsi, je ne remercierai jamais assez **mes parents** pour leur soutien indéfectible. Malgré les galères, ils ont toujours cru en moi et m'ont soutenu quelle que soit la voie que je décide de prendre. Cette thèse n'est que le reflet de toute la confiance que vous avez su m'accorder et je vous en serai toujours éternellement reconnaissant. Je remercie également toute **ma famille**, mes grands-parents, mon oncle Jacky, ma cousine Emilie, Marc, Elisabeth, Bertrand, Renaud et Véronique pour leur présence et leur soutien dans les moments difficiles que nous avons traversé.

Je vais clore cette section par deux personnes qui comptent plus que tout pour moi. **Aurélie**, tu as su me soutenir, me supporter, me recadrer, me bousculer, me reconforter, me faire rire, bref me faire vivre tout au long de cette thèse. Je n'aurais jamais pu aller aussi loin sans toi. Aucun mot ne saurait retranscrire tout ce que tu m'as apporté. Et parmi tout ce que tu m'as apporté, la plus belle est notre fille, **Morgane**, concentré de joie de vivre et de dynamisme. Même si les premières nuits ne furent pas de tout repos, ton sourire et ta présence aptes à calmer une journée d'énervement en quelques secondes seulement ont été maintes fois salvateurs. Merci à vous deux. Je vous aime.





# Avant-propos

---

Cette thèse déposée à l'école doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV) de l'Université Joseph Fourier (UJF) résume le travail réalisé au Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) depuis Octobre 2008. La vidéo de la soutenance orale de cette thèse est disponible à l'adresse suivante : [www.youtube.com/watch?v=RLq4gMX5kCc](http://www.youtube.com/watch?v=RLq4gMX5kCc)

Les trois premières années de cette thèse ont été financées par un contrat d'allocataire de recherche couplé à contrat de moniteur. Depuis Octobre 2011, je suis financé grâce à un poste d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) à l'UFR de Biologie de l'UJF. Les expérimentations ont été financées par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-CES-006-01 DIBBECO) et par un financement CIBLE 2008 de la région Rhône-Alpes. Ce travail a donné lieu à la rédaction de sept articles (5 publiés, 1 sous presse et 1 soumis) et d'un brevet (n°FR1160365), à cinq communications orales lors de congrès (3 nationaux et 2 internationaux) et à l'encadrement de trois stagiaires (Master 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années « Biodiversité, Ecologie et Environnement »). Durant cette thèse, j'ai également pu m'exercer et m'épanouir dans le métier d'enseignant, à mon sens indissociable de celui de chercheur.





# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>15</b>
<b>I. DES MOUSTIQUES ET DES HOMMES</b> .....	<b>15</b>
A. <i>Une cohabitation difficile</i> .....	15
B. <i>Le moustique : sa vie, son œuvre</i> .....	16
1. Biologie du moustique et cycle de développement.....	16
2. Le moustique, tueur malgré lui.....	19
C. <i>Un monde sans moustique</i> .....	22
1. Éradiquer le moustique : est-ce souhaitable ?.....	22
2. Éradiquer le moustique : est-ce réalisable ?.....	22
3. Vers l'éradication de maladies : l'homme comme nouveau prédateur.....	23
<b>II. DE L'ART DE TUER DES MOUSTIQUES</b> .....	<b>24</b>
<b>III. BACILLUS THURINGIENSIS (BT)</b> .....	<b>28</b>
A. <i>Historique et description</i> .....	28
B. <i>Diversité des toxines produites par Bacillus thuringiensis</i> .....	29
C. <i>Les toxines Cry</i> .....	31
1. Structure des toxines Cry.....	31
2. De l'ingestion à l'infection : mode d'action des toxines Cry.....	32
a) Etape I : ingestion (Figure 12, I).....	32
b) Etapes II & III : solubilisation et activation (Figure 12, II & III).....	33
c) Etapes IV : fixation au(x) récepteur(s) membranaire(s) (Figure 12, IV).....	33
(1) Cadhérines.....	33
(2) N-Aminopeptidases (APN).....	34
(3) Phosphatases alcalines (ALP).....	35
(4) Autres types de récepteurs.....	35
(5) Implication des récepteurs dans la mort cellulaire : les modèles.....	35
d) Etapes V à VII : de l'oligomérisation à l'infection (Figure 12, V, VI & VII)	37
D. <i>Les toxines Cyt</i> .....	38

1. Structure des toxines Cyt.....	38
2. Mode d'action des toxines Cyt .....	38
E. Synergie des toxines Cry et Cyt.....	39
<b>IV. LE <i>BTI</i>, L'INSECTICIDE « PARFAIT » ?.....</b>	<b>39</b>
A. Quand la science se veut dogmatique .....	39
B. Une faille dans le modèle .....	41
<b>V. VERS UNE UTILISATION RAISONNEE DU <i>BTI</i> : PLAN DE THESE.....</b>	<b>42</b>
<b>CHAPITRE I : DEVENIR DU <i>BTI</i> DANS L'ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>43</b>
<b>I. PERSISTANCE DU <i>BTI</i> DANS L'ENVIRONNEMENT.....</b>	<b>43</b>
A. Paramètres influant sur l'activité résiduelle du <i>Bti</i> .....	43
B. Persistence des cristaux de <i>Bti</i> .....	44
C. Persistence et recyclage des spores de <i>Bti</i> .....	45
D. Outils de détection du <i>Bti</i> dans l'environnement.....	45
<b>II. DEVELOPPEMENT DE L'OUTIL.....</b>	<b>47</b>
A. « Avant de rêver, il faut savoir » ( <i>Jean Rostand, Pensées d'un biologiste, 1967</i> ).....	47
B. De l'extraction à la détection des toxines du <i>Bti</i> .....	49
1. Protocole d'extraction des toxines du <i>Bti</i> à partir de matrices environnementales .....	49
2. Détection des toxines du <i>Bti</i> par ELISA.....	51
C. Tests de spécificité des anticorps .....	52
1. Production des toxines du <i>Bti</i> séparément.....	52
2. Test des anticorps primaires (IgG2) .....	54
3. Test des anticorps secondaires (IgG1) .....	55
4. Test des couples IgG1 – IgG2.....	56
5. Test de spécificité du couple IgG1 – IgG2 avec toxines en compétition .....	56
D. Gammes de toxines séparées.....	57
1. Purification et conservation des toxines .....	58
2. Gammes de toxines .....	58
E. Validation de l'outil.....	60
1. Gammes de <i>Bti</i> commercial .....	60
a) Détection des toxines par ELISA .....	60
b) Calcul des proportions de chaque toxine .....	61

2.	Extraction des toxines à partir de litières végétales contaminées .....	62
a)	Efficacité de l'extraction .....	62
b)	Calcul des proportions de chaque toxine .....	63
<b>III.</b>	<b>APPLICATION DE L'OUTIL.....</b>	<b>64</b>
A.	<i>Caractérisation des litières toxiques.....</i>	<i>64</i>
B.	<i>Persistance différentielle des toxines.....</i>	<i>67</i>
1.	Démarche expérimentale .....	67
2.	Analyse des résultats.....	68
C.	<i>Cyt, une toxine au comportement singulier.....</i>	<i>70</i>
1.	Démarche expérimentale .....	71
2.	Analyse des résultats.....	73
D.	<i>Application à grande échelle.....</i>	<i>77</i>
<b>IV.</b>	<b>VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DU DEVENIR DU <i>BTI</i> DANS L'ENVIRONNEMENT ...</b>	<b>77</b>
A.	<i>Amélioration de l'outil.....</i>	<i>77</i>
B.	<i>Discussion des résultats et perspectives.....</i>	<i>79</i>
<b>CHAPITRE II : CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AU <i>BTI</i> CHEZ LE MOUSTIQUE EN LABORATOIRE .....</b>		<b>81</b>
<b>I.</b>	<b>MIEUX COMPRENDRE LES MECANISMES DE RESISTANCE POUR MIEUX LA GERER.....</b>	<b>81</b>
A.	<i>Qu'est-ce que la résistance ?.....</i>	<i>81</i>
B.	<i>Facteurs influant sur l'apparition et la propagation de la résistance aux pesticides</i>	<i>82</i>
1.	Facteurs influant sur l'apparition de la résistance .....	82
a)	Apparition d'un allèle de résistance par une nouvelle mutation.....	83
b)	Implantation de la résistance à partir du « polymorphisme génétique initial » de la population.....	84
c)	Des modèles non mutuellement exclusifs .....	85
2.	Propagation de la résistance entre populations : le rôle complexe de la migration .....	86
<b>II.</b>	<b>RESISTANCE AU <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>.....</b>	<b>88</b>
A.	<i>Modification des récepteurs membranaires (Figure 46, étape IV).....</i>	<i>89</i>
B.	<i>Modification des activités enzymatiques intestinales (Figure 46, étape III).....</i>	<i>90</i>
C.	<i>Autres mécanismes pouvant contribuer à la résistance .....</i>	<i>91</i>

<b>III. CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AU <i>Bti</i> CHEZ LES MOUSTIQUES.....</b>	<b>92</b>
A. <i>Du choix du modèle à la sélection de la résistance.....</i>	93
1. Le moustique : un modèle de choix .....	93
2. Sélection de la résistance au <i>Bti</i> : la souche LiTOX.....	95
a) Protocole de sélection avec la litière toxique.....	95
b) Mesure de l'évolution de la résistance.....	95
(1) Méthode de mesure de la résistance.....	95
(2) Evolution de la résistance chez la souche LiTOX.....	96
B. <i>Etude de la résistance chez la souche LiTOX.....</i>	98
1. Etudier la résistance par des approches globales.....	99
a) Etude de la résistance au niveau génomique .....	99
(1) L'approche par « scans génomiques ».....	99
(2) L'approche QTL.....	103
b) Etude de la résistance par transcriptomique.....	104
c) Approches transcriptomique/protéomique sur intestins de larves de moustiques .....	105
(1) Matériel et méthodes .....	105
(a) Description et extraction des intestins de moustiques .....	106
(b) Protocole d'analyse par transcriptomique .....	107
(c) Protocole d'analyse par protéomique .....	109
(2) Résultats des analyses globales .....	112
(a) Analyse par transcriptomique .....	112
(b) Analyse globale par protéomique .....	113
(c) Recherche de domaines GPI.....	114
(d) Combinaison des approches transcriptomique et protéomique.....	117
(3) Gènes et protéines différentiellement exprimés chez la souche LiTOX	
117	
(a) Expression différentielle des métalloprotéinases.....	118
(b) Implication des récepteurs membranaires .....	119
(c) Les V-ATPases : une double implication ? .....	121
(d) Calréticulines.....	123
(e) Enzymes de détoxification .....	124
(4) Conclusions et perspectives .....	124

2. Analyses fonctionnelles des mécanismes de résistance potentiels identifiés	125
.....	125
a) Rôle des protéases dans la résistance	125
(1) Bioessais comparatifs avec des toxines activées	125
(a) Etat de l'art	125
(b) Mise en place du protocole	127
(c) Résultats et discussion	128
(2) Caractérisation des enzymes de la lumière intestinale et rôle dans la	
résistance	130
(a) Extraction des enzymes de la lumière intestinale	130
(b) Mesure de l'activité protéolytique totale	130
(c) Mesures d'activités protéolytiques spécifiques	131
(i) Mesure d'activités protéolytiques spécifiques par l'utilisation	
d'inhibiteurs	132
(ii) Mesure d'activités protéolytiques spécifiques par l'utilisation de	
différents substrats	133
(d) Activation des protoxines Cry par les protéases de la lumière	
intestinale	135
(e) Caractérisation des protéases présentes dans les extraits	
enzymatiques	138
(f) Conclusion sur l'implication des protéases dans la résistance au Bti	140
b) Implication des récepteurs membranaires dans la résistance	140
<b>IV. VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES MECANISMES DE RESISTANCE AU <i>BTI</i> CHEZ LE</b>	
<b>MOUSTIQUE</b>	<b>144</b>
A. Apport de l'étude de la souche <i>LiTOX</i>	144
B. Décortiquer la résistance au Bti	146
<b>CHAPITRE III : RECHERCHE DE RESISTANCE AU <i>BTI</i> CHEZ LE MOUSTIQUE EN</b>	
<b>POPULATIONS NATURELLES</b>	<b>149</b>
<b>I. RECHERCHER UNE RESISTANCE EN POPULATIONS NATURELLES</b>	<b>149</b>
A. Les bioessais : une approche simple mais contraignante	149
B. Quid du choix de la référence ?	149
<b>II. RECHERCHER UNE RESISTANCE CRYPTIQUE AU <i>BTI</i></b>	<b>151</b>

A. <i>Synopsis de l'étude</i> .....	151
B. <i>Espèces étudiées</i> .....	152
C. <i>Prospection et échantillonnage des larves</i> .....	153
D. <i>Mesure de la tolérance des populations au Bti et aux toxines Cry</i> .....	154
1. <i>Méthode employée</i> .....	154
2. <i>Résultats des bioessais et discussion</i> .....	156
a) <i>Analyse globale</i> .....	156
b) <i>Comparaisons intra- et inter-populations</i> .....	156
(1) <i>Comparaison des populations d'<i>Aedes rusticus</i></i> .....	157
(2) <i>Comparaison des populations d'<i>Aedes sticticus</i></i> .....	157
(3) <i>Comparaison des populations d'<i>Aedes vexans</i></i> .....	158
(4) <i>Comparaisons inter-espèces</i> .....	160
E. <i>Vers le développement d'un outil de détection de la résistance au Bti</i> .....	160
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>163</b>
<b>I. DEVENIR DU <i>BTI</i> DANS L'ENVIRONNEMENT</b> .....	<b>163</b>
A. <i>Un outil efficace mais encore imparfait</i> .....	163
B. <i>Un comportement complexe pour un insecticide composite</i> .....	164
C. <i>Que se passe-t-il donc dans les gîtes larvaires ?</i> .....	165
D. <i>De la persistance à la résistance</i> .....	167
<b>II. CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AU <i>BTI</i></b> .....	<b>167</b>
A. <i>Que nous ont appris les approches globales ?</i> .....	167
B. <i>Validations fonctionnelles : quelles approches envisager ?</i> .....	170
1. <i>ARN interférence</i> .....	170
2. <i>Expression des récepteurs en système hétérologue</i> .....	172
3. <i>Transgénèse chez les moustiques</i> .....	172
C. <i>Décortiquer la résistance au Bti</i> .....	173
<b>III. AMELIORER LA DETECTION ET LA GESTION DE LA RESISTANCE</b> .....	<b>174</b>
A. <i>Apport des outils développés lors de cette thèse</i> .....	174
B. <i>Bti, what else ?</i> .....	175
<b>IV. CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>178</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b> .....	<b>205</b>

<b>ARTICLE I .....</b>	<b>207</b>
<b>ARTICLE II .....</b>	<b>221</b>
<b>ARTICLE III.....</b>	<b>235</b>
<b>ARTICLE IV .....</b>	<b>245</b>
<b>ARTICLE V.....</b>	<b>255</b>
<b>ARTICLE VI .....</b>	<b>291</b>
<b>ARTICLE VII.....</b>	<b>301</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>323</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>325</b>
<b>ANNEXE II .....</b>	<b>327</b>
<b>ANNEXE III.....</b>	<b>345</b>
<b>ANNEXE IV .....</b>	<b>351</b>
<b>ANNEXE V.....</b>	<b>355</b>



## Liste des abréviations

ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
AFLP	<u>A</u> mplified <u>f</u> ragment <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism
ALP	<u>A</u> lkaline <u>p</u> hosphatase
APN	<u>A</u> mino <u>p</u> eptidase <u>N</u>
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
BAPNA	N $\alpha$ - <u>b</u> enzoyl-L- <u>a</u> rginine- <u>p</u> -nitro <u>a</u> nilide
BBMV	<u>B</u> rush <u>b</u> order <u>m</u> embrane <u>v</u> esicles (vésicules de membranes intestinales)
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
<i>Bs</i>	<u>B</u> acillus <u>s</u> phaericus
<i>Bt</i>	<u>B</u> acillus <u>t</u> huringiensis (terme générique)
<i>Bti</i>	<u>B</u> acillus <u>t</u> huringiensis var. <u>i</u> sraelensis
<i>Btj</i>	<u>B</u> acillus <u>t</u> huringiensis var. <u>j</u> egathesan
<i>Btk</i>	<u>B</u> acillus <u>t</u> huringiensis var. <u>k</u> urstaki
DArT	<u>D</u> iversity <u>a</u> rray <u>t</u> echnology
DDT	<u>D</u> ichlorodiphényl <u>t</u> richloroéthane
DEAE FF	<u>D</u> iéthylaminoéthyl <u>f</u> ast <u>f</u> low
DEET	N,N- <u>d</u> iéthyl-3- <u>m</u> éthylbenzamide
DGETP	<u>D</u> igital <u>g</u> ene <u>e</u> xpression <u>t</u> ag <u>p</u> rofilng
DIGE	<u>D</u> ifferential <u>i</u> n <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
DTT	<u>D</u> i <u>t</u> hio <u>t</u> hréitol
ECL	<u>E</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence
EDTA	<u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etracetic <u>a</u> cid
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> (=par exemple)
EID	<u>E</u> ntente <u>i</u> nterdépartementale pour la <u>d</u> émoustication
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (=et les autres)
FAAK	N-(3-[2- <u>f</u> uryl] <u>a</u> cryloyl)- <u>a</u> lanine-lysine
FAPP	N-(3-[2- <u>f</u> uryl] <u>a</u> cryloyl)- <u>p</u> henylalaline- <u>p</u> henylalaline
FIA	<u>F</u> reund <u>i</u> ncomplete <u>a</u> djuvant
GPI	<u>G</u> lycosyl- <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
HPLC	<u>H</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
HRP	<u>H</u> orse <u>r</u> addish <u>p</u> eroxidase (peroxidase de raifort)
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (=c'est-à-dire)
IgG1/IgG2	<u>I</u> mmunoglobuline G1/G2
IRAC	<u>I</u> nsecticide <u>r</u> esistance <u>a</u> ction <u>c</u> ommittee

## Liste des abréviations

---

LB	<u>L</u> ysogeny <u>b</u> roth
LC <sub>50</sub>	<u>L</u> ethal <u>c</u> oncentration for <u>50</u> % of the population
LSTM	<u>L</u> iverpool <u>s</u> chool of <u>t</u> ropical <u>m</u> edicine
MS/MS	Tandem <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry
OGM	<u>O</u> rganisme <u>g</u> énétiquement <u>m</u> odifié
OMS	<u>O</u> rganisation <u>m</u> ondiale de la <u>s</u> anté
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PI-PLC	<u>P</u> hosphatidy <u>i</u> nositol- <u>p</u> hospho <u>l</u> ipase <u>C</u>
PKA	<u>P</u> rotéine <u>k</u> inase <u>A</u>
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luoride
RR <sub>50</sub>	<u>R</u> atios de <u>r</u> ésistance calculés à partir des LC <sub>50</sub>
RT-qPCR	<u>R</u> everse- <u>t</u> ranscription <u>q</u> uantitative <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
SAApNA	N- <u>s</u> uccinyl- <u>a</u> lanine- <u>a</u> lanine-proline-phenylalanine- <u>p</u> - <u>n</u> itro <u>a</u> nilide
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SNP	<u>S</u> ingle- <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism
t <sub>1/2</sub>	<u>T</u> emps de demi-vie
TCA	<u>T</u> richloro <u>a</u> cetic acid
TLCK	<u>T</u> osyl-L-lysine <u>c</u> hloromethyl <u>k</u> etone
TMB	3,3',5,5'- <u>T</u> etra <u>m</u> ethyl <u>b</u> enzidine
TPCK	<u>T</u> osyl-L-phenylalanine <u>c</u> hloromethyl <u>k</u> etone
TSB	<u>T</u> ryptic <u>s</u> oy <u>b</u> roth
UTI	<u>U</u> nités <u>t</u> oxiques <u>i</u> nternationales
Vip	<u>V</u> egetative <u>i</u> nsecticidal <u>p</u> roteins

## Liste des figures

- Figure 1. Cycle de vie de moustiques du genre *Aedes*. .....17
- Figure 2. Illustrations de larves de moustiques des genres *Aedes*, *Anopheles* et *Culex*. Adapté d'une image de Wikipédia. ....17
- Figure 3. Illustrations de moustiques *Aedes aegypti* adultes. Les flèches en rouge indiquent les antennes plumeuses des mâles. Adapté de (Goeldi, 1905) .....19
- Figure 4. Aire de répartition du moustique *Aedes albopictus* en 2007. L'aire de répartition originelle du moustique est signalée en bleu et les zones d'introduction en vert. Adapté d'une image de Wikipédia. ....23
- Figure 5. Schéma d'illustration de la dynamique d'un écosystème simple perturbé par un traitement insecticide. La taille des individus traduit l'abondance relative de l'espèce dans l'écosystème. L'épaisseur des flèches rouges traduit l'importance de la prédation. ....24
- Figure 6. Multiples aspects de la lutte contre le moustique et les maladies qu'il transmet. Sources des illustrations : <http://www.eid-med.org/> et <http://moustiquesinfos.sante.gouv.fr> ..25
- Figure 7. Publicité pour du papier peint pour chambres d'enfants imprégné de DDT fabriqué par l'entreprise TRIMZ (gauche) et publicité pour le DDT à pulvériser de l'entreprise Killing Salt Chemicals (droite). Le texte de gauche affirme que le papier peint n'est « pas dangereux pour les enfants, adultes, animaux et vêtements. Certifié absolument sûr pour une utilisation dans la maison ! » Source : <http://thesocietypages.org/socimages/2011/06/page/2/> .....26
- Figure 8. Croissance et sporulation des bactéries *Bti* en fonction du temps. Le milieu est inséminé (A). Lors de la phase exponentielle (B), les bactéries vont consommer le milieu (ou l'hémolymphes de l'insecte). Une fois que les ressources du milieu sont quasiment épuisées, les bactéries commencent à produire les cristaux protéiques et les formes de résistance (spores) (C). Une fois le milieu complètement épuisé, la libération des spores et des cristaux se réalise par éclatement de la bactérie, marqué par une chute de la densité optique du milieu de culture (D). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique avec une coloration de Gram (A, B, C) ou sans coloration (D) (G = 1.000X). .....28
- Figure 9. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en phase de sporulation (gauche) et cristal de *Bti* (droite). Sp, spore; IC, inclusion cristalline. Adapté de (Federici *et al.*, 2003). .....29
- Figure 10. Représentation circulaire du plasmide pBtoxis provenant de la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Code couleur des gènes : gris, toxine et peptide antibiotique ; rose, transposon ; orange, hypothétique gène conservé ; rouge, métabolisme de l'ADN ; bleu, régulation ; vert foncé, protéines de surface ; vert clair, inconnu ; jaune, métabolisme. Les nombres à l'extérieur du cercle indiquent la taille en kilopaires de bases. Source : (Berry *et al.*, 2002). ....30
- Figure 11. Structures tridimensionnelles de trois toxines Cry toxiques pour les Lépidoptères (Cry1Aa, gauche), pour les Coléoptères (Cry3Aa, centre) et pour les Diptères (Cry4Ba, droite). Le domaine I (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine II (feuillet bêta) en vert et le domaine III (feuillet bêta) en rouge. Adapté de (Angsuthanasombat *et al.*, 2004).....31
- Figure 12. Mode d'action simplifié des toxines Cry chez une larve d'insecte. Les chiffres romains indiquent les différentes étapes du mode d'action. Les toxines sont représentées en vert et les spores en bleu. Adapté de (Bravo *et al.*, 2007). ....32

- Figure 13. Protoxines et toxines toxiques pour les Lépidoptères (Cry1Aa, gauche), pour les Coléoptères (Cry3Aa, centre) et pour les Diptères (Cry4Ba, droite) activées par les protéases bactériennes et intestinales des larves d'insectes cibles. Les tailles en kilodaltons sont indiquées à côté des fragments. La toxine activée est hachurée et les régions tronquées de la protoxine sont symbolisées en pointillés. Adapté de (Rukmini *et al.*, 2000). .....33
- Figure 14. Cadhérine insérée dans la membrane d'une cellule d'insecte. Légende : DT, Domaine Transmembranaire ; C, domaine cytoplasmique. Adapté de (Pigott et Ellar, 2007). .....34
- Figure 15. Illustration des trois modèles de fixation des toxines Cry aux récepteurs de la membrane épithéliale intestinale d'insectes. Le modèle de Bravo est représenté en orange, celui de Jurat-Fuentes en vert et celui de Zhang en violet. CAD, Cadhérine ; APN, N-aminopeptidase ; ALP, Phosphatase alcaline ; PKA, Protéine Kinase A. Sources : (Jurat-Fuentes et Adang, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Bravo *et al.*, 2007; Soberon *et al.*, 2009; Likitvivatanavong *et al.*, 2011b). .....36
- Figure 16. Diagramme de Richardson d'un trimère de toxines Cry4Ba vu de dessus. Les domaines à feuillets bêtas sont représentés en bleu (Domaine II) et en rouge (Domaine III). Le domaine en hélices alpha (domaine I) est représenté de plusieurs couleurs : vert ( $\alpha$ 3), violet ( $\alpha$ 4), jaune ( $\alpha$ 5), bleu ( $\alpha$ 6) et rouge ( $\alpha$ 7). Les trois toxines sont différenciées par des apostrophes et délimitées par des lignes en pointillés. Un triangle marque l'emplacement du pore. Adapté de (Boonserm *et al.*, 2005). .....37
- Figure 17. Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1Aa complète (gauche), de la partie C-terminale (centre) et N-terminale (droite). Les hélices alpha sont indiquées par des lettres majuscules et les feuillets bêtas par des numéros. Adapté de (Butko, 2003; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2011). .....38
- Figure 18. Toxicité des litières végétales en fonction de leur état de décomposition pour des larves d'*Aedes aegypti* exposées à 3 g/L de litière d'Aulne (*Alnus glutinosa*) finement broyée. Adapté de (David *et al.*, 2000). .....41
- Figure 19. Paramètres influant sur la disponibilité du *Bti* pour les larves de moustiques. Les facteurs biologiques sont indiqués en bleu, les facteurs environnementaux en vert et les facteurs opérationnels en rouge. Adapté de (Boisvert et Lacoursière, 2004). .....43
- Figure 20. Plan schématique de la démarche expérimentale du chapitre I. ....47
- Figure 21. Représentation schématique du protocole d'extraction des toxines de *Bti* à partir de matrices environnementales (ici de litières végétales). Ce protocole est protégé par le brevet n° FR 11 60365. ....49
- Figure 22. Représentation schématique du principe du test ELISA en sandwich. Les étapes de A à I représentent ce qui se passe dans un puits d'une plaque ELISA de 96 puits. La toxine est schématisée par un rond rouge, l'anticorps primaire (IgG2) par un "Y" orange, l'anticorps secondaire (IgG1) par un "Y" bleu et l'anticorps de détection couplé à l'enzyme par un "Y" avec une étoile, symbolisant l'enzyme. ....51
- Figure 23. Représentation schématique des bactéries produisant les toxines du *Bti* séparément. Les clones insérés dans la bactérie sont indiqués. Les clones pHT606 et pHT618, développés par l'institut Pasteur (Paris), ont été récupérés auprès de Maria Helena Lobo da Silva Filha (Brésil) et les clones pWF53 et pWF45 ont été récupérés auprès de Brian Federici (Californie, USA). Les protoxines produites sont visualisées sur un gel de protéine SDS-PAGE et leur taille en kilodaltons (kDa) est indiquée. Les tailles en kDa du marqueur de taille sont indiquées en vert sur la gauche de chaque gel. ....52

- Figure 24. Schéma illustrant les tests de spécificité des anticorps, ici pour Cry11Aa. Les anticorps secondaires (IgG2) sont indiqués en bleu, les toxines en rouge et les anticorps primaires (IgG1) en orange, reprenant les codes couleurs de la Figure 22 dans un souci de cohérence. ....53
- Figure 25. Plans de dépôt des toxines (gauche), des IgG2 testées (haut) et IgG1 spécifiques (bas) utilisés pour le test de la spécificité des IgG2. Les IgG1, IgG2 et la toxine Cry4Aa sont représentés en vert, Cry4Ba en orange, Cry11Aa en jaune et Cyt1Aa en rouge. Les lettres A à D correspondent aux concentrations des toxines : A, 0 ; B, 50 ; C, 100 et D, 150 ng/mL...54
- Figure 26. Résultats obtenus (haut) en densité optique mesurées à 450 nm et résultats attendus (bas). Les résultats attendus positifs sont surlignés en vert, les résultats attendus négatifs en rouge.....54
- Figure 27. Plans de dépôt des toxines (gauche), des IgG2 spécifiques (haut) et IgG1 testées (bas) utilisés pour le test de la spécificité des IgG2. Les IgG1, IgG2 et la toxine Cry4Aa sont représentés en vert, Cry4Ba en orange, Cry11Aa en jaune et Cyt1Aa en rouge. Les lettres A à D correspondent aux concentrations des toxines : A, 0 ; B, 50 ; C, 100 et D, 150 ng/mL...55
- Figure 28. Résultats obtenus (haut) en densité optique mesurées à 450 nm et résultats attendus (bas). Les résultats attendus positifs sont surlignés en vert, les résultats attendus négatifs en rouge.....55
- Figure 29. Schéma illustrant les tests de spécificité des couples d'anticorps IgG1 – IgG2 lorsque les toxines sont en compétition avec les autres toxines du *Bti*. ....57
- Figure 30. Densités optiques mesurées à 450 nm en fonction de concentrations croissantes en toxine Cry4Ba (A), Cry11Aa (B) et Cyt1Aa (C) exprimées en ng/mL. Les valeurs de chaque jour regroupent entre 2 et 4 gammes réalisées sur des plaques différentes.....59
- Figure 31. Densités optiques mesurées à 450 nm en fonction de concentrations croissantes en *Bti* exprimées en µg de produit formulé par mL d'eau distillée. Les valeurs de DO obtenues pour les anticorps anti-Cry4 (losanges bleus), anti-Cry11 (carrés rouges) et anti-Cyt (triangles verts) sont présentés à gauche. Pour plus de lisibilité, les résultats obtenus avec les anticorps anti-Cyt sont également présentés seuls à droite. Chaque mesure est réalisée en triplicats. Erreur : écart-type. ....60
- Figure 32. Densités optiques mesurées à 450 nm pour des extraits de litières contaminées avec des concentrations croissantes en *Bti* commercial (Vectobac WG). Les extraits sont analysés à l'aide d'anticorps anti-Cry4 (A, bleu), anti-Cry11 (B, rouge) et anti-Cyt (C, vert). Chaque mesure est réalisée en triplicats. Le nombre de colonies de type *Bacillus cereus* à partir de dilutions à 1/100 est également indiqué en fonction de la concentration en *Bti* dans l'échantillon (D, violet). Erreur : écart-type.....63
- Figure 33. Densités optiques mesurées à 450 nm pour les deux litières toxiques de peuplier (P26 et P23) et d'aulne (Aul1 et Aul2). RT1 à RT4 représentent les quatre réplicats techniques et RE1 à RE6 représentent les six réplicats d'extractions réalisés. Les densités optiques moyennes sont surlignées en jaune pour chaque litière et chaque toxine. Les échantillons sont tous dilués trois fois.....65
- Figure 34. Plan de l'expérience réalisée pour étudier le devenir des toxines du *Bti* en contact avec de la litière végétale. Auteur de la figure : Mattia Alessi. ....67
- Figure 35. Evolution de la concentration (en µg par g de litière végétale) en toxine Cry4Aa (A), Cry4Ba (B), Cry11Aa (C) et Cyt1Aa (D) en fonction du temps selon différentes concentrations (FD, Faible dose ; HD, Haute dose) et le maintien de l'eau (eau+) ou non (eau-). Erreur : erreur standard.....68

- Figure 36. Schéma du protocole suivi pour mesurer l'effet du contact du *Bti* commercial et des toxines Cry et Cyt avec des litières végétales sur leur biodisponibilité pour les larves de moustiques.....71
- Figure 37. Pourcentage de mortalité des larves exposées aux toxines Cry4Aa (blanc), Cry4Ba (gris) et Cry11Aa (noir) laissées 7 jours à température ambiante (7d at RT) ou conservées au congélateur (-20°C cons.). Le même test est réalisé sur la toxine Cyt1Aa laissée 7 jours à température ambiante ou conservée au congélateur à laquelle on rajoute des toxines Cry4Aa (blanc), Cry4Ba (gris) et Cry11Aa (noir). Tous les tests sont réalisés en présence de litière végétale. Les différences non significatives entre les deux conditions de conservation pour une même toxine sont indiquées par « NS ». Erreur : erreur standard. ...73
- Figure 38. Pourcentage de mortalité des larves exposées aux toxines Cry4Aa (blanc), Cry4Ba (gris) ou Cry11Aa (noir) en contact (mixed) ou non (non-mixed) avec de la litière végétale. Les différences non significatives entre les toxines sont indiquées par « NS ». Erreur : erreur standard. ....73
- Figure 39. A.B.C. Pourcentage de mortalité des larves exposées aux toxines Cry4Aa (A, blanc), Cry4Ba (B, gris) ou Cry11Aa (C, noir) sans la toxine Cyt1Aa (Cry + Lit) ou avec la toxine Cyt1Aa non-mixée avec la litière (Cry + Cyt + Lit) ou en contact 3h, 1, 2 ou 7 jours. D.E.F. Pourcentage de mortalité de larves exposées à deux formulations de *Bti* commercial, Vectobac WG (D) et Vectobac 12AS (E), et à du *Bti* produit (F) non-mixé avec la litière (*Bti* + Lit) ou en contact 3h, 1, 2 ou 7 jours. Les différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont indiquées par des lettres différentes entre les barres. Erreur : erreur standard.....74
- Figure 40. Différence entre un ELISA classique (un seul anticorps de détection) avec un ELISA Haute Sensibilité (avec un complexe biotine-streptavidine). Modifié d'après une image de <http://www.ebioscience.com>. ....78
- Figure 41. Schéma bilan des résultats des travaux réalisés sur la persistance du *Bti*. A gauche sont représentés les résultats des tests ELISA suite à une contamination de litières avec du *Bti* ainsi que les résultats des bioessais avec des toxines en contact avec la litière. En haut sont représentés les résultats des expériences sur la persistance des toxines du *Bti* en fonction du temps. En bas sont représentés les résultats de l'analyse des litières toxiques. Les pourcentages correspondent à la variation de la toxine parmi toutes les toxines (Cyt) ou seulement parmi les toxines Cry (Cry4 et Cry11) par rapport aux proportions retrouvées dans le *Bti* commercial. ....79
- Figure 42. Nombre d'espèces d'insectes (ligne en pointillés), de pathogènes de plantes (triangles) et de mauvaises herbes (ligne simple) résistantes aux pesticides recensées entre 1908 et 1998. Adapté de (Holt et Lebaron, 1990). ....81
- Figure 43. Paramètres susceptibles d'influer sur l'apparition et la propagation de la résistance à un pesticide (exemple du moustique). Les individus résistants sont colorés en rouge et les individus sensibles en noir. Les facteurs génétiques sont indiqués en violet, les facteurs biologiques en bleu, les facteurs environnementaux en vert et les facteurs opérationnels en rouge. L'allèle de résistance est appelé « allèle R » dans le cas d'une résistance monogénique. Le terme « standing genetic variation », traduit par « polymorphisme génétique initial » signifie que l'allèle de résistance est présent dans la population avant l'application du pesticide.....82
- Figure 44. Apparition et sélection des mutations conférant une résistance au malathion et au diazinon chez *Lucilia* spp. avant et après l'introduction des organophosphorés. La position des mutations de l'estérase E3 ainsi que leur effet sur les activités carboxylestérase et la valeur sélective sont indiqués. Adapté de (French-Constant, 2007).....85

- Figure 45. Influence de la migration et du traitement insecticide sur la propagation et l'implantation de la résistance entre plusieurs populations d'une même espèce (ici de moustique). Les individus résistants sont colorés en rouge et les individus sensibles en noir. Les populations traitées sont cerclées de rouge et les populations non traitées cerclées de noir. ....86
- Figure 46. Mécanismes potentiels de résistance aux toxines Cry de *Bacillus thuringiensis* en relation avec leur mode d'action. Source des pictogrammes : (Bravo *et al.*, 2007). ....89
- Figure 47. Plan schématique de la démarche expérimentale du chapitre II. La recherche des mécanismes de résistance au *Bti* chez la souche LiTOX a donné lieu à trois articles publiés sur des approches globales réalisées sur larves entières : deux par une approche génomique (Bonin *et al.*, 2008; Bonin *et al.*, 2009) et une en transcriptomique (Paris *et al.*, 2012). Un article ciblant les transcrits et protéines intestinaux a été publié dans BMC Genomics (Tetreau *et al.*, 2012a). Enfin, l'article traitant de la caractérisation des activités protéolytiques des larves LiTOX et sensible est en préparation pour le Journal of Invertebrate Pathology (Tetreau *et al.*, soumis à JIP). ....93
- Figure 48. Carte de répartition mondiale du moustique *Aedes aegypti* (bleu et rouge) ainsi que de la dengue (rouge). Adapté de (Malavige *et al.*, 2004), source de la carte : <http://www.cdc.gov> .....94
- Figure 49. Cycle de vie et sélection de la résistance de la souche LiTOX .....95
- Figure 50. Courbe sigmoïdale de la mortalité en fonction du logarithme décimal de la dose d'insecticide, caractéristique de données de bioessais, obtenue avec le module 'Dose' du logiciel XLSTAT.....96
- Figure 51. Rapports de résistance ( $RR_{50}$ ) de la souche LiTOX comparée à la souche sensible à la génération 18 (gris) et 30 (noir) pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa, le *Bti* commercial (Vectobac WG) et la litière toxiques d'Aulne Aul1. Les toxines non testées à la génération 30 sont indiquées par « N.M. » (non mesuré). D'après des données issues de (Paris *et al.*, 2011b; Tetreau *et al.*, 2012a).....97
- Figure 52. Rapports de résistance ( $RR_{50}$ ) de la souche LiTOX normale (gris clair) et LiTOX tardive (gris foncé) comparées à la souche sensible à la génération 18 pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa. Les différences sont considérées comme significatives (\*) lorsque les intervalles de confiance à 95% des rapports de résistance ne se chevauchent pas entre les deux cohortes. NS : Non significatif. Adapté de (Paris *et al.*, 2011b). ....98
- Figure 53. Représentation théorique des variations du polymorphisme génétique en fonction de la distance au gène sous sélection directionnelle. Ainsi, le gène A possèdera une diversité allélique plus faible que le gène B ; le gène C possède une diversité allélique identique à celle attendue sans effet de la sélection naturelle (modèle neutre). Adapté de (Barrett et Schluter, 2008). .... 100
- Figure 54. Etapes nécessaires à la réalisation de la technique DArT pour détecter les marqueurs sous sélection. Adapté de (Jaccoud *et al.*, 2001; Bonin *et al.*, 2008). ....101
- Figure 55. Structure moléculaire et spectres d'absorption (lignes pleines) et d'émission (lignes pointillées) des fluorophores Cy3 (vert) et Cy5 (rouge). Le nombre inscrit dans les structures moléculaires indique le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne centrale. Adapté de : (Lee, 2009). ....102
- Figure 56. Etapes nécessaire à la réalisation de la technique DGETP. Les ARNs sont extraits à partir de larves entières issues de la souche LiTOX et sensible. Les ARN messagers sont ensuite rétrotranscrits en ADNc pour être clivés par l'enzyme de restriction

DpnII. Après différentes étapes de fixation d'adaptateurs spécifiques, clivage par une enzyme de restriction Mmel puis amplification des fragments de 20 paires de bases générés. Pour plus de détails sur l'étape de construction de la librairie d'ADN complémentaires, voir la figure supplémentaire 4 de (David *et al.*, 2010). Dans le cas présenté sur la figure, le gène 1 présente plus de tags chez la souche résistante que chez la souche sensible, indiquant une surexpression de ce gène alors que c'est le contraire pour le gène 2. Adapté de (Paris *et al.*, 2012).....104

Figure 57. Protocole illustré des approches transcriptomique (réalisée à la LSTM de Liverpool, Angleterre) et protéomique (réalisée au laboratoire de Michael Adang de l'Université de Georgie, Etats-Unis) appliquées à des extraits d'intestins de larves de moustiques.....106

Figure 58. Représentation schématique (haut) et photographie (bas) de l'appareil digestif d'une larve de moustique *Aedes aegypti*. SG, glandes salivaires ; CR, cardia ; GC, cæca gastriques ; AMG, intestin moyen antérieur (anterior midgut) ; PMG, intestin moyen inférieur (posterior midgut) ; MT, tubes de Malpighi ; RG, rectum. Source de la figure : (Okech *et al.*, 2008). Auteur de la photographie : Dr Tom Clark, source : <http://www.wagner.edu/faculty/horst.onken/sites/wagner.edu.faculty.horst.onken/files/images/Intestine.jpg>.....106

Figure 59. Quantité d'ADN double brin en fonction du nombre de cycles PCR pour la souche résistante (rouge) et la souche sensible (vert). Pour chaque souche, quatre réplicats techniques (quatre tracés de la même couleur) ont été réalisés. La ligne en violet marque la limite du bruit de fond. Dans le cas présent, le gène est sous-exprimé chez la souche résistante.....108

Figure 60. Vésicules de membranes intestinales (BBMV) réalisées à partir d'intestins de moustiques *Ae. aegypti*. Les faces de l'intestin exposées vers l'hémolymphe (H) et vers la lumière intestinale (LI) sont indiquées par des flèches. Adapté de (Abdul-Rauf et Ellar, 1999). .....109

Figure 61. Gels 2D des protéines BBMV issues de la souche LiTOX marquée au fluorophore Cy3, sensible à Cy5 et le pool à Cy2, révélés séparément ou en combinaison. Les échantillons sont mis à migrer sur des bandes de gels de 18cm au pH de 4 à 7. ....111

Figure 62. A. Volcano plot des p-valeurs corrigées (Benjamini Hochberg) en fonction des rapports de transcriptions obtenus en microarray. Les seuils de significativité sont indiqués par des lignes en pointillés. Les transcrits significativement différentiellement transcrits entre les deux souches sont indiqués en rouge. B. Rapports de transcription obtenus en RT-qPCR en fonction de ceux obtenus en microarray pour les quinze gènes étudiés. La nomenclature ainsi que les numéros d'accension des gènes validés est indiquée dans le tableau S7 de l'article V.....112

Figure 63. Analyse fonctionnelle de l'ensemble des gènes détectés (A) et des gènes sous-(B) et surexprimés (C) chez la souche LiTOX comparé à la souche sensible. Les gènes sont classés en 13 différentes catégories. La catégorie « récepteurs » rassemble des récepteurs protéiques et non des récepteurs spécifiques des toxines du *Bti*. ....113

Figure 64. Gel 2D-DIGE (gauche) et le gel 2D correspondant coloré au *deep purple* (droite), utilisé pour l'excision des spots, réalisés à partir de BBMV de la souche LiTOX et de la souche sensible. En DIGE, les spots apparaissant en jaune traduisent une abondance équivalente de la protéine correspondante chez les deux souches, ceux en rouge sont uniquement présents dans les BBMV de la souche sensible marquée avec le fluorophore Cy5 et ceux en vert chez la souche LiTOX marquée avec Cy3. L'axe des abscisses montre les valeurs des points isoélectriques des protéines (allant de 4 à 7) et l'axe des ordonnées la masse moléculaire en kilodaltons (kDa). Les 56 spots excisés à partir du premier et du

- deuxième gel, correspondants aux deux réplicats biologiques, sont notés sur le gel de droite.  
..... 114
- Figure 65. Mode d'action des toxines Cry du *Bti* ainsi que l'implication potentielle des principaux gènes et protéines significativement différenciellement exprimés avec une des deux approches entre les deux souches. Les cristaux (C) et spores (S) sont ingérés (I) puis le cristal se solubilise (II) dans le pH hautement alcalin du tube digestif. Les protoxines (P) sont activées par les enzymes digestives (III) puis les toxines (T) se fixent à des récepteurs membranaires (R) (IV) avant de s'oligomériser (V) et de s'insérer dans la membrane intestinale (VI). La perforation de l'intestin permet aux spores de passer dans l'hémolymphe pour germer et proliférer (VII). Les altérations d'expression mesurées en protéomique sont indiquées par des flèches orange et en transcriptomique par des flèches bleues. .... 118
- Figure 66. Transporteurs membranaires d'une cellule épithéliale de l'intestin moyen antérieur (AMG) impliqués dans l'alcalinisation de la lumière intestinale. Adapté de (Boudko *et al.*, 2001; Linser *et al.*, 2009). .... 121
- Figure 67. Localisation des V-ATPases ainsi que des récepteurs membranaires des toxines Cry décrits chez *Ae. aegypti* dans les cellules épithéliales de différentes régions de l'appareil digestif de la larve. GC, cæca gastriques ; AMG, intestin moyen antérieur (anterior midgut) ; PMG, intestin moyen inférieur (posterior midgut) ; MT, tubes de Malpighi ; CM, membrane cæcale ; PT, matrice péritrophique. Les zones de fixation des toxines Cry du *Bti* et de Cry11Ba ainsi que leur affinité sont indiquées. Source des illustrations : (Linser *et al.*, 2009). Source des pictogrammes : (Bravo *et al.*, 2007). Source des informations relatives aux V-ATPases : (Linser *et al.*, 2009; Harvey *et al.*, 2010), aux récepteurs membranaires : (Chen *et al.*, 2009a; Chen *et al.*, 2009b; Likitvivatanavong *et al.*, 2011b) et à la fixation des toxines aux différentes régions de l'appareil digestif : (Ravoahangimalala *et al.*, 1993; Ravoahangimalala et Charles, 1995; Yamagiwa *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2004). .... 122
- Figure 68. Protocole de solubilisation et d'activation des protoxines du *Bti* (gauche) et gel SDS-PAGE des protoxines sous forme cristalline (I) et solubles (II) et des toxines activées solubles (III) de Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa (droite). .... 127
- Figure 69. Mise en place des larves dans les puits de plaques de 96 puits à l'aide d'une pipette au cône tronqué (gauche) et courbe sigmoïdale obtenues pour des larves sensibles exposées 24h à la protoxine Cry11Aa solubilisée, représentatif des profils obtenus pour toutes les toxines et toutes les conditions. Les valeurs de mortalité obtenues sont indiquées par des points bleus, le modèle probit par une courbe noire et les intervalles de confiance à 95% par des lignes grises. .... 128
- Figure 70. Résultats attendus dans le cas de l'implication des enzymes digestives dans la résistance (gauche) ou non (droite). Pur, protoxines cristallines ; Sol, protoxines solubilisées ; Act, toxines solubilisées et activées. .... 129
- Figure 71. Rapports de résistance calculés à 24h pour la toxine Cry4Aa (gauche, vert), Cry4Ba (centre, violet) et Cry11Aa (droite, rouge) en divisant les LC<sub>50</sub> des larves de LiTOX de la cohorte normale (précoce) ou tardive par les LC<sub>50</sub> des larves sensibles. Pur, protoxines cristallines ; Sol, protoxines solubilisées ; Act, toxines solubilisées et activées. .... 129
- Figure 72. Activité azocaséinolytique totale d'extraits enzymatiques de la souche LiTOX et de la souche sensible. Pour chaque pH de 4 à 13, les rapports de densité optique mesurée à 440 nm de LiTOX divisé par ceux de la souche sensible (Bora) et les tests statistiques (test de Mann-Whitney) sont indiqués. Les densités optiques de la souche LiTOX sont représentées par des losanges noirs et celles de la souche sensible par des carrés gris. NS, différences non significatives ; \*, p-valeur < 0,05. Erreur : erreur standard. .... 131

- Figure 73. Activité des trypsines (A), chymotrypsines (B), leucine-aminopeptidases (C) et des carboxypeptidases A (D) et B (E). Les activités sont exprimées en nanokatal (nmol de produit formé par minute par mg de protéine totale) pour chaque pH. Les activités enzymatiques de la souche LiTOX sont représentées par des losanges noirs et celles de la souche sensible par des carrés gris. NS, différences non significatives ; \*, p-valeur < 0,05. Erreur : erreur standard. .... 134
- Figure 74. Protocole d'analyse de la capacité d'activation de la protoxine Cry4Ba du *Bti* par les protéases intestinales. Les protoxines sont incubées 1, 5, 10, 30, 60, 180 et 960 min avec les extraits enzymatiques. Des témoins sans enzyme ( $T_0$ ) et un témoin positif activé avec de la trypsine bovine ( $T_+$ ) sont également réalisés. On observe ainsi une rapide disparition de la protoxine et une apparition progressive des toxines activées. Les différentes bandes de dégradations observées sont indiquées à par une étoile (\*). La protoxine (PT), les différentes bandes d'activation intermédiaires et la toxine activée (TA) sont séparées en SDS-PAGE. Les profils de migrations de chaque temps de digestion sont analysés à l'aide du logiciel ImageJ (ici  $T_0$ , 10, 60 min et  $T_+$ ) et l'intensité des pics correspondants à la toxine activée est mesurée. Le pourcentage d'activation est calculé en divisant l'intensité des bandes par l'intensité de la bande du témoin positif. .... 135
- Figure 75. Pourcentage d'activation des protoxines de Cry4Aa (A), Cry4Ba (B) et Cry11Aa (C) par les extraits enzymatiques en fonction du temps. La souche LiTOX est représentée par des losanges noirs et la souche sensible par des carrés gris. A chaque temps de digestion, les différences significatives (p-valeur < 0,05) entre les deux souches sont indiquées par une étoile (\*). Erreur : erreur standard. .... 136
- Figure 76. Pourcentage d'activation de la protoxine Cry4Aa sans inhibiteur (A) ou avec de l'EDTA (B) en fonction du temps. La souche LiTOX est représentée par des losanges noirs et la souche sensible par des carrés gris. L'inhibition de l'activation par le PMSF après 360 min de digestion est également présentée (C). A chaque temps de digestion, les différences significatives (p-valeur < 0,05) entre les deux souches sont indiquées par une étoile (\*). Erreur : erreur standard. .... 137
- Figure 77. Représentation schématique synthétique des patrons de distribution des bandes obtenues par des zymogrammes réalisés sur les extraits enzymatiques des deux souches. Les profils sans inhibiteurs (I) ou avec du PMSF (II), du TLCK (III), du TPCK (IV) et de l'EDTA (V) sont indiqués. Les bandes sont annotées de la vitesse de migration la plus faible à la plus rapide, de E1 vers E6. Une étoile indique la bande observée chez les trois réplicats biologiques de la souche sensible mais absente des trois réplicats de la souche résistante. Le graphique de gauche représente l'intensité des bandes le long du gel mesuré pour le premier réplicat biologique de la souche LiTOX à l'aide du logiciel ImageJ. La présence des bandes dans les zymogrammes est indiquée ici par des bandes blanches alors qu'une inhibition partielle est indiquée par une bande grise. .... 139
- Figure 78. Principe de la technique de « ligand blot ». Les protéines des BBMV migrent en fonction de leur taille et de leur point isoélectrique (pI) (étape 1). Les points bleus représentent les protéines ayant migré dans le gel. Les toxines Cry se fixent à leurs récepteurs (étape 2) puis sont détectées par des anticorps anti-Cry (étape 3) qui seront révélés à l'aide d'un anticorps de détection, d'un réactif ECL et d'un film photographique (étape 4). Les points noirs représentent les protéines révélées par la technique de ligand blot. .... 141
- Figure 79. Image du gel de protéine SDS-PAGE coloré aux ions argent et ligant blots de deux réplicats techniques réalisés avec la toxine Cry4Ba et du réplicat technique 1 réalisé avec la toxine Cry11Aa. Les échantillons sont déposés dans des bandes de gels de 7cm de diamètre au pH de 4 à 7. Pour les ligant blot, les cercles rouges indiquent des spots présents dans l'ensemble des trois blots de la souche sensibles et absents chez la souche résistante.

Les spots cerclés de jaunes n'apparaissent que chez un réplicat et/ou pour une seule toxine chez la souche sensible et sont absents chez la souche résistante (non reproductibles). ..142

Figure 80.  $LC_{50}$  mesurées à 48h pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa de la souche sensible (blanc) et LS à la génération 0 (issue des croisements LiTOX-sensible) (gris clair) et à la génération 1 (gris foncé). Les rapports de résistances ( $RR_{50}$ ) sont indiqués au-dessus des histogrammes correspondants. Erreurs : intervalles de confiance à 95% calculés à l'aide de l'analyse Probit. .... 146

Figure 81. Rapports de résistance ( $RR_{50}$ ) des souches LR4A (vert) à la toxine Cry4Aa, LR4B (violet) à la toxine Cry4Ba et LR11 (rouge) à la toxine Cry11Aa par rapport à la souche sensible pour les générations de sélection n°2, 3, 4 et 8. Les valeurs de  $RR_{50}$  sont indiquées au-dessus des histogrammes correspondants..... 147

Figure 82. Protocole de recherche de la résistance au *Bti* en populations naturelles incluant une prospection des gîtes traités et non traités, l'échantillonnage des populations, une étape de croissance des larves jusqu'au stade 4 précoce, une identification à la loupe binoculaire puis des bioessais pour mesurer leur tolérance au *Bti* et aux différentes toxines Cry. .... 151

Figure 83. Espèces échantillonnées ainsi que leur date de mise en eau approximative (bleu, la date de mise en eau peut varier d'une année sur l'autre) et les périodes où on les retrouve aux stades larvaires (vert) et imaginaux (hachuré vert). Source : EID Rhône-Alpes, reproduit avec l'autorisation de Delphine Rey..... 152

Figure 84. Gîtes visités et échantillonnés dans la région Rhône-Alpes. Les gîtes visités mais non échantillonnés sont indiqués par des cercles bleus (non traités) ou rouges (traités). Les gîtes échantillonnés et utilisés dans les bioessais sont indiqués par des ronds pleins bleus (non traités) ou rouges (traités). Pour les gîtes échantillonnés, le nom de la population est indiqué. P03 & P16, Saint-Maurice de Gourdans (bois de l'Aberu) ; P05, Cormoz (Château-Gaillard) ; P14, Rumilly ; P17, Saint-Jean de Niois ; P18, Chantemerle (Archine) ; P20 & P42, Culoz ; P27, Sarennes (Bassey) ; P30, Saint-Quentin sur Isère (fossé des moutons) ; P36, Tizin (pré Borel) ; P40, Saint-Maurice de Gourdans (marais) ; P44, Saint-Quentin sur Isère (digue) ; P46 & P48, Vernis (Libellule) ; P47, Saint-Quentin sur Isère (lagunage) ; P51, Lavours (terrière) et P52, Albens (moulin). Source du fond de carte : <http://www.architectes-conseils.fr/regions/region-rhone-alpes>. .... 153

Figure 85.  $LC_{50}$  calculées à 48h pour les populations naturelles P3, P5 et P14 d'*Aedes rusticus* exposées à des concentrations croissantes de toxine Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculées à l'aide de l'analyse probit sont non chevauchants. NS, non significatif, \*, significatif ( $p < 0,05$ ). Les populations non traitées au *Bti* sont indiquées en bleu et les populations traitées en rouge. .... 157

Figure 86.  $LC_{50}$  calculées à 48h pour les populations naturelles P16, P20 et P52 d'*Aedes sticticus* exposées à des concentrations croissantes de toxine Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculées à l'aide de l'analyse probit sont non chevauchants. NS, non significatif, \*, significatif ( $p < 0,05$ ). Les populations, toutes traitées au *Bti*, sont indiquées en rouge. .... 158

Figure 87.  $LC_{50}$  calculées à 48h pour les populations naturelles P18, P20 et P44 d'*Aedes vexans* exposées à des concentrations croissantes de toxine Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculées à l'aide de l'analyse probit sont non chevauchants. NS, non significatif, \*, significatif ( $p < 0,05$ ). Les populations, toutes traitées au *Bti*, sont indiquées en rouge. .... 159

- Figure 88. Mortalité calculée à 48h pour les populations naturelles P30 et P42 d'*Aedes vexans* exposées à des doses diagnostics de toxine Cry4Ba (16,3 ng/mL), Cry11Aa (32,5 ng/mL) et de *Bti* commercial Vectobac WG (0,1 µg/mL). Les différences ont été testées statistiquement à l'aide d'un test de Wilcoxon. NS, non significatif. Les populations, toutes traitées au *Bti*, sont indiquées en rouge. Distance approximative à vol d'oiseau entre P30 et P42 : 66 km. .... 159
- Figure 89. Scénario hypothétique de la formation des litières toxiques à partir de l'épandage du *Bti* dans un gîte à moustiques. .... 165
- Figure 90. Diagrammes de Venn des gènes/protéines trouvés sous sélection ou différenciellement exprimés entre la souche sensible et la souche résistante selon les cinq approches globales réalisées (DArT, AFLP-454seq, DGETP, Microarrays, 2D-DIGE) et la RT-qPCR. La RT-qPCR désigne les analyses en gène candidat réalisées sur les intestins de larves. Les diagrammes de Venn ont été réalisés à l'aide du logiciel VENNY accessible gratuitement à <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, 2007). .... 168
- Figure 91. Mécanisme général de l'ARN interférence. L'ARN double brin (ARNdb) va être clivé par l'enzyme Dicer pour générer de petits ARN (A), d'une taille variant entre 19 et 21pb appelés ARNi (ou ARNsi) (B). Ces petits ARN sont reconnus par le complexe multiprotéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (C). En présence d'ATP, le complexe va reconnaître l'ARNm dont l'ARNi est spécifique (D) et le dégrader (E, F) permettant d'éteindre la protéine qu'il code. Adapté de (Chauchereau et Harel-Bellan, 2004). .... 171
- Figure 92. Fonctionnement opérationnel du cycle traitements anti-larvaires / contrôles qualités réalisés par les Ententes Interdépartementales pour la Démoustication (EID) (en vert). L'apport des outils opérationnels développés lors de cette thèse sont représentés en rouge. La PCR diagnostic, qui sera développée lorsque le(s) gène(s) de résistance auront été caractérisés, est hachurée en rouge. Source du cycle opérationnel : EID Rhône-Alpes, reproduit avec l'autorisation de Delphine Rey. .... 174

## Liste des tableaux

Tableau 1. Position des moustiques au sein de la classification des êtres vivants et description.....	16
Tableau 2. Principales maladies transmises par les moustiques. La maladie ainsi que le pathogène responsable, sa prévalence et le vecteur principal sont indiqués. Les symptômes ainsi que les traitements préventifs (vaccin) et curatifs sont indiqués. *Définitions : anémie, diminution de la concentration en hémoglobine dans le sang ; arthralgie, douleurs articulaires ; céphalées, maux de tête. ....	21
Tableau 3. Résultats de la détection des toxines (haut) par les couples d'anticorps IgG1 – IgG2 (gauche) en densité optique mesurées à 450 nm. Trois concentrations de toxines sont testées : 50, 100 et 150 ng/mL. Les résultats positifs sont surlignés en vert.....	56
Tableau 4. Densités optiques à 450 nm obtenues pour chaque toxine à 3 concentrations différentes (50, 100 et 150 ng/mL) (haut) mis en présence avec chaque toxine à 150 ng/mL (gauche). Le tableau A présente les DO obtenues suite à l'expérimentation et le tableau B représente les valeurs attendues sans effet de compétition ni de synergie entre toxines. ....	57
Tableau 5. Proportions des toxines du <i>Bti</i> parmi toutes les toxines du <i>Bti</i> et parmi les toxines Cry uniquement calculées après migration sur gel de protéine (SDS-PAGE) ou par ELISA. 61	61
Tableau 6. Proportions des toxines du <i>Bti</i> parmi toutes les toxines du <i>Bti</i> et parmi les toxines Cry uniquement. Les proportions sont calculées à partir de <i>Bti</i> solubilisé après migration sur gel de protéine (SDS-PAGE) ou détecté par ELISA (Tableau 5) mais également à partir de <i>Bti</i> extrait de litières contaminées et détecté par ELISA.....	64
Tableau 7. Proportions des toxines du <i>Bti</i> parmi toutes les toxines du <i>Bti</i> et parmi les toxines Cry uniquement. Les proportions sont calculées à partir de <i>Bti</i> solubilisé après migration sur gel de protéine (SDS-PAGE) ou détecté par ELISA ou à partir de <i>Bti</i> extrait de litières contaminées et détecté par ELISA (Tableau 6). Les proportions des toxines dans les litières toxiques sont également indiquées.....	66
Tableau 8. Enrichissement en aminopeptidases et en phosphatases alcalines dans les préparations de BBMV par rapport aux homogénats d'intestin initiaux. Les enrichissements sont indiqués pour chacun des deux réplicats biologiques pour chaque souche.....	110
Tableau 9. Identification des 31 spots excisés ayant les Mascot scores les plus élevés. Les protéines sont classées en fonction de leur fonction biologique avec les mêmes 13 classes que pour les données transcriptomiques. Quand plusieurs spots différents désignent la même protéine, des lettres sont disposées après leur numéro d'accession pour les différencier. ....	116
Tableau 10. Niveaux d'expression de récepteurs potentiels des toxines Cry du <i>Bti</i> mesurés par puce à ADN, RT-qPCR et/ou 2D-DIGE. Le niveau d'expression de la LiTOX par rapport à la souche sensible est indiqué. ND, Non détecté dans au moins 5 des 6 hybridations en puces à ADN ; NI, Non identifié comme différentiellement exprimé entre les deux souches ; UD, Non détectable en DIGE dû à leur haut poids moléculaire et leur faible abondance dans les BBMV. ....	119
Tableau 11. Inhibiteurs utilisés pour caractériser la part de chaque classe d'enzyme dans l'activité protéolytique totale. Les classes d'enzymes inhibées ainsi que la concentration finale utilisée sont indiquées. PMSF, phénylméthylsulfonyl fluoride ; TLCK, tosyl-L-lysine chloromethyl ketone ; TPCK, tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone ; EDTA, acide éthylène diamine tétracétique.....	132

Tableau 12. Activité protéolytique totale et effet des inhibiteurs de protéases. NS, différences non significatives ; \*, p-valeur < 0,05. Erreur : erreur standard. ....132

Tableau 13. Synthèse du nombre de gîtes où au moins une des 8 espèces étudiées a été trouvée ainsi que ceux pour lesquels les bioessais ont pu être réalisés. Les raisons pour lesquelles les bioessais n'ont pas pu être effectués sur les autres populations sont également indiquées. ....156

Tableau 14. A. Moyenne des LC<sub>50</sub> calculées sur l'ensemble des populations d'*Ae. rusticus*, *Ae. sticticus* ou *Ae. vexans* exprimées en ng/mL pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa et en µg/mL pour le *Bti* Vectobac WG. La taille moyenne des larves, mesurée sur 15 individus par population, ainsi que l'écart type sont mesurés. B. Les rapports de tolérance pour chacune des toxines Cry et pour le *Bti* Vectobac WG ont été calculés pour les trois espèces testées. Les rapports de taille larvaire entre espèces ont également été calculés. ....160

# Introduction générale

---

## I. Des moustiques et des hommes

### A. Une cohabitation difficile

L'Homme a toujours été fasciné par la faune qui l'entoure, l'élevant parfois au rang de divinité. L'intérêt des hommes pour certains animaux traduit généralement une peur mais également du respect, tel Khépri, Dieu-créateur scarabée de l'Égypte ancienne ou encore Kabakmeli, Dieu crocodile créateur du monde selon les papous. Les moustiques, apparus il y a plus de 170 millions d'années, sont présents sur tous les continents et côtoient les hommes depuis leur apparition il y a plus de 200.000 ans. Malgré cela, la présence du moustique dans les mythologies est rare et renvoie le plus souvent au caractère perfide et vicieux qu'on lui attribue. Ainsi, dans les légendes vietnamiennes, le moustique serait la réincarnation de Nhan Diêp, femme infidèle cherchant à prélever trois gouttes de sang qui la ramèneraient à la vie et lui permettraient de se venger de son mari. Le moustique se retrouve également dans la Bible en tant que troisième plaie d'Égypte où il est dit que « *toute la poussière du sol se changea en moustiques* » (Exode 8:16-19), indiquant la colère divine. La rareté de ces représentations ancestrales traduit bien le dédain de l'homme pour le moustique. Mais qu'en est-il de nos jours ?

« *Être piqué par un moustique est déjà bien pénible, mais, en plus, il faut que l'insecte vous serine son bzbz à l'oreille - et vous pouvez être sûr qu'il vous raconte des choses du genre : "Je te pique mais c'est pour ton bien." Si, au moins, il le faisait en silence !* » (Nothomb, 2001). Cette citation d'Amélie Nothomb, écrivain contemporain, montre bien que la vision du moustique a globalement peu évolué au fil du temps mais elle s'est néanmoins complexifiée. Dans les régions du monde encore globalement épargnées par les maladies dont le moustique est le vecteur, telles que la France métropolitaine, le moustique est sujet à discours contradictoires (Setbon et Bley, 2009). Ainsi, alors que les personnes interrogées s'avèrent majoritairement favorables à la démoustication en reconnaissant que le moustique est nuisible, elles admettent également qu'il a un rôle dans l'écosystème, sans réussir néanmoins à le caractériser (Claeys-Mekdade, 2003; Claeys et Sérandour, 2009). Dans les régions où sévissent des maladies mortelles pour l'homme, le discours se radicalise, les populations locales ne voyant dans le moustique qu'un tueur silencieux qu'il faut absolument éradiquer. Le rôle des médias dans l'éducation des populations est primordial pour une meilleure compréhension des maladies et de la biologie du moustique.

Cependant, la presse peine généralement à fournir des informations précises et cohérentes, source de confusion pour les populations (Setbon et Bley, 2009).

Ainsi, le moustique est largement détesté voire même craint lorsqu'il est perçu comme un vecteur de maladies mortelles mais sa biologie tout comme son rôle dans l'écosystème restent globalement inconnus des populations humaines.

## B. Le moustique : sa vie, son œuvre

### 1. Biologie du moustique et cycle de développement

Les moustiques, nom vernaculaire de la famille des Culicidés, regroupent plus de 3.500 espèces, dont 47 recensées en France métropolitaine, regroupées majoritairement en trois genres : *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (Tableau 1).

**Tableau 1.** Position des moustiques au sein de la classification des êtres vivants et description.

<b>Classification</b>	<b>Dénomination</b>	<b>Signification</b>
Règne	<i>Animalia</i>	Être vivant hétérotrophe (se nourrissant de matière organique)
Sous-règne	<i>Metazoa</i>	Organisme eucaryote pluricellulaire
Embranchement	<i>Arthropoda</i>	Corps segmenté (métamère) pourvu d'un squelette externe (cuticule).
Sous-embranchement	<i>Hexapoda</i>	Possèdent trois paires de pattes articulées.
Classe	<i>Insecta</i>	Corps composé de trois parties (tête, thorax, abdomen) et d'une paire d'antennes.
Sous-classe	<i>Pterygota</i>	Adulte possédant deux paires d'ailes.
Infra-classe	<i>Neoptera</i>	Ailes pourvues d'un champ jugal et repliées en arrière au repos.
Super-ordre	<i>Holometabola</i>	Larves et adultes diffèrent radicalement. La larve est aptère et grandit sans changer de forme.
Ordre	<i>Diptera</i>	Une seule paire d'aile assure la fonction de vol, la deuxième assure la stabilité de l'insecte lors du vol (balanciers).
Sous-ordre	<i>Nematocera</i>	
Famille (Meigen, 1818)	<i>Culicidae</i>	Nom vernaculaire : Moustiques

Les moustiques se développent dans deux milieux radicalement différents en fonction de leur stade de vie : aérien au stade imaginal (adulte) et aquatique aux stades larvaires et nymphal (Figure 1) (Clements, 1992).

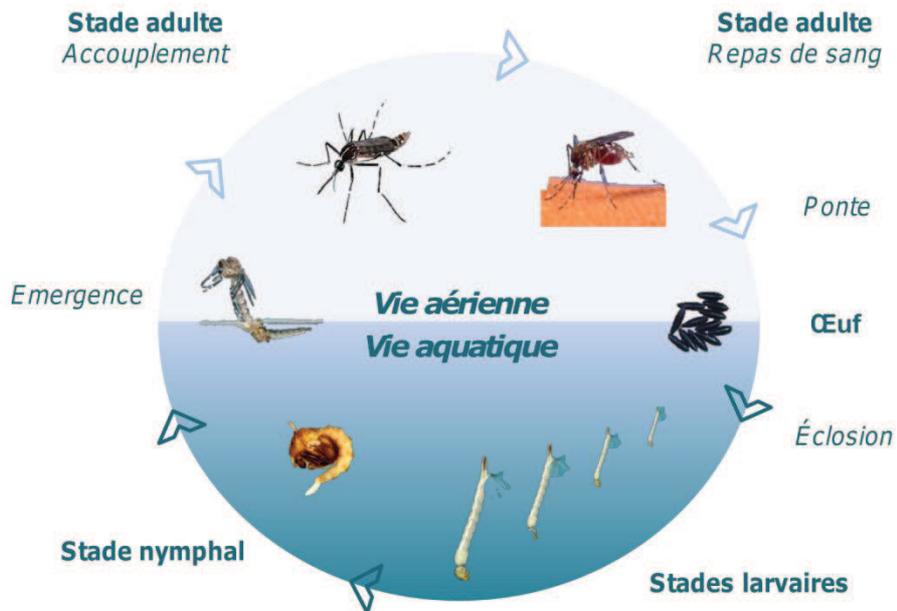


Figure 1. Cycle de vie de moustiques du genre *Aedes*.

Les larves se développent en milieu aquatique au cours de **quatre stades larvaires**, séparés chacun par une mue (Figure 1). Les larves de moustiques sont des insectes métamérisés composés de trois parties : la **tête**, portant les yeux composés et les brosses buccales ; le **thorax** et l'**abdomen** segmenté terminé par un siphon permettant à la larve de respirer à la surface de l'eau ainsi qu'une selle anale dont les papilles aident la larve à réguler ses échanges osmotiques avec le milieu (Figure 2) (Clements, 1992).

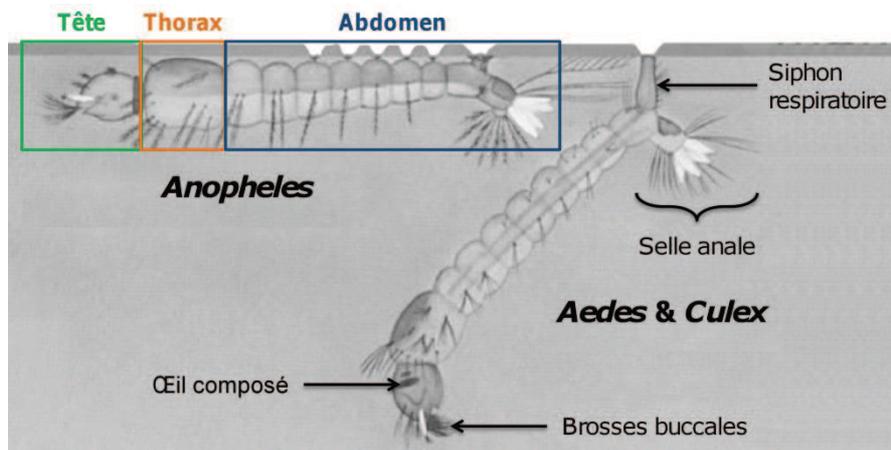


Figure 2. Illustrations de larves de moustiques des genres *Aedes*, *Anopheles* et *Culex*. Adapté d'une image de Wikipédia.

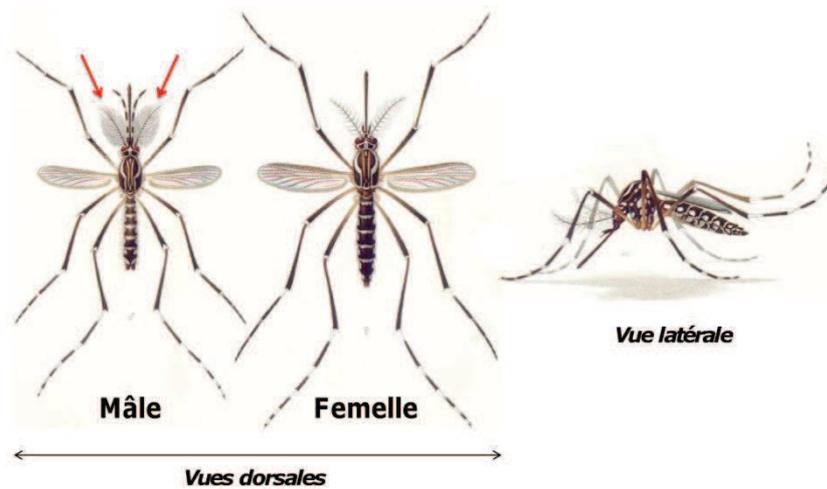
La durée de la phase larvaire varie en fonction de nombreux paramètres, notamment de la température, de la densité de la population, de la quantité de nourriture disponible mais également de l'espèce considérée. Ainsi, des larves d'*Aedes rusticus* ont la capacité de passer les mois d'hiver sous la glace au stade larvaire alors que des larves d'*Aedes aegypti*, en région tropicale, peuvent accomplir leur développement en seulement quelques jours. De

manière générale, pour une même espèce, des eaux plus froides et/ou avec une densité larvaire très forte engendrent un développement larvaire plus lent et une taille des individus plus faible.

Les larves sont souvent qualifiées de **détritivores** car elles se nourrissent généralement de matières végétales en décomposition mais également de micro-organismes telles que des bactéries (Clements, 1992). Elles filtrent l'eau grâce à leurs brosses buccales pour sélectionner et n'ingérer que les particules de taille comprise entre 0,2 et 50  $\mu\text{m}$ . Les larves du genre *Aedes* et *Culex* sont capables de descendre le long de la colonne d'eau pour venir se nourrir sur le fond des gîtes tandis que les larves d'*Anopheles*, au siphon respiratoire très court (Figure 2), se nourrissent principalement à la surface de l'eau. Les larves cesseront de s'alimenter au quatrième stade larvaire en préparation de la phase de nymphose.

La **nympe** est le stade transitoire entre le stade larvaire et adulte. Lors de cette phase, le moustique est toujours mobile mais il ne se nourrit plus. L'adulte va se développer à l'intérieur de la nympe grâce aux réserves accumulées lors des stades larvaires. Après deux à trois jours, l'adulte va émerger en provoquant une rupture de la cuticule à la jonction entre la tête et le thorax de la nympe.

Les **adultes** mâles émergent généralement plus tôt que les femelles (de quelques heures à plusieurs jours), permettant à leur appareil reproducteur de devenir mature. La différence entre les adultes mâles et femelles repose sur deux critères principaux : la **taille**, les femelles étant nettement plus grosses que les mâles, ainsi que la structure des **antennes**, fines chez la femelle alors qu'elles sont plumeuses chez le mâle, lui permettant de détecter les phéromones de la femelle lors de la recherche de partenaire sexuel (Figure 3).



**Figure 3.** Illustrations de moustiques *Aedes aegypti* adultes. Les flèches en rouge indiquent les antennes plumeuses des mâles. Adapté de (Goeldi, 1905)

Comme de nombreux insectes, les moustiques adultes se nourrissent de nectar de fleurs. Seules les femelles, trois à quatre jours après leur accouplement avec les mâles, vont réaliser un repas de sang sur un hôte vertébré plus ou moins spécifique selon l'espèce. Cet apport protéique est indispensable pour la maturation de leurs œufs. La fécondation des œufs a lieu lors de la ponte, grâce au sperme des mâles stocké dans la spermathèque de la femelle. Les femelles des genres *Culex* et *Anopheles* pondent leurs œufs à la surface d'eau stagnante permanente, individuellement (*Anopheles*) ou sous forme de radeaux (*Culex*). À l'inverse, les femelles du genre *Aedes* pondent généralement leurs œufs individuellement sur les berges de gîtes temporaires à l'interface entre l'air et l'eau. Une fois le gîte asséché, les œufs peuvent rester viables plusieurs mois jusqu'à la prochaine mise en eau.

## 2. Le moustique, tueur malgré lui

En plus d'occasionner une gêne importante en raison de leurs piqûres, les moustiques sont responsables de la transmission de nombreuses maladies ayant un **fort impact sanitaire et économique sur les populations humaines** (Tableau 2). La prise de conscience du rôle du moustique dans la transmission de pathogènes pouvant induire des maladies s'est faite tardivement. En effet, jusqu'en 1897, on pensait que la fièvre jaune était transmise par l'air nauséabond des marais (Ross, 1901). De même, alors que la dengue sévissait depuis 1779 en Asie, Afrique et Amérique, ce n'est qu'en 1906 que les moustiques du genre *Aedes* ont été décrits comme vecteurs (Henchal et Putnak, 1990; Gubler, 1998). Lorsqu'une personne porteuse d'une maladie ayant le moustique pour vecteur est piquée, le pathogène peut alors entrer dans l'organisme du moustique. Après plusieurs jours durant lesquels le pathogène se développe, il migrera dans les glandes salivaires. Pour réaliser son repas de sang, la femelle injecte un peu de salive contenant des anticoagulants ainsi que des anesthésiques (Ribeiro et Francischetti, 2003). Si le moustique est porteur d'un

pathogène, il pourra alors contaminer les hôtes qu'il piquera par la suite lors de l'injection de sa salive.

L'augmentation des échanges internationaux ainsi que le réchauffement climatique ont permis à certaines espèces de moustiques de coloniser rapidement de nouveaux milieux (Patz *et al.*, 1996; Benedict *et al.*, 2007). Durant la dernière décennie, ces flux migratoires ont entraîné une propagation mondiale sans précédents de maladies jusque-là endémiques de certaines régions du globe (Gould *et al.*, 2010; Weaver et Reisen, 2010; Thai et Anders, 2011). On citera pour exemple le Virus du Nil Occidental, qui sévissait principalement en Tunisie et en Israël jusqu'en 1999 (Jia *et al.*, 1999). Depuis son introduction à New York il y a plus de 10 ans, il n'a cessé de progresser aux Etats-Unis où il s'est durablement installé ainsi qu'au Canada et au Venezuela (Petersen et Hayes, 2004; Venkatesan et Rasgon, 2010).

Hormis le vaccin contre la fièvre jaune jugé très efficace (Theiler et Smith, 1937; OMS, 2011a), les traitements préventifs et curatifs sont rares pour les maladies transmises par les moustiques (Tableau 2). La lutte contre ces maladies repose donc essentiellement sur le contrôle de leur vecteur.

**Tableau 2.** Principales maladies humaines transmises par les moustiques. La maladie ainsi que le pathogène responsable, sa prévalence et le vecteur principal sont indiqués. Les symptômes préventifs (vaccin) et curatifs sont indiqués. \*Définitions : anémie, diminution de la concentration en hémoglobine dans le sang ; arthralgie, douleurs articulaires ; céphalées, maux de tête.

Maladie	Pathogène	Vecteur	Prévalence	Symptômes	Traitement	Références
<b>Paludisme (Malaria)</b>	Protozoaire <i>Plasmodium</i>	<i>Anopheles</i>	En 2009, 225 millions de cas entraînant 781.000 décès. Responsable de 20% de la mortalité infantile africaine.	Fièvre, céphalée*, vomissement. Evolution vers une anémie sévère*, détresse respiratoire, atteinte cérébrale entraînant la mort.	Quelques vaccins expérimentaux à l'essai. Traitement à base d'artémisinine qui réduit la mortalité et la transmission de la maladie.	(OMS, 2010; OMS, 2011c)
<b>Dengue</b>	Virus	<i>Aedes</i> ( <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> )	2/5 de la population mondiale à risque ; 50 millions de cas par an.	Symptômes grippaux, forte fièvre, céphalée*, peut être mortelle si hémorragique.	Aucun vaccin ni traitement spécifique disponibles.	(Gubler, 1998; Kyle et Harris, 2008; OMS, 2009)
<b>Fièvre jaune</b>	Virus	<i>Aedes</i> ( <i>Aedes aegypti</i> )	200.000 cas par an (30.000 morts).	Fièvre hémorragique, vomissements, jaunisse, céphalée*, détérioration des organes, mort.	Vaccin sûr, abordable et très efficace. Pas de traitement spécifique. Maladie incurable.	(Theiler et Smith, 1937; Tomori, 2004; OMS, 2011a)
<b>Chikungunya</b>	Virus	<i>Aedes</i> ( <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> )	Recrudescence importante de la maladie depuis 2005 (Afrique, Asie) et même en Europe depuis 2007 (Italie) et en France (2010).	Symptômes grippaux, forte fièvre, céphalée*, arthralgie* passagère.	Aucun vaccin ni traitement spécifique disponibles.	(OMS, 2008; Gould et al., 2010; Schwartz et Albert, 2010)
<b>Virus du Nil Occidental (VNO)</b>	Virus	<i>Culex</i>	Recrudescence importante de la maladie depuis 1999 dans le monde, notamment l'Amérique du Nord.	Maladie neurologique mortelle chez le cheval. Pour 20% des hommes infectés, fièvre, céphalée*, vomissements, éruptions cutanées voire neuro-dégénérescence.	Vaccin pour chevaux. Aucun vaccin, ni traitement spécifique pour l'homme	(Jia et al., 1999; Petersen et Hayes, 2004; Kramer et al., 2008; OMS, 2011d)
<b>Filariose lymphatique</b>	Nématode (Filariés)	<i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> et <i>Aedes</i>	1,3 milliards de personnes à risque ; 40 millions de personnes atteintes.	Altération du système lymphatique ; hypertrophie de certaines parties du corps.	Aucun vaccin, traitement annuel à l'aide de deux médicaments combinés.	(OMS, 2011b)

## C. Un monde sans moustique

Nous avons vu que la lutte contre les moustiques est importante d'un point de vue sanitaire. Cependant, qu'en est-il d'un point de vue écologique et sociétal ? Eradiquer le moustique est-il sans conséquences ?

### 1. Éradiquer le moustique : est-ce souhaitable ?

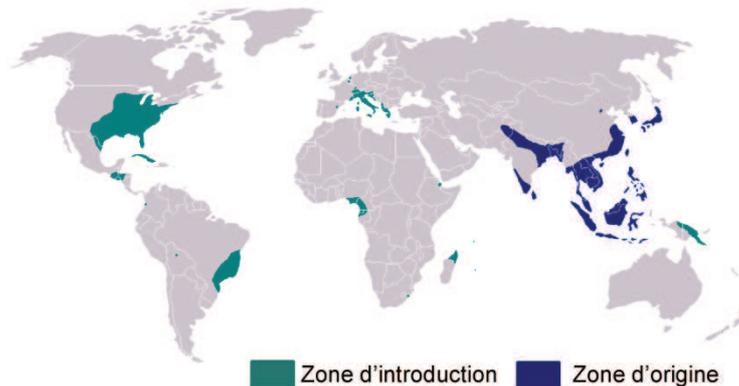
Rien que cette première question suffit à susciter le débat au sein de la communauté scientifique ainsi qu'avec diverses associations de protection des animaux. Les moustiques ont un **rôle important dans l'écosystème**, servant de nourriture à de nombreuses espèces animales (Clements, 1992). Au stade larvaire, les moustiques sont des proies de choix pour les poissons, les larves d'Odonates, et les autres prédateurs aquatiques. Au stade adulte, ce sont les oiseaux, les chauves-souris, et d'autres arthropodes tels que les araignées qui profitent notamment des essaims de mâles pour s'en nourrir. Les larves de moustiques, en tant qu'insecte filtreur, jouent aussi un rôle important dans le recyclage des débris végétaux en décomposition et l'épuration des eaux, à l'instar des daphnies. De plus, comme les adultes représentent une biomasse importante et qu'ils se nourrissent de nectar de fleurs, ils participent à la pollinisation de certaines plantes, notamment de certaines orchidées (Crandall, 1913; Thien, 1969; Gorham, 1976).

Dans un article publié dans le journal *Nature*, l'auteur, ainsi que plusieurs scientifiques internationaux interviewés, défendent une thèse plutôt radicale selon laquelle le moustique ne serait pas indispensable à l'écosystème (Fang, 2010). Selon eux, l'éradication du moustique entraînerait un bouleversement négligeable de l'écosystème, le moustique étant à terme remplacé par quelque chose d'autre, de mieux ou de pire (Fang, 2010). D'un point de vue écologique, ce raisonnement est dangereux car il ne prend en compte que la partie émergée de l'iceberg, oubliant les interactions directes et indirectes difficilement mesurables qu'entretient le moustique avec tous les maillons de la chaîne alimentaire (Wickson, 2010). De plus, l'éradication des moustiques revêt des aspects sociétaux, politiques et économiques importants qui limitent sa mise en œuvre, notamment lorsqu'il s'agit d'espaces naturels protégés (Barneoud, 2006; Claeys-Mekdade et Nicolas, 2009; Barbault *et al.*, 2011) ou de lutte en milieu urbain (Luz *et al.*, 2011).

### 2. Éradiquer le moustique : est-ce réalisable ?

Quand bien même l'éradication du moustique apparaîtrait comme une alternative envisageable, en sommes-nous réellement capables ? Sachant que toute eau stagnante est un gîte à moustiques potentiel et connaissant le fort pouvoir adaptatif des moustiques à leur

environnement, il paraît invraisemblable de pouvoir exterminer tous les moustiques. L'exemple du « moustique tigre » *Aedes albopictus* illustre bien ce phénomène. Originnaire d'Asie du Sud-Est (Chine, Inde, Indonésie), *Ae. albopictus* a progressivement colonisé le continent américain ainsi que l'Europe et l'Afrique malgré l'important dispositif déployé pour freiner sa progression (Gratz, 2004; Desenclos et Fontenille, 2011) (Figure 4). Cette expansion mondiale est corrélée avec la propagation de pathogènes dont il est le vecteur (Rezza *et al.*, 2007; Paupy *et al.*, 2009; Lambrechts *et al.*, 2010).

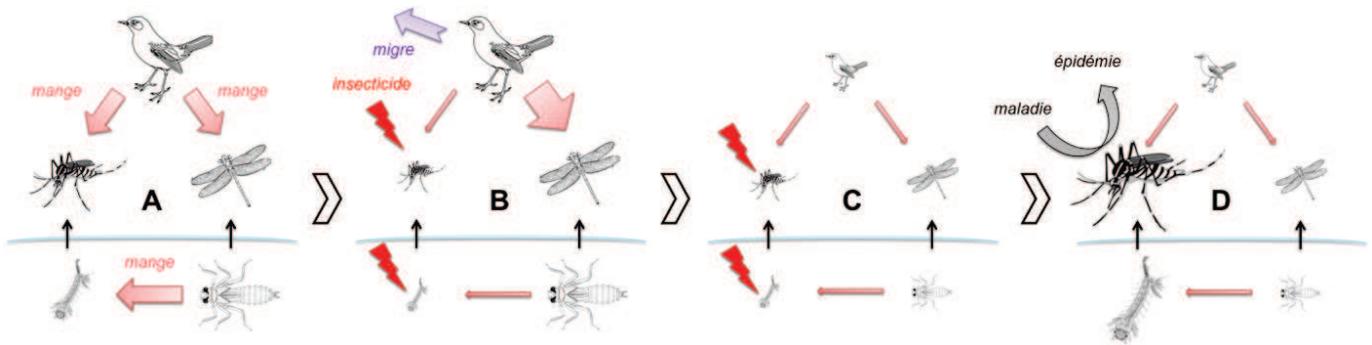


**Figure 4.** Aire de répartition du moustique *Aedes albopictus* en 2007. L'aire de répartition originelle du moustique est signalée en bleu et les zones d'introduction en vert. Adapté d'une image de Wikipédia.

A une échelle globale, on se rend compte que les stratégies de lutte sont impuissantes pour bloquer la progression de moustiques à fort potentiel invasif tel qu'*Ae. albopictus*. Cependant, à une échelle plus locale, la lutte anti-moustique permet de contrôler les populations de moustiques afin de réduire la nuisance pour les populations humaines et de limiter le risque de transmission des pathogènes. Loin de parvenir à éradiquer complètement les moustiques, les actions de démoustication s'avèrent donc indispensables d'un point de vue sanitaire et économique, sans toutefois avoir d'impact délétère sur les écosystèmes.

### 3. Vers l'éradication de maladies : l'homme comme nouveau prédateur

Le contrôle systématique et intensif des moustiques a d'ores et déjà permis de faire disparaître des pathogènes dans certaines régions du monde (Soper, 1963; Harrison, 1978). Ainsi, dans les années 50, l'île de la Réunion a réussi à éradiquer le paludisme grâce à une lutte agressive contre le moustique. Même s'ils sont rares, ces événements sont encourageants mais doivent également servir de leçon. En effet, si l'homme décide de contrôler les populations de moustiques, il s'engage pour une durée indéterminée dans cette lutte. Pour illustrer les mécanismes qui entrent en jeu, essayons de schématiser un écosystème simple perturbé par un traitement insecticide (Figure 5) :



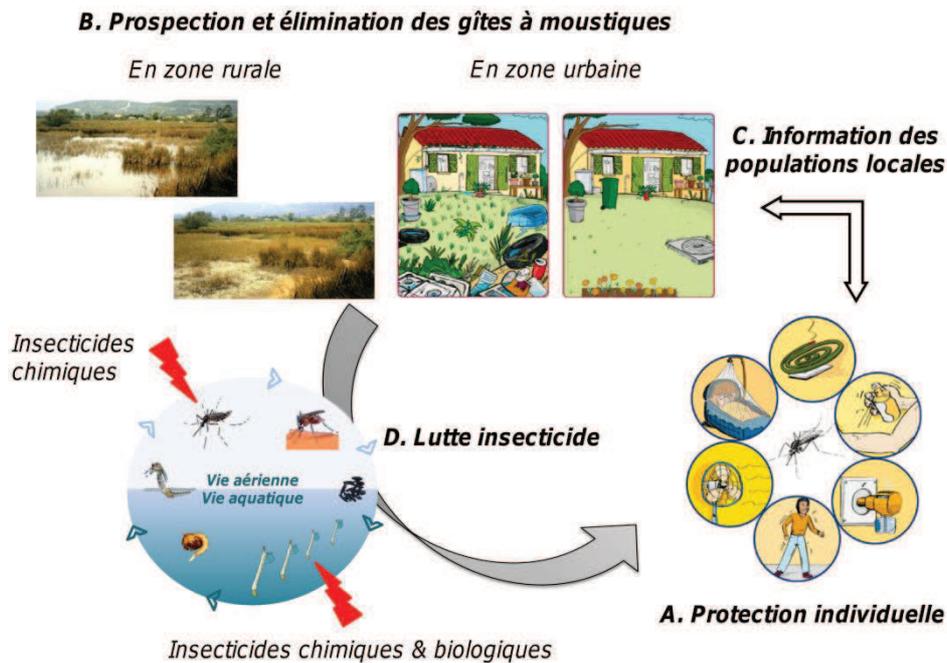
**Figure 5.** Schéma d'illustration de la dynamique d'un écosystème simple perturbé par un traitement insecticide. La taille des individus traduit l'abondance relative de l'espèce dans l'écosystème. L'épaisseur des flèches rouges traduit l'importance de la prédation.

En situation non perturbée (Figure 5A), l'oiseau, super-prédateur dans ce système, se nourrit de moustiques et de libellules. En milieu aquatique, les larves de libellules sont des prédateurs des larves de moustiques. L'application de la pression insecticide entraîne un rééquilibrage de l'écosystème (Figure 5B). L'oiseau compense la perte de moustiques en se nourrissant davantage de libellules et migre vers des gîtes plus riches en ressources. A terme, si la pression de l'insecticide perdure (Figure 5C), la quantité de prédateurs va localement diminuer pour s'adapter à la quantité de moustiques présents. Si l'homme relâche la pression de sélection (Figure 5D), les moustiques se retrouvent surnuméraires. La pression de prédation ne suffit plus à contrôler leur population. En cas d'arrivée d'une nouvelle maladie, une épidémie peut rapidement se propager.

C'est peut-être ce qui s'est passé sur l'île de la Réunion quand, plus de 50 ans après la disparition du paludisme, une épidémie de Chikungunya a frappé l'île, affectant environ 40% des habitants de l'île (Consigny *et al.*, 2006). Pour lutter contre les moustiques et les pathogènes qu'ils transmettent, il est donc nécessaire d'adopter une approche efficace, adaptée au contexte et durable dans le temps.

## II. De l'art de tuer des moustiques

La lutte contre les moustiques et les pathogènes qu'ils transmettent s'effectue à différentes échelles, de l'élimination des gîtes larvaires à la sensibilisation des populations autochtones (Figure 6).



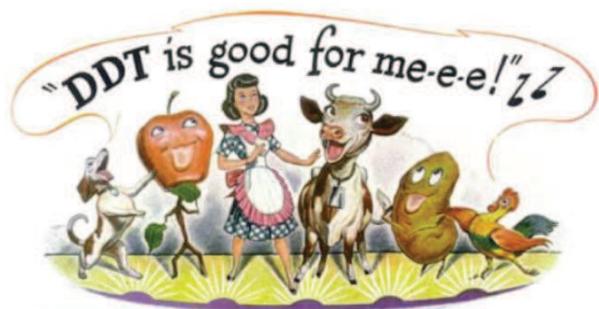
**Figure 6.** Multiples aspects de la lutte contre le moustique et les maladies qu'il transmet. Sources des illustrations : <http://www.eid-med.org/> et <http://moustiquesinfos.sante.gouv.fr>

Afin de limiter les piqures de moustiques, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise de porter des vêtements longs et clairs et de disposer des moustiquaires au-dessus des lits ainsi qu'à toutes les fenêtres (Figure 6A). L'utilisation de **répulsifs** appliqués directement sur la peau ou imprégnés sur les vêtements, moustiquaires et rideaux, tels que le DEET (répulsif conventionnel) ou l'IR3535 (répulsif biologique), est également recommandée (Faulde *et al.*, 2010) (Figure 6A).

A une échelle plus globale, la lutte contre les moustiques passe par une recherche intensive des **gîtes à moustiques** potentiels, à la fois en zone rurale et urbaine (Figure 6B). En France métropolitaine, cette tâche incombe aux Ententes Interdépartementales pour la Démoustication (EID) localisées dans les régions Atlantique, Méditerranée, Rhône-Alpes. En Corse, Martinique et Guyane, la démoustication est coordonnée par les Conseils généraux alors que ce sont les Agences Régionales de Santé (ARS) qui en ont la charge à la Réunion, Mayotte et Guadeloupe. Les premiers moyens mis en œuvre pour lutter contre les moustiques furent, dès les années 60, l'élimination des zones humides (assèchement des marais et marécages), habitats naturels du moustique. La prise de conscience de la valeur patrimoniale et écologique des zones humides, véritables oasis de biodiversité, a rapidement conduit à l'abandon de cette méthode en milieu rural. Cependant, la **lutte contre la prolifération des gîtes à moustiques en milieu urbain** est toujours d'actualité (Figure 6B). En effet, certains moustiques urbains pondent leurs œufs dans n'importe quelle eau stagnante permanente générée par des pneus abandonnés, des pots de fleurs, une piscine non entretenue ou une réserve d'eau non protégée par exemple.

Cette lutte implique nécessairement **d'éduquer et d'informer les populations locales** de la marche à suivre afin de limiter la prolifération des moustiques ainsi que le risque de pique et de transmission de maladies (Figure 6C). Cette mission de prévention est également réalisée par les EIDs et fait l'objet de larges campagnes d'information à l'initiative de l'Etat, notamment lors de l'épidémie de Chikungunya sur l'île de la Réunion<sup>1</sup>. Cependant, cette mission est complexe, laborieuse et donne des résultats aléatoires, les agents étant souvent confrontés à la réticence des populations à concevoir le moustique comme cause unique de transmission de la maladie (Heintze *et al.*, 2007; Setbon *et al.*, 2008; Setbon et Bley, 2009). Cette approche est nécessaire mais doit être préventive, ne pouvant constituer une action efficace et rapide en réponse à l'urgence d'une menace épidémique.

La **lutte à l'aide d'insecticides** est actuellement le moyen le plus efficace pour lutter contre les moustiques (Figure 6D). La « découverte de la grande efficacité du DDT en tant que poison contre divers arthropodes » valu le prix Nobel de médecine à Paul Hermann Müller et marque le début de l'essor des **insecticides chimiques**. Le DDT est vendu comme le produit miracle, sans danger pour les enfants, les animaux, les produits alimentaires et à pulvériser dans toute la maison (Figure 7) ! La fabrication facile et peu coûteuse de cet organochloré a permis son utilisation massive dans le monde entier afin de contrôler les populations d'insectes, notamment les moustiques dans la lutte contre la dengue et la malaria dès 1945. Cependant, à peine un an après le début de son utilisation pour la démoustication, les premiers cas de résistance<sup>2</sup> ont été identifiés en populations naturelles (Brown et Pal, 1971; Hemingway et Ranson, 2000).



**Figure 7.** Publicité pour du papier peint pour chambres d'enfants imprégné de DDT fabriqué par l'entreprise TRIMZ (gauche) et publicité pour le DDT à pulvériser de l'entreprise Killing Salt Chemicals (droite). Le texte de gauche affirme que le papier peint n'est « pas dangereux pour les enfants, adultes, animaux et vêtements. Certifié absolument sûr pour une utilisation dans la maison ! » Source : <http://thesocietypages.org/socimages/2011/06/page/2/>

<sup>1</sup> Un site didactique recensant toutes les informations nécessaires à la prévention contre le chikungunya a été créé par la préfecture de la Réunion : <http://moustiquesinfos.sante.gouv.fr/>

<sup>2</sup> Résistance : capacité d'individus à survivre à des doses de pesticide létales pour des individus sensibles de la même espèce.

La volonté de contourner ces résistances a abouti au développement d'une deuxième génération d'insecticides de synthèse comprenant les organophosphorés (malathion, téméphos, etc.), les carbamates (carbaryl, propoxur, etc.) et les pyréthroïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine, etc.). Tous ciblent la transmission de l'influx nerveux au niveau synaptique, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés, carbamates) soit en perturbant les canaux à sodium voltage-dépendant (organochlorés, pyréthroïdes). Très persistants dans l'environnement et peu spécifiques, ces insecticides ont entraîné une adaptation rapide des moustiques et l'apparition de forts niveaux de résistance, diminuant de manière importante leur efficacité (Hemingway et Ranson, 2000). En 1962, la faible spécificité du DDT pour les espèces ciblées, ses effets cancérigènes pour l'homme et son impact négatif sur l'environnement, notamment sur la reproduction des oiseaux, ont été dénoncés par Rachel Carson dans son livre intitulé *Silent Spring* (« *Printemps silencieux* ») (Carson, 1962). Véritable pamphlet contre les insecticides chimiques, ce livre est à l'origine des mouvements écologiques des années 70 et mena à l'interdiction de nombreux insecticides chimiques.

Cette prise de conscience de l'importance d'une lutte « propre » et efficace contre les moustiques a entraîné le développement d'une troisième génération d'insecticides, comprenant notamment les **insecticides biologiques** (Figure 6D) tels que les toxines produites par les bactéries *Bacillus sphaericus* (*Bs*) et *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) (Charles et Nielsen-LeRoux, 2000). ***Bacillus sphaericus*** est une bactérie entomopathogène produisant naturellement deux toxines (BinA et BinB) qui tuent les larves de moustiques après avoir été ingérées (Lacey, 2007). Utilisé en France dès 1989 par l'EID Méditerranée afin de remplacer les insecticides chimiques, *Bs* a également été utilisé avec succès dans le monde entier pour contrôler les populations de *Culex* et d'*Anopheles* (Karch *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1996; Regis *et al.*, 2001). Cependant, de forts niveaux de résistance ont rapidement été observés en populations naturelles (Yuan *et al.*, 2000; Nielsen-Leroux *et al.*, 2002). Les résistances au *Bs* n'entraînant aucune baisse de sensibilité au *Bti*, il est actuellement autorisé en démoustication uniquement en combinaison avec le *Bti* (Regis *et al.*, 2001).

De nombreux pays ont d'ores et déjà interdit les insecticides chimiques dans la lutte anti-moustiques, notamment en Europe avec la directive « Biocides » interdisant l'utilisation des insecticides non-homologués à partir de Septembre 2006. Certaines dérogations ont été accordées, jusqu'en 2014 pour le Téméphos dans le cadre de la lutte anti-vectorielle en territoires d'Outre-mer, mais l'arrêt définitif de leur utilisation est néanmoins programmé. L'interdiction de l'utilisation de nombreux insecticides chimiques a fait du *Bti* le seul larvicide utilisé en démoustication. Cette réglementation place actuellement le ***Bti* en situation de**

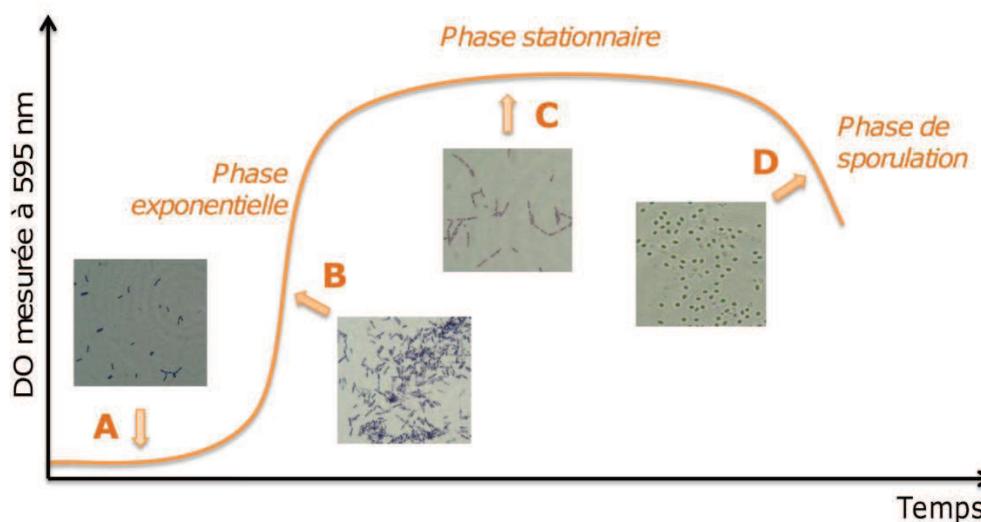
**quasi-monopole.** Connaissant la capacité des moustiques à s'adapter et à développer rapidement des résistances aux insecticides, pourquoi penser que, cette fois-ci, le *Bti* sera épargné ? Pourquoi le *Bti* est-il perçu comme un insecticide quasi-parfait ?

### III. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

#### A. Historique et description

Isolée pour la première fois au Japon en 1901, de nombreuses souches de *Bacillus thuringiensis* ont depuis été décrites dans le monde entier, isolées à partir de milieux très diversifiés tels que du sol, du bois, des feuilles ou des cadavres d'insectes dans lesquels elles se multiplient (Roh *et al.*, 2007). Bien qu'ubiquiste, la présence de spores de *Bt* dans de multiples compartiments environnementaux ne signifie pas qu'elle s'y multiplie et son statut de « vrai » **entomopathogène** a récemment été confirmé (Raymond *et al.*, 2010). En 1976, la sous-espèce *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) a été isolée d'un étang en Israël dans lequel elle avait proliféré et tué toutes les larves de moustiques (Goldberg et Margalit, 1977).

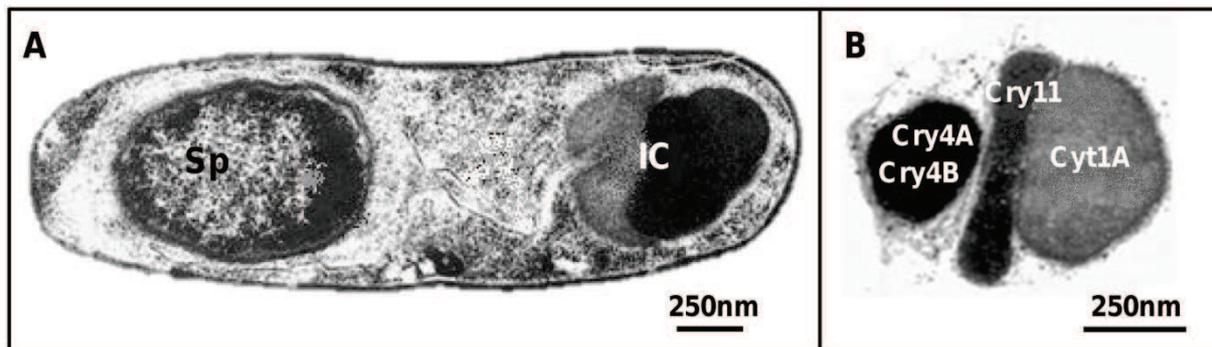
L'espèce *Bacillus thuringiensis* fait partie du groupe des bactéries de type *Bacillus cereus* et se divise en 82 sous-espèces, déterminée à partir des antigènes de leur flagelle H (de Barjac et Frachon, 1990; Lambert et Peferoen, 1992). *Bacillus thuringiensis* est une bactérie entomopathogène Gram positive, anaérobique stricte ou facultative (Schnepf *et al.*, 1998). Cette toxicité pour de nombreuses espèces d'insectes est liée à la capacité des bactéries *Bacillus thuringiensis* à produire un cristal protéique toxique lors de leur sporulation (Figure 8D) (Schnepf *et al.*, 1998).



**Figure 8.** Croissance et sporulation des bactéries *Bti* en fonction du temps. Le milieu est inoculé (A). Lors de la phase exponentielle (B), les bactéries vont consommer le milieu (ou l'hémolymphe de l'insecte). Une fois que les ressources du milieu sont quasiment épuisées, les bactéries commencent à produire les cristaux protéiques et les formes de résistance (spores) (C). Une fois le milieu

complètement épuisé, la libération des spores et des cristaux se réalise par éclatement de la bactérie, marqué par une chute de la densité optique du milieu de culture (D). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique avec une coloration de Gram (A, B, C) ou sans coloration (D) (G = 1.000X).

Le cristal de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* a la particularité d'être composé principalement de quatre toxines en mélange : **Cry4Aa**, **Cry4Ba**, **Cry11Aa** et **Cyt1Aa**. Trois autres gènes codant pour les toxines Cry10Aa, Cyt1Ca et Cyt2Ba ont également été décrits mais il semble que ces toxines ne soient peu ou pas produites par la bactérie (Guerchicoff *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 2002). Contrairement aux autres sous-espèces de *Bt* aux cristaux bipyramidaux généralement constitués d'une seule toxine, le cristal de *Bti* est une structure parasporale sphérique composée de trois inclusions maintenues par une enveloppe lamellaire (Figure 9) (Federici *et al.*, 2003). Les toxines Cry sont capables de former spontanément un cristal sphérique (Cry4Aa + Cry4Ba) ou rhomboïde (Cry11Aa) tandis que la cristallisation des toxines Cyt nécessite des protéines accessoires (Schnepf *et al.*, 1998).



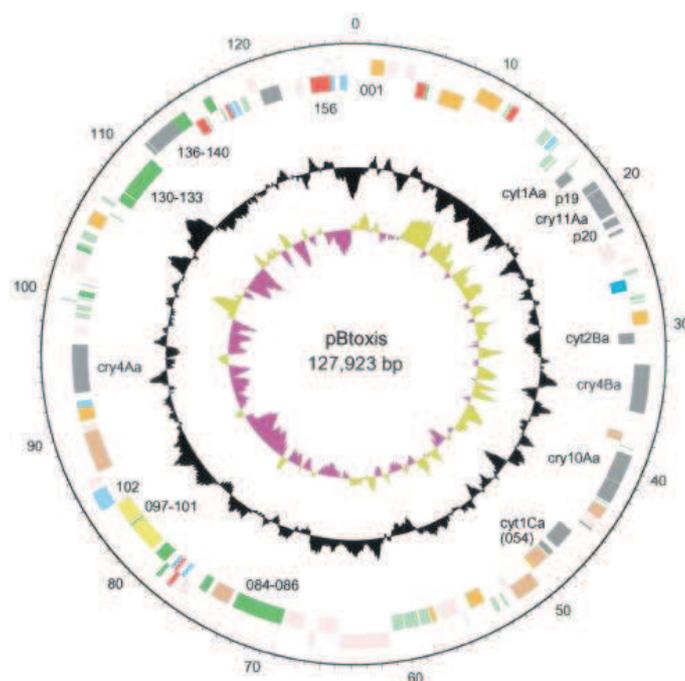
**Figure 9.** *Bacillus thuringiensis var. israelensis* en phase de sporulation (gauche) et cristal de *Bti* (droite). Sp, spore; IC, inclusion cristalline. Adapté de (Federici *et al.*, 2003).

## B. Diversité des toxines produites par *Bacillus thuringiensis*

Les bactéries *Bacillus thuringiensis* produisent plusieurs types de toxines parmi lesquelles des toxines larvicides : des  **$\delta$ -endotoxines** produites sous forme de cristal durant la sporulation de la bactérie (Figure 8D) et des toxines **Vip** (Vegetative Insecticidal Proteins) produites durant la phase végétative (Figure 8B). Trois groupes de toxines Vip (Vip1/Vip2 et Vip3) représentant un total de 28 toxines ont été décrites chez plusieurs sous-espèces de *Bt* (Crickmore *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2011; Crickmore *et al.*, 2012). Après ingestion par les larves, elles s'insèrent dans les membranes lipidiques des cellules intestinales entraînant la mort des cellules (Lee *et al.*, 2003b; Leuber *et al.*, 2006). Néanmoins, ces toxines ne semblent participer que faiblement à la toxicité du *Bt* en comparaison des  $\delta$ -endotoxines.

235  $\delta$ -endotoxines produites par l'ensemble des sous-espèces de *Bt* décrites ont été recensées à ce jour (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2012). Chaque toxine est

codée par un seul gène porté par un des plasmides de la bactérie. Par exemple, les gènes codant les toxines du *Bti* sont portés par le plasmide pBtoxis contenant également de nombreux autres gènes impliqués dans la sporulation, la germination ou codant pour des antibiotiques (Figure 10) (Berry *et al.*, 2002). La connaissance de ces plasmides a permis de mettre en évidence leur forte plasticité à l'origine de la grande diversité des toxines (Schnepf *et al.*, 1998) et ouvre la voie à la transgénèse des bactéries dans le but d'optimiser la lutte contre les pestes à l'aide de nouveaux produits biocides plus performants (Federici *et al.*, 2007; Federici, 2010). A la fin du XX<sup>ème</sup> Siècle, la maîtrise de ces plasmides a également permis l'essor de la transgénèse chez les plantes telles que le maïs ou le coton. L'insertion de gènes codants pour des toxines de *Bt* dans le génome de la plante lui confère une résistance « naturelle » contre ses ravageurs. Cette modification génétique de plantes s'est heurtée à de nombreuses réticences au niveau international, suscitant de nombreux débats sur le danger pour les populations humaines et l'impact sur l'environnement (Ricroch *et al.*, 2010; Meissle *et al.*, 2011; Ryffel, 2011).



**Figure 10.** Représentation circulaire du plasmide pBtoxis provenant de la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Code couleur des gènes : gris, toxine et peptide antibiotique ; rose, transposon ; orange, hypothétique gène conservé ; rouge, métabolisme de l'ADN ; bleu, régulation ; vert foncé, protéines de surface ; vert clair, inconnu ; jaune, métabolisme. Les nombres à l'extérieur du cercle indiquent la taille en kilopaires de bases. Source : (Berry *et al.*, 2002).

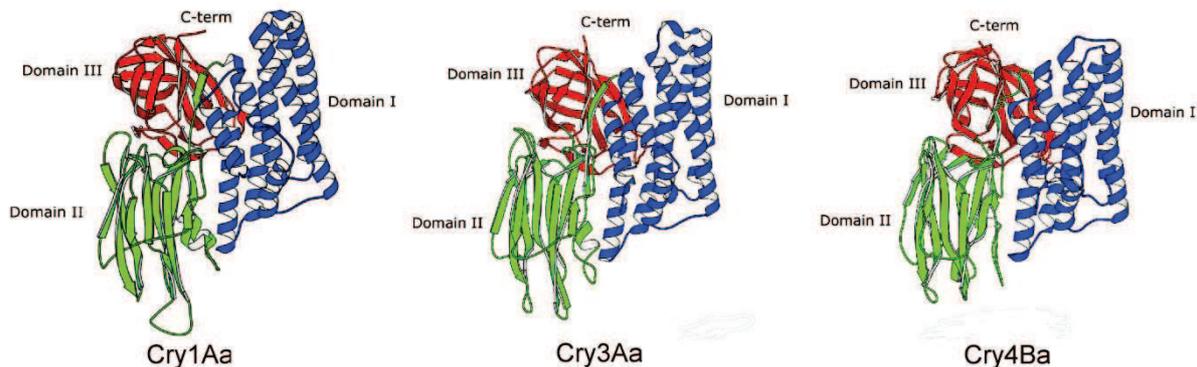
Chaque toxine est spécifique d'un groupe d'espèces parmi un des ordres d'insectes. Ainsi, certaines toxines *Bt* ciblent les larves de Lépidoptères (mites, papillons), de Coléoptères (scarabées, charançons), d'Hyménoptères (abeilles, guêpes), de Diptères (mouches, moustiques) mais également de nématodes (de Maagd *et al.*, 2001). On retrouve deux familles de toxines très différentes parmi les  $\delta$ -endotoxines : les **toxines Cry**,

caractéristiques de *Bacillus thuringiensis*, et les **toxines Cyt**, présentes chez une dizaine de sous-espèces, dont le *Bti* (Schnepf *et al.*, 1998). La nomenclature de chaque famille de toxines est régie par leur homologie de séquence protéique. Les toxines partageant le même numéro auront au moins 45% de leurs séquences protéiques identiques (Cry1, Cry4, Cry11, etc.), la même lettre majuscule au moins 78% (Cry1A, Cry4B, Cry11A, etc.) et la même lettre minuscule au moins 95% (Cry1Ac, Cry4Ba, Cry11Aa, etc.) (de Maagd *et al.*, 2001). Cette dénomination permet d'identifier les toxines proches et de cibler *a priori* leurs insectes cibles sans avoir à faire de tests toxicologiques à l'aveugle, facilitant la caractérisation de nouvelles toxines insecticides.

## C. Les toxines Cry

### 1. Structure des toxines Cry

Les toxines Cry sont généralement constituées de **trois domaines principaux**, un domaine à hélices alpha (domaine I) et deux domaines à feuillets bêta (domaines II et III) (Figure 11) (Bravo *et al.*, 2011).



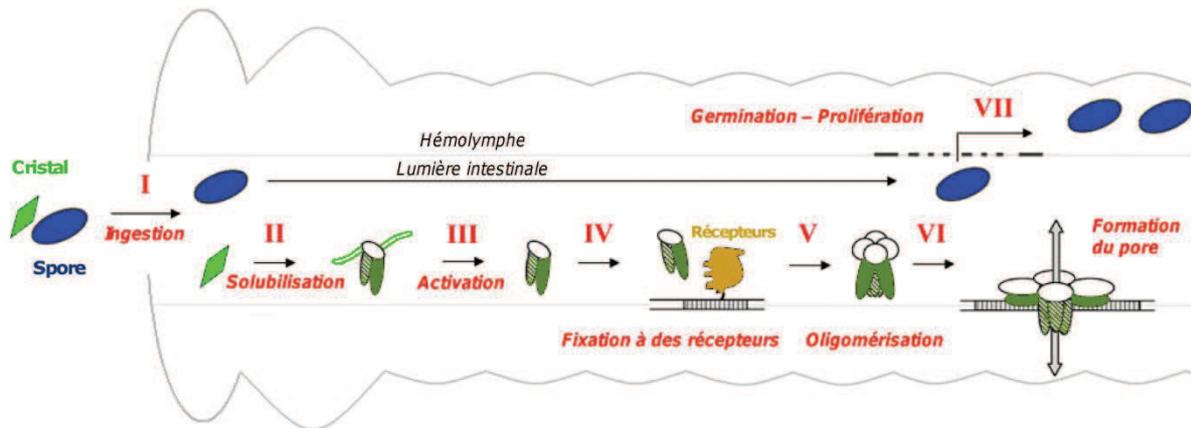
**Figure 11.** Structures tridimensionnelles de trois toxines Cry toxiques pour les Lépidoptères (Cry1Aa, gauche), pour les Coléoptères (Cry3Aa, centre) et pour les Diptères (Cry4Ba, droite). Le domaine I (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine II (feuillets bêta) en vert et le domaine III (feuillets bêta) en rouge. Adapté de (Angsuthanasombat *et al.*, 2004).

Toutes les toxines Cry partagent une homologie de leur structure tridimensionnelle et chaque domaine remplit une fonction précise dans le mode d'action de la toxine : les feuillets bêta assurent la reconnaissance des sites de fixation tandis que les hélices alpha forment le pore transmembranaire responsable de la mort cellulaire (Li *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005).

La nécessité de comprendre le mode d'action des toxines Cry a donné lieu à de nombreuses études, notamment sur les toxines Cry1 actives contre les Lépidoptères dans le contexte des plantes génétiquement modifiées. Cela a abouti à plusieurs modèles non mutuellement exclusifs sur la manière dont les toxines Cry tuent les larves d'insectes.

## 2. De l'ingestion à l'infection : mode d'action des toxines Cry

Le mécanisme de mort induit par le *Bt* comprend un total de sept étapes principales (Figure 12).



**Figure 12.** Mode d'action simplifié des toxines Cry chez une larve d'insecte. Les chiffres romains indiquent les différentes étapes du mode d'action. Les toxines sont représentées en vert et les spores en bleu. Adapté de (Bravo *et al.*, 2007).

### a) Etape I : ingestion (Figure 12, I)

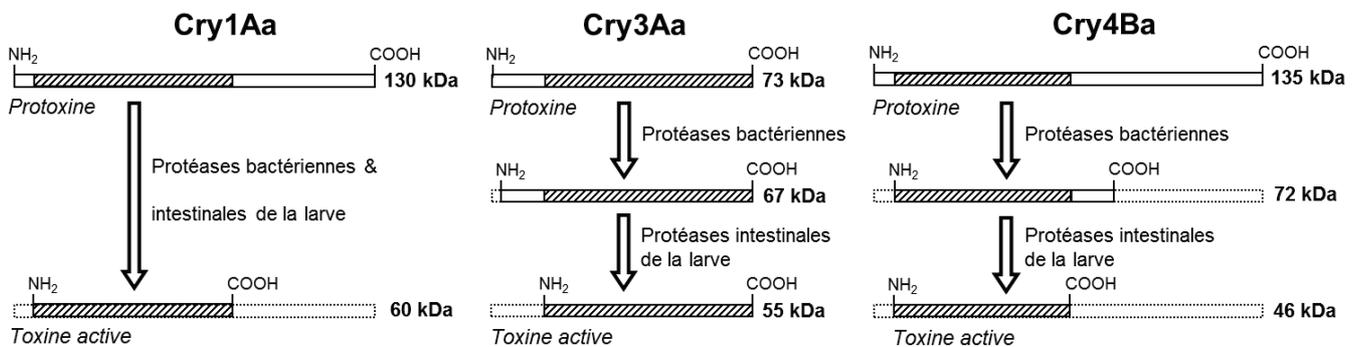
Les cristaux et spores de *Bt* sont épanchés conjointement dans l'environnement. La suspension est soit aspergée sur les plantes à protéger des phytophages soit directement dans l'eau des gîtes à moustiques. Cette suspension est ensuite ingérée par la larve d'insecte. Dans le contexte des plantes génétiquement modifiées, les toxines produites par les plantes sont généralement déjà solubilisées et activées. L'étape d'ingestion par la larve se fait donc en mangeant des parties de la plante contenant des toxines pré-activées.

Dans le cadre de la lutte contre les moustiques, différentes formulations de *Bti* existent, pourvues de spores ou non. Les formules sans spores, probablement moins appétantes, montrent généralement une baisse d'efficacité (Becker *et al.*, 1991; Becker, 2002). Contrairement aux Lépidoptères dans le contexte des OGMs, les moustiques se nourrissent de particules relativement grosses rendant impossible l'épandage des toxines sous forme soluble, sous peine de diminuer d'un facteur 100 à 10.000 leur toxicité pour les larves (Schnell *et al.*, 1984; Cheung et Hammock, 1985).

### b) *Etapes II & III : solubilisation et activation (Figure 12, II & III)*

Une fois ingéré, le cristal se dissout dans l'intestin des larves à un pH variant entre 9,5 (toxines Cry1, Lépidoptères) et 12 (toxines du *Bti*, Diptères) par cassure des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes qui assurent sa stabilité (Gill *et al.*, 1992).

Les protoxines solubilisées sont inactives. Pour pouvoir acquérir leur pouvoir insecticide, les protoxines doivent être activées, principalement par des enzymes digestives intestinales de la larve mais également par certaines enzymes de la bactérie *Bt* (Figure 13) (Oppert, 1999; Rukmini *et al.*, 2000). L'activation des toxines est généralement réalisée par des protéases à sérine, telles que des trypsines et des chymotrypsines (Oppert, 1999).



**Figure 13.** Protoxines et toxines toxiques pour les Lépidoptères (Cry1Aa, gauche), pour les Coléoptères (Cry3Aa, centre) et pour les Diptères (Cry4Ba, droite) activées par les protéases bactériennes et intestinales des larves d'insectes cibles. Les tailles en kilodaltons sont indiquées à côté des fragments. La toxine activée est hachurée et les régions tronquées de la protoxine sont symbolisées en pointillés. Adapté de (Rukmini *et al.*, 2000).

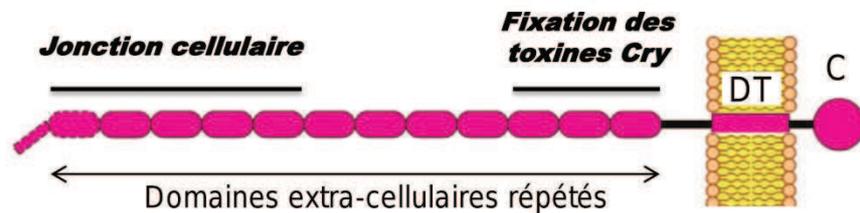
### c) *Etapes IV : fixation au(x) récepteur(s) membranaire(s) (Figure 12, IV)*

Trois principales familles de récepteurs aux toxines Cry ont été décrites : les **cadhérines**, les **N-aminopeptidases (APN)** et les **phosphatases alcalines (ALP)**. C'est à la spécificité de leurs récepteurs que l'on attribue la spécificité de chaque toxine pour leurs insectes cibles (Bravo *et al.*, 2011). Une même toxine peut se fixer à plusieurs récepteurs différents et plusieurs toxines peuvent partager le même récepteur (Ferré *et al.*, 1995).

#### (1) Cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et impliquées dans les jonctions intercellulaires (Ivanov *et al.*, 2001). Les cadhérines sont constituées d'un domaine cytoplasmique, permettant la régulation de leur fonction par les caténines, d'un domaine transmembranaire, permettant leur insertion dans la membrane

plasmique et de plusieurs domaines répétés (entre 9 et 12 chez les insectes) (Figure 14) (Angst *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 2001). Ce sont les domaines les plus éloignés de la membrane qui assurent la fonction de jonction entre les cellules alors que les toxines Cry se fixent au niveau des domaines proximaux de la membrane.



**Figure 14.** Cadhérine insérée dans la membrane d'une cellule d'insecte. Légende : DT, Domaine Transmembranaire ; C, domaine cytoplasmique. Adapté de (Pigott et Ellar, 2007).

Les cadhérines sont les premiers récepteurs aux toxines Cry à avoir été décrit (Bt-R1 pour Cry1Ab chez *Manduca sexta*) (Vadlamudi *et al.*, 1993). Depuis, les cadhérines ont été décrites comme jouant un rôle clé dans le mode d'action des toxines Cry1A chez au moins cinq autres espèces de Lépidoptères : *Bombyx mori*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Pectinophora gossypiella* et *Ostrinia nubilalis* (Pigott et Ellar, 2007). Les cadhérines sont les récepteurs auxquels les toxines Cry se fixent avec la plus grande affinité (Pigott et Ellar, 2007). Chez le moustique *Aedes aegypti*, les cadhérines sont des récepteurs avérés des toxines Cry11Aa (*Bti*) et Cry11Ba (*Bt var. jegathesan*) (Chen *et al.*, 2009a; Likitvivatanavong *et al.*, 2011a). La toxine Cry4Ba se fixe également sur des cadhérines avec une faible affinité chez *Ae. aegypti* mais très fortement chez *Anopheles gambiae* (Hua *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009a).

## (2) N-Aminopeptidases (APN)

Les aminopeptidases sont des métalloprotéases qui clivent les acides aminés de la région N-terminale des protéines, ce qui leur confère un rôle important dans la digestion des aliments par la larve (Taylor, 1993). Chez les insectes, les N-aminopeptidases (APNs) sont des enzymes membranaires ancrées grâce à un motif GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Pigott et Ellar, 2007). Elles sont localisées au niveau de radeaux lipidiques déjà impliqués dans le mode d'action de la toxine Cry1A chez *H. virescens* and *M. sexta* (Zhuang *et al.*, 2002).

Les APNs ont été décrites comme des récepteurs pour les toxines Cry1 chez six espèces différentes de Lépidoptères : *B. mori*, *H. armigera*, *H. virescens*, *Lymantria dispar*, *M. sexta* and *Plutella xylostella* (Pigott et Ellar, 2007). Les toxines Cry présentent une plus faible affinité pour les APNs que pour les cadhérines (environ 100 fois moins). Chez les moustiques *Ae. aegypti*, *A. quadrimaculatus* et *A. gambiae*, les APNs ont été décrites

comme des récepteurs pour la toxine Cry11Ba (*Btj*) (Abdullah *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Likitvivatanavong *et al.*, 2011a). Chez *Ae. aegypti*, une APN a été décrite comme un potentiel récepteur pour la toxine Cry11Aa (*Bti*) (Chen *et al.*, 2009b). Aucune étude n'a cependant été réalisée sur les deux autres toxines Cry du *Bti*, Cry4Aa et Cry4Ba (Likitvivatanavong *et al.*, 2011b).

### (3) Phosphatases alcalines (ALP)

Tout comme les APNs, les phosphatases alcalines (ALP) sont ancrées dans les membranes lipidiques des cellules à l'aide d'ancres GPI et se localisent principalement au niveau de radeaux lipidiques (Pigott et Ellar, 2007).

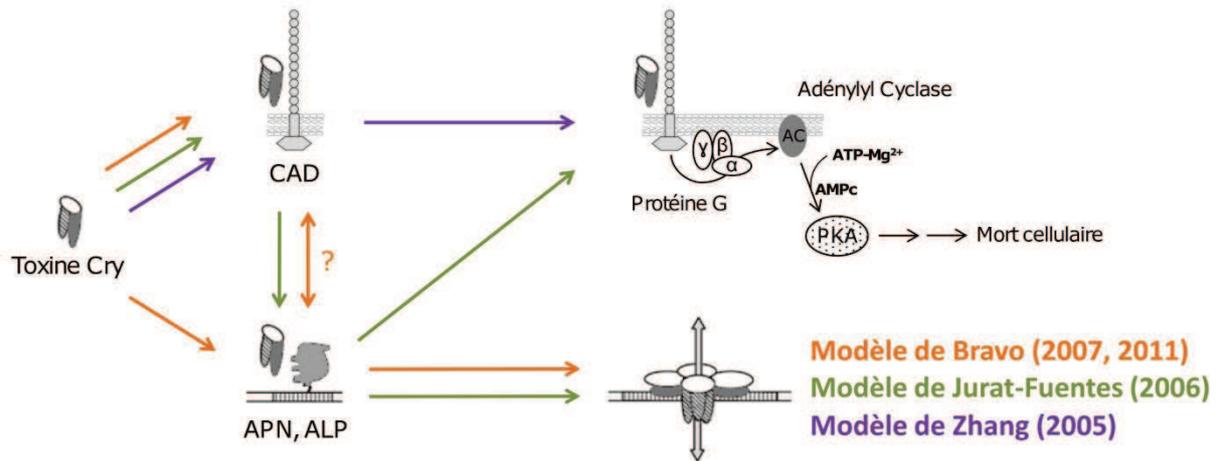
Leur implication en tant que récepteurs des toxines Cry est récente. Les ALPs ont été décrites comme de potentiels récepteurs chez *M. sexta* pour les toxines Cry1Ab et Cry1Ac et chez *H. virescens* pour Cry1Ac (McNall et Adang, 2003; Krishnamoorthy *et al.*, 2007; Arenas *et al.*, 2010). Les toxines de *Bti* Cry4Ba et Cry11Aa ainsi que Cry11Ba (*Btj*) sont également capables de se fixer à des ALPs chez *Ae. aegypti* et *A. gambiae* (Fernandez *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2009; Dechklar *et al.*, 2011).

### (4) Autres types de récepteurs

Plusieurs autres protéines ont montré une capacité à fixer des toxines Cry. C'est le cas notamment de glycolipides (pour Cry5Ba et Cry14A chez *Caenorhabditis elegans*) ou de glycoconjugués (pour Cry1A et Cry1Ba chez *Lymantria dispar*) (Valaitis *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2005). Chez le moustique *Ae. aegypti*, différentes protéines telles que des V-ATPases, l'actine ou des glycosidases sont capables de fixer la toxine Cry4Ba (*Bti*) (Bayyareddy *et al.*, 2009). Chez *A. albimanus*, c'est une  $\alpha$ -amylase qui a été décrite comme un récepteur aux toxines Cry4Ba et Cry11Aa (*Bti*) (Fernandez-Luna *et al.*, 2010a). Cependant, ces travaux manquent encore de validation fonctionnelle pour déterminer si ces protéines participent réellement au mode d'action des toxines Cry, et si oui dans quelle mesure.

### (5) Implication des récepteurs dans la mort cellulaire : les modèles

Devant la multiplicité des récepteurs aux toxines Cry décrits, plusieurs modèles ont été élaborés pour essayer d'expliquer l'étape de fixation des toxines à la paroi intestinale (Figure 15).



**Figure 15.** Illustration des trois modèles de fixation des toxines Cry aux récepteurs de la membrane épithéliale intestinale d'insectes. Le modèle de Bravo est représenté en orange, celui de Jurat-Fuentes en vert et celui de Zhang en violet. CAD, Cadhérine ; APN, N-aminopeptidase ; ALP, Phosphatase alcaline ; PKA, Protéine Kinase A. Sources : (Jurat-Fuentes et Adang, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Bravo *et al.*, 2007; Soberon *et al.*, 2009; Likitvivanavong *et al.*, 2011b).

Au moins trois modèles synthétisent l'ensemble des résultats obtenus sur la fixation des toxines Cry aux récepteurs membranaires. Le **modèle de Bravo** reprend le modèle dit « pore-forming » exposé par Knowles et Ellar (1987), mis à jour à plusieurs reprises (Bravo *et al.*, 2007; Soberon *et al.*, 2009; Likitvivanavong *et al.*, 2011b). Ce modèle prend en compte une fixation à une cadhérine ou à des protéines GPI-ancrées (ALP ou APN). Des incertitudes demeurent sur l'enchaînement des interactions. Selon ce modèle, soit les toxines se fixent à une cadhérine puis à une ALP/APN avant de s'oligomériser, soit elles se fixent selon un modèle « ping-pong », d'abord à une ALP/APN puis à une cadhérine pour revenir sur une ALP/APN avant de s'insérer dans la membrane épithéliale (Pacheco *et al.*, 2009; Likitvivanavong *et al.*, 2011b). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer lequel de ces deux modèles s'applique et pour quelles toxines (Gomez *et al.*, 2010; Likitvivanavong *et al.*, 2011b).

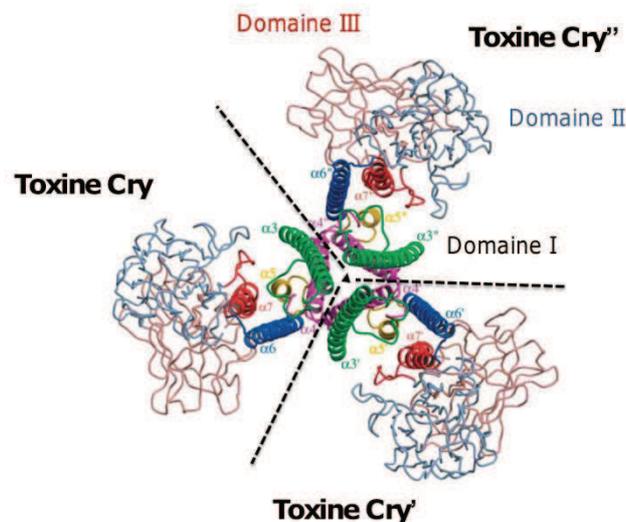
Le **modèle de Zhang** exclut que la mort cellulaire soit provoquée par la perforation de l'intestin par l'insertion de toxines Cry oligomérisées (Zhang *et al.*, 2005). Il développe ainsi un modèle basé sur l'induction de mécanismes de mort cellulaire suite à la fixation de la toxine à une cadhérine (Zhang *et al.*, 2006).

Le **modèle de Jurat-Fuentes** propose un regroupement des deux modèles, indiquant une première fixation sur une cadhérine, puis une fixation sur une ALP ou une APN. Selon ce modèle, cela induirait à la fois une perforation de la membrane cellulaire par des toxines Cry oligomérisées mais également une réaction en chaîne de mort cellulaire (Jurat-Fuentes et Adang, 2006).

Tous les modèles admettent une **fixation obligatoire à des cadhérines**. Des expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que c'est l'hélice alpha du domaine I des toxines Cry1Ab et Cry1Ac qui est responsable de leur fixation aux cadhérines (Soberon *et al.*, 2007). La suppression de cette hélice  $\alpha$ -1 rendrait ainsi les cadhérines optionnelles dans le processus entraînant la mort cellulaire par les toxines Cry. Néanmoins, l'importance du clivage de cette hélice alpha a récemment été remise en question (Vachon *et al.*, 2012).

**d) Etapes V à VII : de l'oligomérisation à l'infection (Figure 12, V, VI & VII)**

L'oligomérisation est une étape indispensable pour la toxicité de nombreuses toxines Cry (Jimenez-Juarez *et al.*, 2007; Munoz-Garay *et al.*, 2009). Les toxines peuvent s'assembler sous différentes formes : en dimères, en trimères (Figure 16) et plus généralement en tétramères (Ounjai *et al.*, 2007). Récemment, une revue sur le mode d'action des toxines de *Bt* remet en question les bases des modèles séquentiels décrits précédemment et suggérerait notamment que l'oligomérisation pourrait avoir lieu après l'insertion des monomères dans la membrane (Vachon *et al.*, 2012).



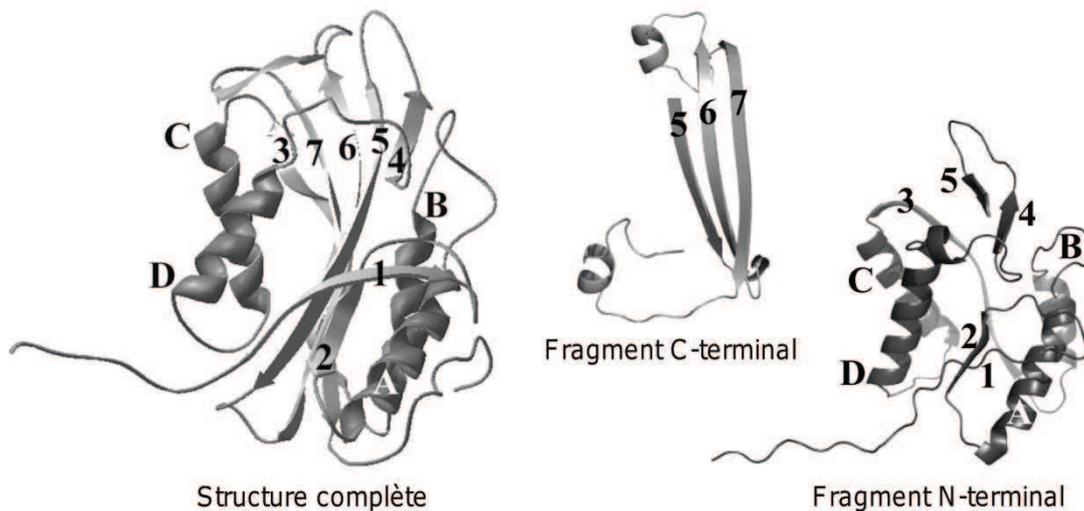
**Figure 16.** Diagramme de Richardson d'un trimère de toxines Cry4Ba vu de dessus. Les domaines à feuillets bêtas sont représentés en bleu (Domaine II) et en rouge (Domaine III). Le domaine en hélices alpha (domaine I) est représenté de plusieurs couleurs : vert ( $\alpha$ 3), violet ( $\alpha$ 4), jaune ( $\alpha$ 5), bleu ( $\alpha$ 6) et rouge ( $\alpha$ 7). Les trois toxines sont différenciées par des apostrophes et délimitées par des lignes en pointillés. Un triangle marque l'emplacement du pore. Adapté de (Boonserm *et al.*, 2005).

Une fois l'oligomère inséré dans la membrane, il va y avoir mort de la cellule due au choc osmotique, provoquant une déstabilisation de la paroi intestinale. Cela permet aux spores de *Bt* de passer dans l'hémolymphe de l'insecte, milieu extrêmement riche dans lequel elles vont pouvoir germer et les bactéries proliférer (Lacey, 2007).

## D. Les toxines Cyt

### 1. Structure des toxines Cyt

Présentes chez un nombre restreint de sous-espèces de *Bt* (dont le *Bti*), les toxines Cyt sont des protéines d'environ 30 kDa constituées d'hélices alpha entourant des feuillets bêta (Figure 17) (Li *et al.*, 1996; Butko, 2003). Elles présentent également une activité cytolytique bien qu'elles soient nettement moins toxiques que les toxines Cry pour les moustiques. Des mutagenèses dirigées ont permis de montrer que les boucles situées au sommet de la molécule, telle qu'orientée sur la figure, sont responsables de la toxicité de la molécule (Ward *et al.*, 1988). Cependant, leur rôle précis dans le mode d'action de la toxine reste inconnu à ce jour (Butko, 2003).



**Figure 17.** Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1Aa complète (gauche), de la partie C-terminale (centre) et N-terminale (droite). Les hélices alpha sont indiquées par des lettres majuscules et les feuillets bêtas par des numéros. Adapté de (Butko, 2003; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2011).

### 2. Mode d'action des toxines Cyt

Tout comme les toxines Cry, les toxines Cyt sont ingérées sous forme de cristal qui doit être solubilisé dans l'intestin des larves d'insectes. Les protoxines solubilisées sont également activées par les enzymes digestives de la larve (Li *et al.*, 1996).

Contrairement aux toxines Cry, les toxines Cyt ne nécessitent aucun récepteur pour avoir une activité cytolytique. Actuellement, deux modèles s'opposent sur la manière dont les toxines Cyt activées déstructurent les membranes des cellules épithéliales (Butko, 2003). Le premier modèle est un **modèle « pore-forming »** où les toxines Cyt seraient capables de s'insérer spontanément dans les membranes des cellules, entraînant la formation de pores et la mort de la cellule (Butko, 2003; Promdonkoy et Ellar, 2003). Ce modèle est soutenu par des travaux montrant la formation de canaux cation-sélectifs (Knowles *et al.*, 1989) mais il

est actuellement remis en question (Du *et al.*, 1999; Butko, 2003). Le deuxième modèle est un **modèle détergent** (Manceva *et al.*, 2005). Dans ce modèle, les toxines Cyt ne s'insèrent pas dans la membrane et ne subissent aucune modification de structure. Leur fixation non spécifique sur la membrane entraîne une déstructuration des lipides provoquant l'éclatement de la cellule (Butko, 2003).

### E. Synergie des toxines Cry et Cyt

L'intérêt des toxines Cyt en lutte insecticide ne réside pas essentiellement dans leur activité cytolytique relativement faible par rapport aux toxines Cry. Les toxines Cyt ont la capacité d'interagir avec de nombreuses toxines Cry (Promdonkoy *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2007; Canton *et al.*, 2011) et également avec les toxines Bin (*Bs*) (Wirth *et al.*, 2000). Comme les toxines Cyt se fixent de manière non spécifique à la membrane intestinale, elles **agissent comme des récepteurs membranaires pour les autres toxines**, au même titre qu'une cadhérine, une APN ou une ALP (Bravo *et al.*, 2007). En ajoutant les toxines Cyt à un mélange de toxines Cry et/ou Bin, on augmente considérablement la toxicité de ce mélange : on parle alors de **synergie** (Fernandez-Luna *et al.*, 2010b). Cette caractéristique fait des toxines Cyt un élément clé de certaines sous-espèces de *Bt*, telles que le *Bti* (Lacey, 2007). Les améliorations de sous-espèces de *Bt* par transgénèse tirent profit de cette synergie en intégrant systématiquement au moins une toxine Cyt à leur mélange de toxines (Federici *et al.*, 2003; Pardo-Lopez *et al.*, 2009).

## IV. Le *Bti*, l'insecticide « parfait » ?

### A. Quand la science se veut dogmatique

Comme nous l'avons vu précédemment, le *Bti* est considéré comme un produit « miracle », devenant quasiment le seul larvicide autorisé en Europe et dont l'utilisation est grandissante dans le monde entier. Au vu de l'expérience accumulée avec les précédents insecticides, chimiques et biologiques, quels sont les arguments qui nous font penser que cet insecticide est exempt des défauts de ses prédécesseurs ?

Le *Bti* est **spécifique de certaines espèces de diptères** du sous-ordre des Nématocères, dont les moustiques (*Culicidae*) et les mouches noires (*Simuliidae*), et totalement inoffensif pour les mammifères (Mancebo *et al.*, 2011). Une étude synthétique de 77 articles traitant de l'impact du *Bti* sur 616 taxons non cibles a montré que 15% des taxons étaient affectés par les traitements au *Bti*, mais que la plupart réagissaient à des doses 5 à

1000 fois supérieures aux doses opérationnelles<sup>3</sup> (Boisvert et Boisvert, 2000). De plus, moins de la moitié sont des chironomes, Nématocères connus pour présenter une forte sensibilité au *Bti* et parmi les seuls taxons affectés à partager le même milieu de vie que les espèces cibles (Stevens *et al.*, 2005). Malgré leur sensibilité au *Bti*, d'autres études ont montré que leurs populations n'étaient pas forcément perturbées par des traitements au *Bti* (Vaughan *et al.*, 2008; Lundstrom *et al.*, 2010). Quelques études ont également mesuré l'impact du *Bti* sur l'ensemble de la chaîne trophique (invertébrés, prédateurs des moustiques, oiseaux nicheurs) à plus ou moins long terme. Bien qu'une diminution de l'abondance de certains taxons soient régulièrement observée, cela ne semble pas avoir un impact durable sur l'écosystème (Crosa *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002; Caquet *et al.*, 2011). Seule une étude récente réalisée en Camargue montre un effet négatif des traitements au *Bti* sur les pontes d'hirondelles (*Delichon urbicum*) mais cette étude fait polémique et l'effet observé est imputable au traitement insecticide en lui-même, entraînant une réduction de populations de chironomes agissant indirectement sur le réseau trophique, et ne semble pas être spécifiquement lié au *Bti* (Poulin *et al.*, 2010).

Un seul cas de résistance a été mesuré dans une population d'*Ae. aegypti* à New York (Paul *et al.*, 2005). Cependant, les auteurs ont comparé la population naturelle à une souche de laboratoire. Les différences observées sont donc probablement dues à des fonds génétiques différents et ne reflètent pas réellement un effet du traitement insecticide. **A ce jour, aucun autre cas de résistance n'a été trouvé en populations naturelles** (Lacey, 2007). En laboratoire, trois équipes de recherches ont sélectionnés des souches de moustiques *Ae. aegypti*, *Culex pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* au *Bti* pendant 20 à 30 générations et n'ont obtenu que de faibles niveaux de résistance au *Bti* (entre 2 et 3 fois) (Goldman *et al.*, 1986; Georghiou et Wirth, 1997; Saleh *et al.*, 2003; Mittal *et al.*, 2005).

La difficulté pour obtenir une résistance au *Bti* est imputée à sa composition : **une combinaison de quatre toxines agissant en synergie**. On sait que des toxines Cry, même très proches, peuvent avoir des récepteurs membranaires différents, rendant difficile une résistance forte à une combinaison de ces toxines (Ferré *et al.*, 1995; Abdullah *et al.*, 2006). De plus, la toxine Cyt est un élément clé du *Bti*, connue pour ralentir l'apparition de résistance aux toxines Cry (Wirth *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2005).

Enfin, le *Bti* présente une faible activité résiduelle (quelques jours), ce qui lui vaut d'être qualifié de **peu persistant dans l'environnement** (Lacey, 2007). Cependant, on retrouve des spores de *Bti*, forme de résistance bactérienne, pendant plusieurs semaines à

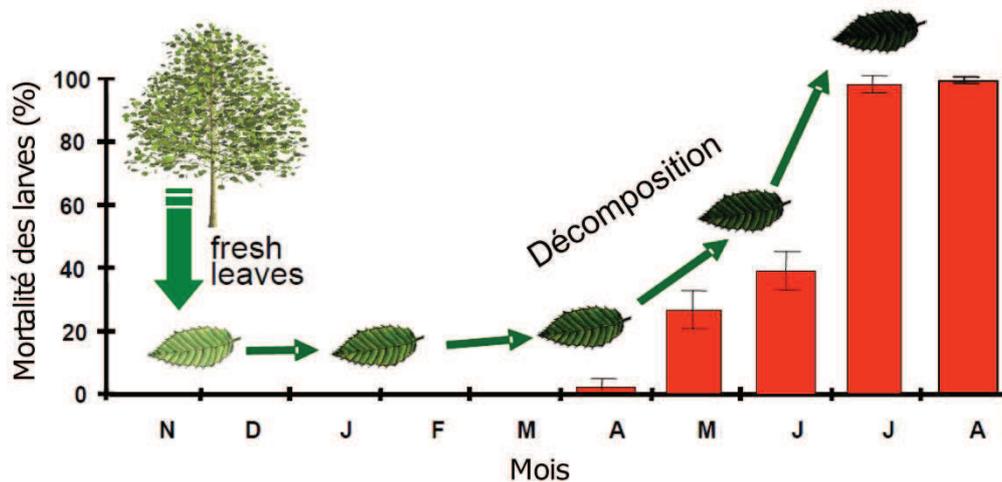
---

<sup>3</sup> La dose opérationnelle correspond à la quantité de produit à épandre par unité de surface recommandée par le fabricant et validée par l'OMS.

plusieurs mois après un traitement. La bactérie étant qualifiée de peu compétitive par rapport aux autres bactéries du sol, le recyclage du *Bti* était considéré comme peu probable (Sheeran et Fisher, 1992; Lacey, 2007).

## B. Une faille dans le modèle

Pourtant, un nombre grandissant de travaux montrent qu'une activité résiduelle du *Bti* peut être trouvée dans certaines conditions et que cette activité pourrait même, dans certains cas, être la conséquence d'un **recyclage des spores de *Bti*** (Dupont et Boisvert, 1986; Boisvert et Boisvert, 1999; de Melo-Santos *et al.*, 2009; Shaheen *et al.*, 2010). Dans la région Rhône-Alpes (France), des litières végétales en décomposition, prélevées plusieurs mois après un traitement insecticide, ont montré une forte activité insecticide contre les larves de moustiques (David *et al.*, 2000; David *et al.*, 2002) (Figure 18).



**Figure 18.** Toxicité des litières végétales en fonction de leur état de décomposition pour des larves d'*Aedes aegypti* exposées à 3 g/L de litière d'Aulne (*Alnus glutinosa*) finement broyée. Adapté de (David *et al.*, 2000).

Cette toxicité, initialement attribuée aux acides tanniques et aux polyphénols (David *et al.*, 2000), est en fait principalement due à la présence de *Bti*, mise en évidence par des étalements bactériens et par la présence de gènes codants pour les toxines du *Bti* (Tilquin *et al.*, 2008). Ces litières végétales en décomposition seront dénommées « **litières toxiques** » dans l'ensemble de la présente thèse. Une souche de moustique de laboratoire *Aedes aegypti* a été sélectionnée pendant plusieurs générations avec cette litière toxique et a permis d'obtenir une résistance modérée au *Bti* mais bien plus élevée aux toxines Cry considérées séparément (Paris *et al.*, 2011b). Cette **souche résistante au *Bti* (souche LiTOX)** est la preuve que le *Bti* peut, sous une forme persistante environnementale, entraîner une résistance au *Bti*.

Contrairement au dogme admis, le *Bti* peut, dans certaines conditions, proliférer, produire des cristaux de toxines et entraîner une augmentation de la résistance au *Bti* chez le moustique. La compréhension des mécanismes de persistance / recyclage du *Bti* ainsi que la manière dont les moustiques résistent est primordiale afin de ne pas reproduire les erreurs du passé et de tendre vers une utilisation raisonnée du *Bti* et une meilleure gestion de la résistance.

## V. Vers une utilisation raisonnée du *Bti* : plan de thèse

**Ma thèse vise à apporter les connaissances et les outils nécessaires à une meilleure compréhension du devenir du *Bti* dans l'environnement et de son impact sur les populations de moustiques.**

Elle s'articule autour de trois axes structurés en trois chapitres :

**Axe I : Devenir du *Bti* dans l'environnement.** Le *Bti* est capable de persister et de proliférer dans l'environnement dans certaines conditions. Actuellement, aucun test simple n'est disponible pour réaliser le suivi des toxines en milieu naturel. Dans ce chapitre, je présenterai le protocole d'extraction des toxines de *Bti* à partir d'échantillons environnementaux que nous avons développé ainsi que la mise au point d'un test ELISA permettant de détecter chacune des toxines du *Bti*. Les résultats de son application sur des litières contaminées et sur les litières toxiques seront également présentés. Cela permettra de déterminer la durée et s'il y a une persistance différentielle des toxines de *Bti* sous leur forme cristalline dans l'environnement.

**Axe II : Résistance au *Bti* chez le moustique en laboratoire.** Une souche de laboratoire (LiTOX) a été sélectionnée à cette litière toxique et présente une résistance au *Bti* et aux toxines testées séparément. Caractériser cette résistance est primordial afin de pouvoir prédire et détecter l'apparition de résistance en populations naturelles. Vu la complexité du mode d'action du *Bti*, des approches globales de détection de la résistance ont été réalisées sur larves entières et sur intestins de larves. Des approches fonctionnelles visant à valider l'implication de certains gènes/protéines sont également exposées dans le chapitre II.

**Axe III : Résistance au *Bti* chez le moustique en populations naturelles.** La recherche de résistance au *Bti* en populations naturelles se fait actuellement par des tests toxicologiques au *Bti*. La souche LiTOX montre que des résistances beaucoup plus importantes peuvent être observées aux toxines séparément, même si rien n'est observable avec le *Bti* complet. Les résultats d'une campagne d'échantillonnage de larves en milieu naturel ainsi que les bioessais aux toxines testées séparément sont présentés dans le chapitre III.

# Chapitre I :

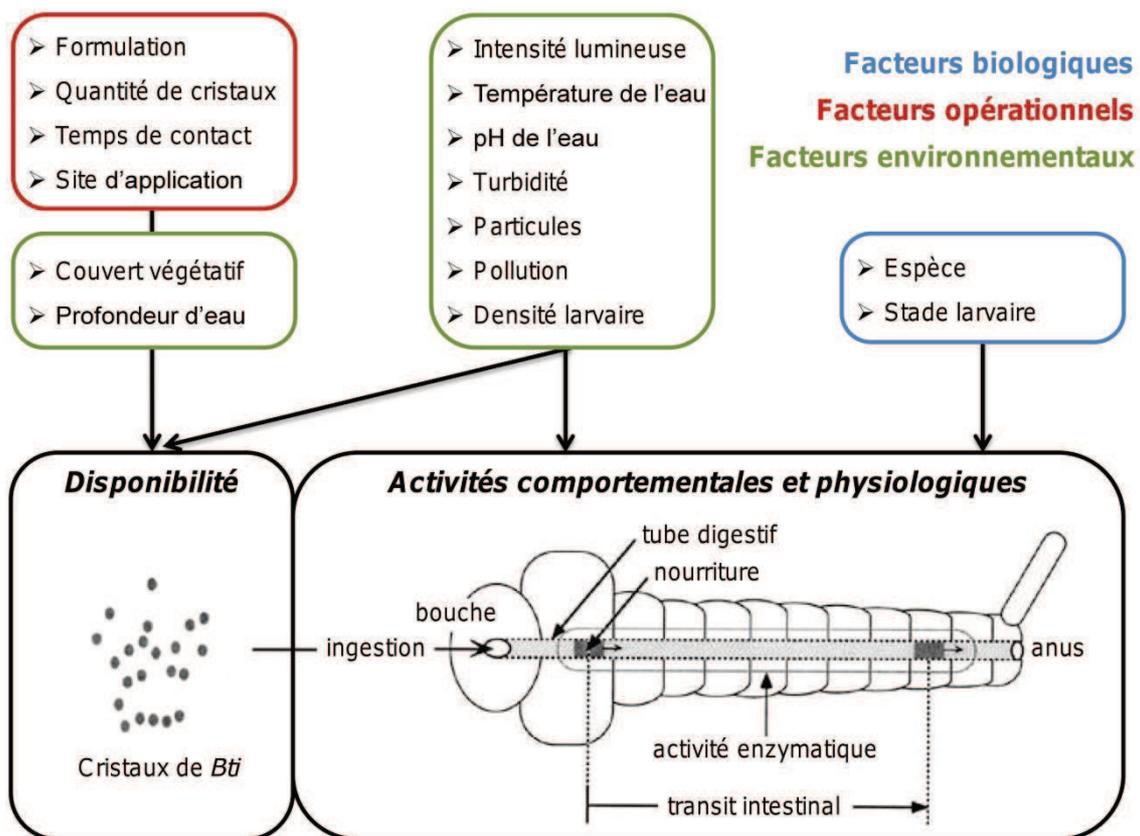
## Devenir du *Bti* dans l'environnement

### I. Persistance du *Bti* dans l'environnement

Le *Bti* est généralement épandu sous la forme d'une suspension de cristaux et de spores. De ce fait, la notion de persistance du *Bti* revêt plusieurs aspects : la persistance de l'activité insecticide du *Bti* (activité résiduelle), la persistance des cristaux de toxines et la persistance des spores bactériennes.

#### A. Paramètres influant sur l'activité résiduelle du *Bti*

L'activité insecticide du *Bti* est directement corrélée à sa disponibilité pour les larves de moustiques. Trois paramètres principaux influencent cette biodisponibilité (Figure 19).



**Figure 19.** Paramètres influant sur la disponibilité du *Bti* pour les larves de moustiques. Les facteurs biologiques sont indiqués en bleu, les facteurs environnementaux en vert et les facteurs opérationnels en rouge. Adapté de (Boisvert et Lacoursière, 2004).

Les **facteurs biologiques** regroupent les paramètres intrinsèques aux larves de moustiques, tels que l'espèce ou le stade larvaire. Le *Bti* a une tendance naturelle à flocculer

et à sédimenter au fond des gîtes larvaires. Ainsi, les larves d'*Anopheles*, se nourrissant à la surface de l'eau, seront exposées moins longtemps au *Bti* que les larves d'*Aedes* ou de *Culex* (Amalraj *et al.*, 2000). L'activité résiduelle du *Bti* est donc moins importante pour les *Anopheles* que pour les autres genres. De même, les larves ne se nourrissant quasiment plus au dernier stade larvaire, le *Bti* sera alors beaucoup moins efficace que pendant les premiers stades de développement de la larve (Lacey, 2007).

Pour limiter la sédimentation du *Bti*, de nombreuses formulations ont été développées (**facteurs opérationnels**), permettant de s'adapter au milieu à traiter mais également pour certaines de relarguer l'insecticide progressivement au cours du temps (briquettes, glaçons) (Neri-Barbosa *et al.*, 1997; Becker, 2003). Selon la formulation, l'activité résiduelle peut être plus ou moins importante. Chez *Culex*, l'augmentation de la dose opérationnelle ne permet pas d'augmenter l'activité résiduelle du *Bti* (Mulla *et al.*, 1993) alors qu'un contrôle plus durable de populations d'*Ae. aegypti* est possible dans des réservoirs ou des containers avec différentes formulations (Mulla *et al.*, 2004; Vilarinhos et Monnerat, 2004; Ritchie *et al.*, 2010).

Lorsque le milieu est turbide (matière organique, sol et/ou sédiments en suspension) ou pollué (**facteurs environnementaux**), les toxines persistent moins longtemps, étant plus rapidement dégradées et/ou adsorbées sur les particules en suspension (Margalit et Bobroglo, 1984; Karch *et al.*, 1991; Sheeran et Fisher, 1992; Srivastava *et al.*, 1998). De plus, l'intensité lumineuse, la température et la présence de végétation sont autant de paramètres qui peuvent affecter l'efficacité et la durée de l'activité larvicide du *Bti* (Boisvert *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2004; Lacey, 2007).

Généralement, on remarque que **de nouvelles larves de moustiques peuvent apparaître et se développer trois à quatre jours après un traitement de leur habitat**, dû à l'interaction de ces différents facteurs favorisant une sédimentation et un piégeage rapide du *Bti* (Boisvert et Lacoursière, 2004).

## **B. Persistance des cristaux de *Bti***

Peu d'études ont été réalisées sur le devenir des cristaux de toxines du *Bti* en milieu naturel. En tant qu'agglomérats protéiques (matière organique), on suppose qu'elles subissent une dégradation « classique » par les microorganismes du milieu (bactéries, champignons) et sont recyclées sous forme d'acides aminés dans l'écosystème (Boisvert et Lacoursière, 2004). Cependant, quelques études ont montré que les cristaux de *Bti* peuvent subsister dans le milieu bien après la disparition de l'effet insecticide du *Bti*, de quelques semaines à plusieurs années (Dupont et Boisvert, 1986; Boisvert et Boisvert, 1999). Les

cristaux immobilisés dans les sédiments conservent près de 90% de leur activité insecticide, même après plusieurs semaines (Ohana *et al.*, 1987; Sheeran et Fisher, 1992). De même, les cristaux peuvent s'accumuler dans les tapis d'algues et de mousses qui tapissent le fond des cours d'eau et conserver également environ 90% de leur toxicité (Tousignant *et al.*, 1993; Boisvert *et al.*, 2001).

Malgré le stockage des cristaux de *Bti* dans de nombreux compartiments de l'écosystème, **aucun impact de cette accumulation n'a été observé sur l'efficacité des traitements** effectués depuis plus de 20 ans en France et au Canada notamment (Boisvert et Lacoursière, 2004).

### C. Persistance et recyclage des spores de *Bti*

Tout comme les cristaux, les spores de *Bti* persistent bien plus longtemps que ne dure l'activité insecticide (Boisvert et Lacoursière, 2004). N'étant pas directement impliquées dans la toxicité aigüe du *Bti* pour les larves de moustiques, leur persistance n'a théoriquement que peu d'impact sur les populations de moustiques. Seule une remise en culture des spores de *Bti*, entraînant une importante prolifération bactérienne, pourrait générer une production accrue de nouveaux cristaux toxiques directement dans le milieu lors de leur sporulation. La germination des spores et la prolifération des bactéries de *Bti* dans les cadavres de moustiques ont déjà été caractérisées (Aly *et al.*, 1985; Khawaled *et al.*, 1990). Cependant, le fait que cette prolifération produise suffisamment de cristaux pour contrôler une population naturelle de moustiques est jugé comme improbable (Boisvert et Boisvert, 1999; Boisvert et Lacoursière, 2004). Pourtant, l'origine de la découverte du *Bti*, *i.e.* prolifération de la bactérie ayant entraîné la mort d'une population de larves de moustiques dans une mare en Israël (Goldberg et Margalit, 1977), ne va-t-elle pas à l'encontre de cette hypothèse ? Dans quelles conditions particulières le *Bti* peut-il proliférer et atteindre des niveaux de toxicité importants ?

Plusieurs cas de prolifération avérée ou supposée de *Bti* ont été rapportés en populations naturelles (Tilquin *et al.*, 2008; de Melo-Santos *et al.*, 2009). Les **litières toxiques** échantillonnées dans la région Rhône-Alpes (France) représentent une opportunité rare de pouvoir étudier du *Bti* persistant et/ou recyclé possédant une activité larvicide en milieu naturel (David *et al.*, 2000; Tilquin *et al.*, 2008).

### D. Outils de détection du *Bti* dans l'environnement

Actuellement, plusieurs outils existent déjà pour suivre le devenir du *Bti* dans l'environnement. Le suivi de la toxicité du *Bti* peut être réalisé en prélevant du sol, des

sédiments ou de la litière végétale de gîtes à moustiques et en réalisant des **tests toxicologiques sur des larves de moustiques** (Sheeran et Fisher, 1992; Tousignant *et al.*, 1993; David *et al.*, 2000). Néanmoins, comme nous avons vu que la toxicité diminue rapidement avec le temps, contrairement à la présence des cristaux et de spores, cet outil s'avère peu sensible en conditions normales.

La présence de spores peut être révélée en réalisant des **étalements d'échantillons environnementaux sur des milieux de cultures**, permettant de faire germer et proliférer les spores (Vettori *et al.*, 2003; Hajajj *et al.*, 2005). Les colonies de bactéries de type *Bacillus cereus* (rondes d'aspect crémeux, mat et granuleux) sont comptabilisées, indiquant la quantité de spores présentes dans l'échantillon. Cette approche est néanmoins limitée par l'aspect des colonies, identique pour toutes les espèces et sous-espèces du groupe *Bacillus cereus*, pouvant entraîner une surestimation de la quantité de spores de *Bti* réellement présentes. La présence de spores peut également être détectée à l'aide de **PCR ciblant des gènes codant pour les toxines Cry** du *Bti* (De Respinis *et al.*, 2006; Tilquin *et al.*, 2008), voire même quantifiée à l'aide d'une PCR quantitative (Guidi *et al.*, 2010). Cependant, les spores ne sont pas directement responsables de la toxicité du *Bti*. De tels outils peuvent permettre de détecter une potentielle remise en culture des spores mais sont incapables d'indiquer s'il y a eu production de cristaux de toxines et dans quelles quantités.

Aucun test simple n'existe à ce jour pour évaluer la quantité de cristaux de *Bti* et étudier leur devenir dans l'environnement. Pourtant, de nombreux tests ELISA, basés sur la détection des toxines par des anticorps spécifiques, existent et sont commercialisés pour détecter les toxines Cry actives contre les Lépidoptères à partir d'échantillons de sols ou de plantes génétiquement modifiées<sup>4</sup>. Un test ELISA ciblant les toxines du *Bti* a déjà été développé mais jamais appliqué à des échantillons environnementaux (Oestergaard *et al.*, 2007b). Pourquoi ? Quels sont les verrous techniques qui rendent difficiles cette application ?

Durant ce chapitre, je présenterai les solutions que nous avons développées afin de contourner ces problèmes, aboutissant à un **test simple de détection des toxines du *Bti* à partir de matrices environnementales (test ELISA)** (Figure 20). L'objectif est d'appliquer cet outil aux litières toxiques, afin de caractériser les toxines qui les composent et leurs proportions relatives, ainsi qu'à des litières végétales contaminées avec du *Bti* ou avec chacune des toxines du *Bti*.

---

<sup>4</sup> La liste des 16 tests ELISA ciblant des toxines Cry commercialisés par l'entreprise ENVIROLOGIX est disponible à cette adresse : [http://www.envirologix.com/artman/publish/cat\\_index\\_44.shtml](http://www.envirologix.com/artman/publish/cat_index_44.shtml)

Devenir du *Bti* dans l'environnement : développement d'un outil et applications

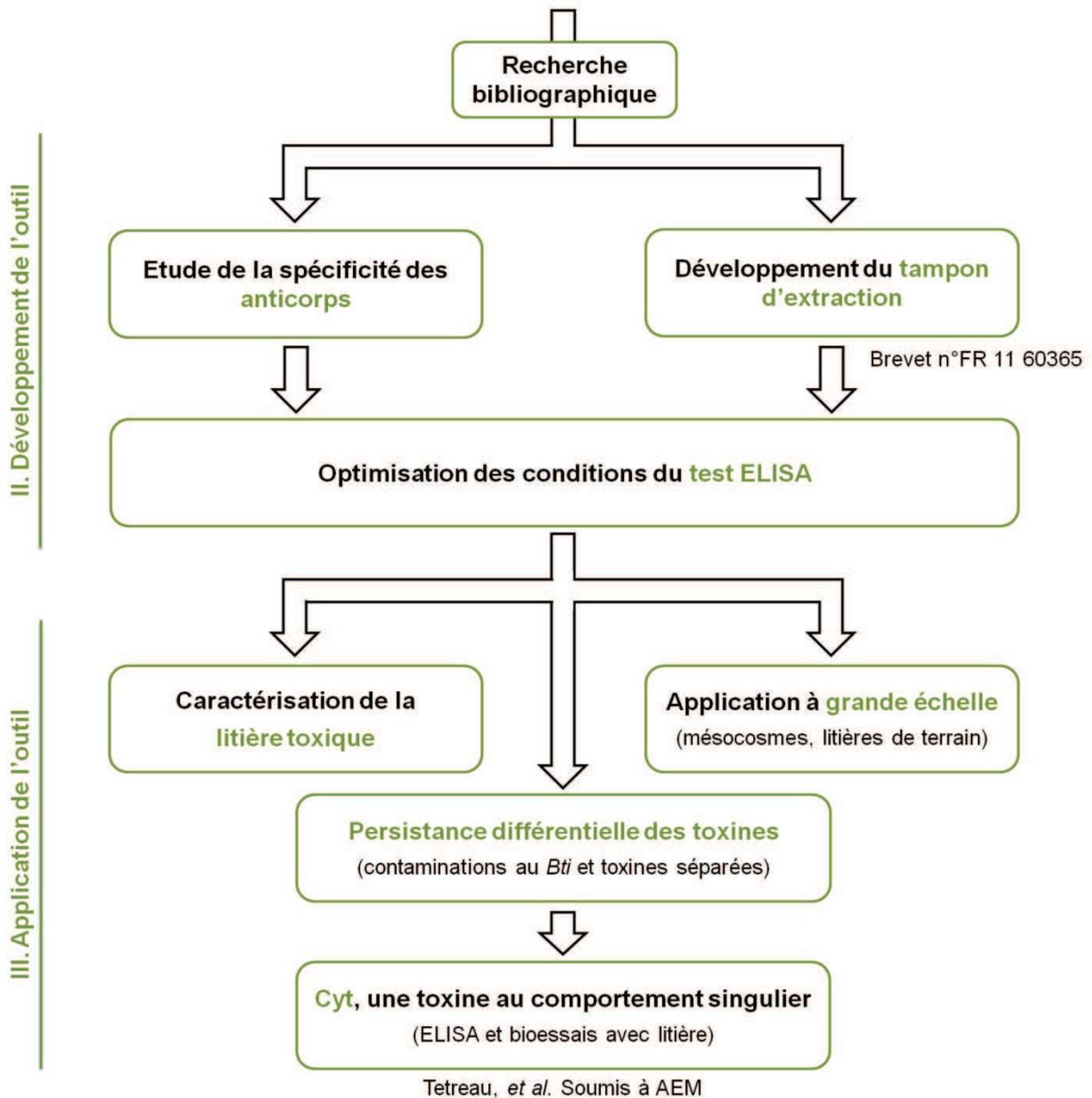


Figure 20. Plan schématique de la démarche expérimentale du chapitre I.

## II. Développement de l'outil

### A. « Avant de rêver, il faut savoir » (Jean Rostand, *Penaéca d'un biologiste*, 1967)

Avant de commencer le développement d'un outil de détection des toxines du *Bti* dans l'environnement, il est nécessaire de rechercher tous les travaux qui ont déjà été réalisés sur le *Bti* et les toxines produites d'autres sous-espèces de *Bt*.

A notre connaissance, seule une **thèse soutenue en 2002 par S. De Respinis-Chappuis** a tenté de développer un test ELISA afin de détecter les cristaux de *Bti* dans l'environnement (De Respinis-Chappuis, 2002). Leur outil souffre cependant de nombreux biais et imprécisions. Le protocole d'extraction se base sur un tampon PBS (tampon phosphate salin) dont le pH, pourtant essentiel, n'est pas indiqué et la description de l'extraction est quasi inexistante (temps de contact avec le tampon ? traitement subi par l'échantillon ?). De plus, ils utilisent des « anticorps anti-cristaux » de *Bti* sans avoir décrit la manière dont ils ont été produits, ni avoir caractérisé leur spécificité pour les toxines de *Bti* et les épitopes<sup>5</sup> qu'ils reconnaissent. A notre connaissance, ces travaux n'ont donné lieu à aucune publication dans aucun journal scientifique national ou international.

Dans le contexte des OGM, de nombreuses études se sont intéressées au relargage de toxines de *Bt*, notamment par les exsudats racinaires, et à leur devenir dans les sols. Cependant, la qualité et la rigueur des protocoles d'extractions varient en fonction des laboratoires. Ainsi, Pagel-Wielder *et al.* (2007) ont extrait la toxine Cry1Ab de sols uniquement à l'aide d'eau distillée, ne permettant qu'une désorption faible des toxines (10%). De leur côté, Zhou *et al.* (2005) obtiennent des rendements d'extraction plus élevés mais très variables avec de l'eau distillée (25% à 41%) et un tampon carbonate (16% à 39%). Seules quelques publications ont cherché à développer un protocole permettant un rendement d'extraction important et reproductible (Palm *et al.*, 1994; Helassa *et al.*, 2009; Helassa *et al.*, 2011a). Ces rares travaux offrent une base de travail de qualité pour le développement d'un outil d'extraction et de quantification des toxines du *Bti*.

Néanmoins, la problématique du *Bti* est sensiblement différente pour plusieurs raisons. Le *Bti* s'utilise dans des zones humides, écosystèmes fragiles et souvent protégés, contrairement au *Bt*, dont l'utilisation reste exclusive aux agrosystèmes. Le *Bti* est épandu ponctuellement sous forme d'un mélange de spores et de cristaux, contenant les protoxines non activées, lors de la mise en eau des gîtes larvaires alors que les toxines *Bt*, dans le contexte des OGM, sont produites sous forme soluble, activée et de façon continue par les exsudats racinaires des plantes. Le comportement du *Bti* dans l'environnement est donc différent des toxines *Bt*. Ainsi, les travaux réalisés sur le *Bt* ne pouvaient pas être simplement adaptés pour étudier le *Bti*.

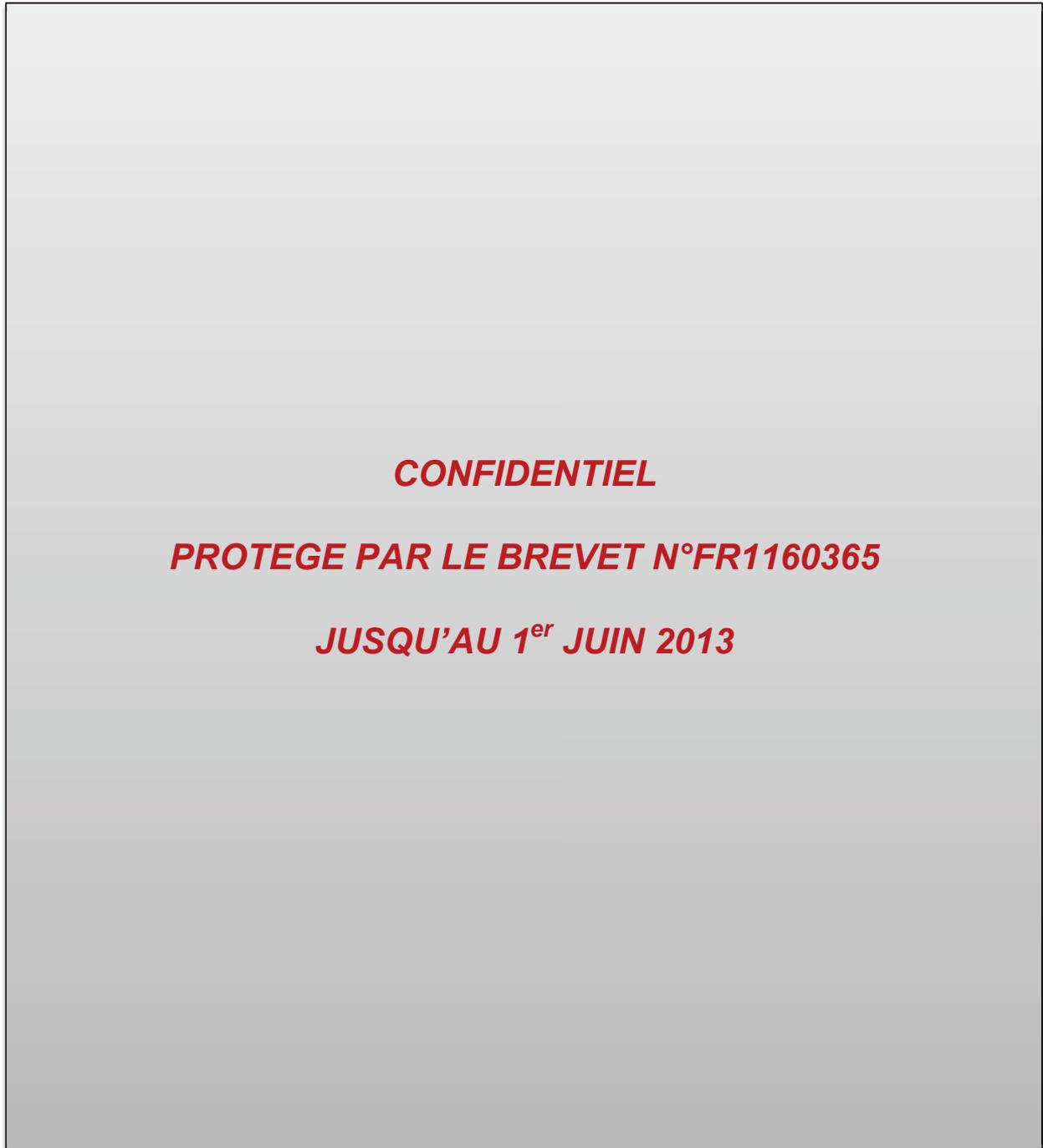
---

<sup>5</sup> Epitope (= déterminant antigénique) : région d'une protéine reconnue par la partie variable (paratope) d'un anticorps.

## B. De l'extraction à la détection des toxines du *Bti*

Le test de détection des toxines du *Bti* dans les matrices environnementales peut se décomposer en 2 étapes : 1. l'extraction et 2. la détection des toxines à l'aide d'anticorps spécifiques (ELISA).

### 1. Protocole d'extraction des toxines du *Bti* à partir de matrices environnementales



**Figure 21.** Représentation schématique du protocole d'extraction des toxines de *Bti* à partir de matrices environnementales (ici de litières végétales). Ce protocole est protégé par le brevet n° FR 11 60365.

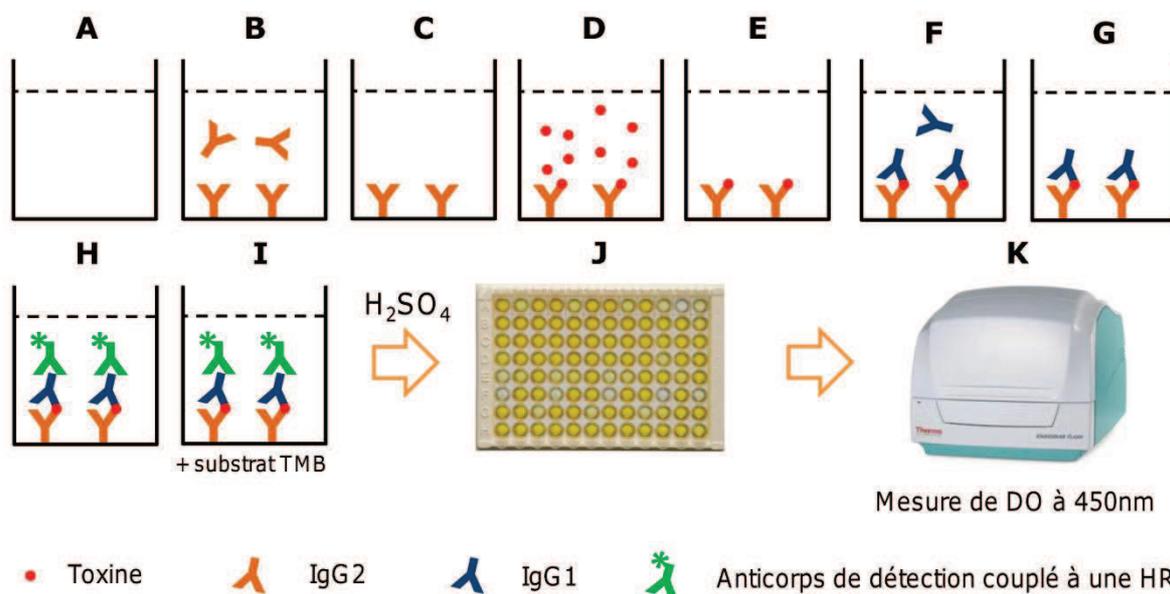
***CONFIDENTIEL***

***PROTEGE PAR LE BREVET N°FR1160365***

***JUSQU'AU 1<sup>er</sup> JUIN 2013***

## 2. Détection de la toxine du *Bti* par ELISA

La détection des toxines se fait par un système d'**ELISA en sandwich** avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les toxines du *Bti* (Figure). Ces anticorps ont été développés en 2007 par l'équipe de Ralf-Udo Ehlers (Allemagne) (Oestergaard *et al.*, 2007b). Nous disposons d'anticorps dirigés contre les toxines Cry4Aa et Cry4Ba (**anticorps anti-Cry4**), Cry11Aa (**anticorps anti-Cry11**) et Cyt1Aa (**anticorps anti-Cyt**). Pour chaque toxine (ou groupe de toxines), nous disposons de deux types d'anticorps : des immunoglobulines G1 (IgG1) et des immunoglobulines G2 (IgG2).



**Figure 22.** Représentation schématique du principe du test ELISA en sandwich. Les étapes de A à I représentent ce qui se passe dans un puits d'une plaque ELISA de 96 puits. La toxine est schématisée par un rond rouge, l'anticorps primaire (IgG2) par un "Y" orange, l'anticorps secondaire (IgG1) par un "Y" bleu et l'anticorps de détection couplé à l'enzyme par un "Y" avec une étoile, symbolisant l'enzyme.

Les IgG2 sont adsorbés dans le fond des puits d'une plaque ELISA (Maxisorp, Nunc) (Figure 22B). Après un lavage permettant d'éliminer les anticorps non fixés (Figure 22C) et une saturation des sites non spécifiques des anticorps par de la BSA, on dépose les extraits contenant les toxines qui seront retenues par les sites spécifiques des IgG2 fixés (Figure 22D). Après un lavage (Figure 22E), on dépose les IgG1 qui vont s'accrocher spécifiquement aux toxines immobilisées (Figure 22F). Nous utilisons ensuite un anticorps de détection, spécifique des IgG1, couplé à une enzyme HRP (HorseRaddish Peroxidase) (Figure 22H).

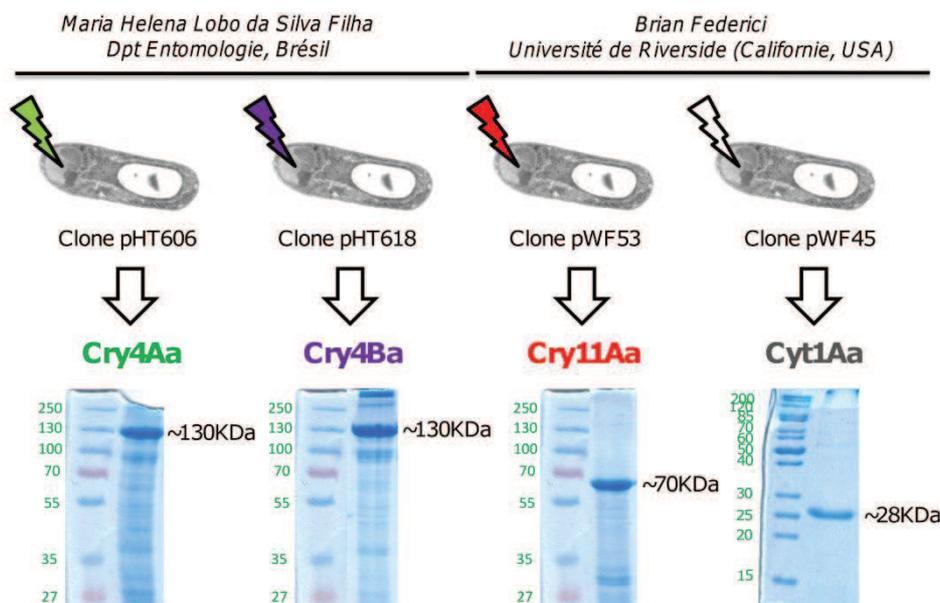
Un substrat spécifique des HRP, le TMB (3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine), est ajouté (Figure 22I). Dans notre cas, nous utilisons de l'Ultra-TMB (Fisher Scientific) qui permet de détecter jusqu'à 0,2 ng/mL de protéines et est parmi les substrats les plus sensibles actuellement commercialisés. La réaction donne une coloration bleue puis est stoppée par l'ajout d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N qui change la couleur bleue en une coloration jaune, permettant une détection plus fine du signal (Figure 22J). La lecture se fait à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Varioskan Flash, Thermo Scientific) (Figure 22K). Le protocole complet de l'étape d'extraction ainsi que de la détection par ELISA est détaillé en Annexe I.

### C. Tests de spécificité des anticorps

Les anticorps monoclonaux utilisés dans notre test ELISA ont déjà été testés en Western blot (Oestergaard *et al.*, 2007b). Ils montrent que les anticorps développés pour une toxine particulière sont capables de détecter les protoxines et toxines activées correspondantes (Oestergaard *et al.*, 2007b). Cependant, aucun test n'a été réalisé pour vérifier si les anticorps développés pour une toxine du *Bti* sont capables de détecter les autres toxines. Cette étape est indispensable afin de s'assurer de la spécificité des anticorps dans le contexte du *Bti*, mélange de plusieurs toxines. Pour réaliser ces tests, il est nécessaire de pouvoir produire chaque toxine séparément.

#### 1. Production des toxines du *Bti* séparément

Chaque toxine est produite à l'aide de souches de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* modifiées pour ne produire qu'une seule des quatre toxines du *Bti* (Figure 23).



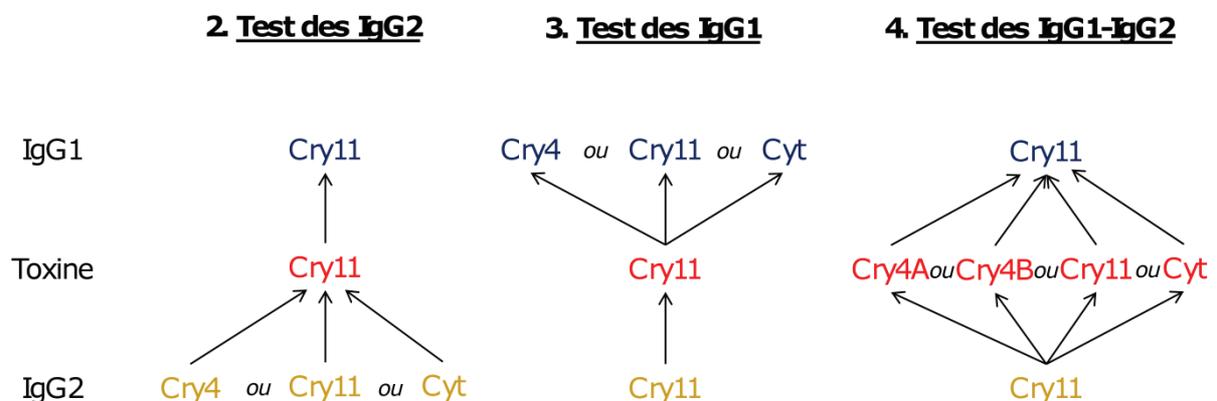
**Figure 23.** Représentation schématique des bactéries produisant les toxines du *Bti* séparément. Les clones insérés dans la bactérie sont indiqués. Les clones pHT606 et pHT618, développés par l'institut

Pasteur (Paris), ont été récupérés auprès de Maria Helena Lobo da Silva Filha (Brésil) et les clones pWF53 et pWF45 ont été récupérés auprès de Brian Federici (Californie, USA). Les protoxines produites sont visualisées sur un gel de protéine SDS-PAGE et leur taille en kilodaltons (kDa) est indiquée. Les tailles en kDa du marqueur de taille sont indiquées en vert sur la gauche de chaque gel.

Une souche de *Bti* ne produisant pas de cristaux (souche 4Q2-81) a été transformée à l'aide des plasmides pHT606, pHT618, pWF53 et pWF45 pour produire les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa respectivement. Les bactéries sont conservées dans du milieu LB (Lysogeny Broth) glycérolé à -80°C. Pour produire les toxines, les bactéries sont étalées sur du milieu solide Nutrient Agar (0,5% peptone ; 0,3% extrait de viande/extrait de levure ; 1,5% agar ; 0,5% NaCl, pH 6,8 ; Sigma Aldrich). Après 7 à 10 jours d'incubation dans une étuve à 28°C, les bactéries vont sporuler et produire le cristal protéique. Les cristaux/spores sont récupérés en raclant le milieu à l'aide de grattoirs et resuspendus dans de l'eau distillée. Ils sont lavés deux fois avec de l'eau distillée et récupérés en centrifugeant à 16.000g pendant 15 minutes puis resuspendus dans de l'eau distillée. Les toxines sont conservées ainsi à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Pour pouvoir être utilisées avec le test ELISA, les toxines sont solubilisées en centrifugeant la suspension cristal/spore à 16.000g pendant 15 minutes puis en les resuspendant dans du tampon Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mM) + DTT (10 mM), pH 9,5. La suspension est ensuite placée 1h00 à 60°C. Après une centrifugation à 10.000g pendant 10 minutes, le surnageant, contenant les toxines solubilisées, est récupéré.

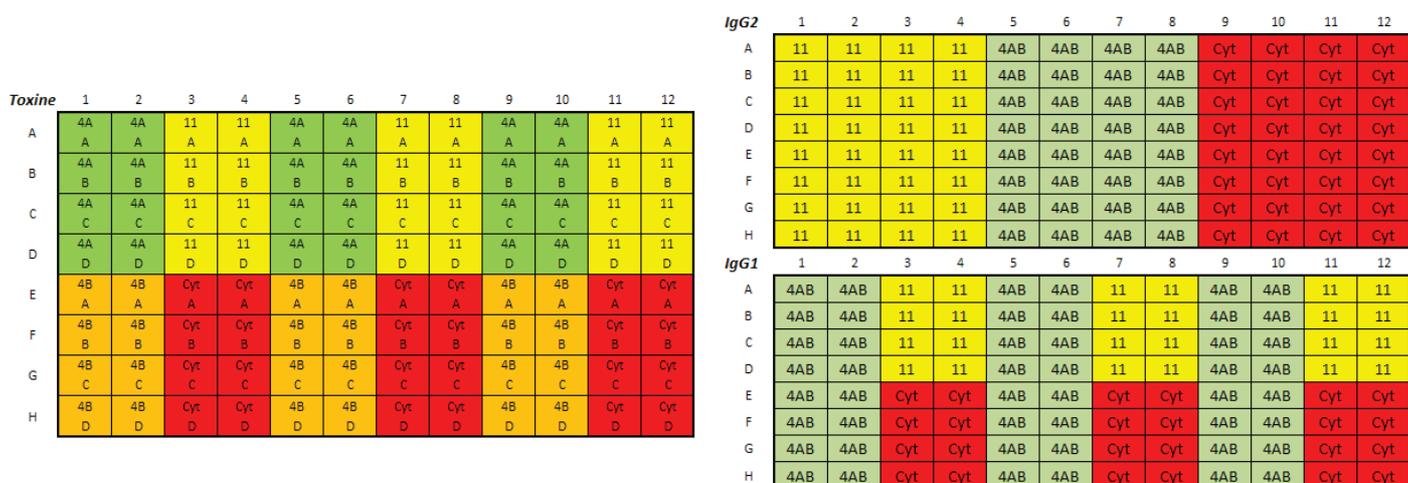
Avant de mettre au point le test, les anticorps ont été testés pour leur spécificité vis-à-vis de leur cible. La Figure 24 illustre les trois tests réalisés en prenant pour exemple la toxine Cry11Aa.



**Figure 24.** Schéma illustrant les tests de spécificité des anticorps, ici pour Cry11Aa. Les anticorps secondaires (IgG2) sont indiqués en bleu, les toxines en rouge et les anticorps primaires (IgG1) en orange, reprenant les codes couleurs de la Figure 22 dans un souci de cohérence.

## 2. Test des anticorps primaires (IgG2)

La Figure 25 montre le plan de plaque utilisé pour tester la spécificité des IgG2. On fixe sur la plaque les IgG2 anti-Cry4, anti-Cry11 et anti-Cyt. On met ensuite les quatre toxines en présence de chaque IgG2. Chaque toxine est déposée en trois concentrations B, C, et D respectivement 50, 100, 150 ng/mL et chacune en duplicat. La concentration A est un témoin négatif (0 ng/mL). La toxine considérée est ensuite détectée à l'aide des IgG1 spécifiques. La Figure 26 présente les résultats obtenus ainsi que les résultats attendus de l'expérience.



**Figure 25.** Plans de dépôt des toxines (gauche), des IgG2 testées (haut) et IgG1 spécifiques (bas) utilisés pour le test de la spécificité des IgG2. Les IgG1, IgG2 et la toxine Cry4Aa sont représentés en vert, Cry4Ba en orange, Cry11Aa en jaune et Cyt1Aa en rouge. Les lettres A à D correspondent aux concentrations des toxines : A, 0 ; B, 50 ; C, 100 et D, 150 ng/mL.

Observé	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,07	0,06	0,09	0,04	0,05	0,03	0,03	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02
B	0,13	0,06	0,28	0,28	0,22	0,21	0,13	0,05	0,15	0,05	0,02	0,03
C	0,08	0,06	0,41	0,36	0,37	0,37	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03
D	0,09	0,07	0,50	0,48	0,53	0,45	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05
E	0,06	0,06	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02
F	0,08	0,07	0,05	0,05	0,12	0,11	0,03	0,03	0,02	0,02	0,50	0,51
G	0,07	0,06	0,06	0,06	0,19	0,19	0,03	0,03	0,02	0,02	0,71	0,76
H	0,09	0,08	0,07	0,07	0,27	0,27	0,05	0,05	0,04	0,04	0,88	0,93

Attendu 1 : positif négatif

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figure 26.** Résultats obtenus (haut) en densité optique mesurées à 450 nm et résultats attendus (bas). Les résultats attendus positifs sont surlignés en vert, les résultats attendus négatifs en rouge.

Tous les IgG2 testés montrent une bonne spécificité pour la toxine pour laquelle ils ont été développés (Figure 26).

### 3. Test des anticorps secondaires (IgG1)

La Figure 27 montre le plan de plaque utilisé pour tester la spécificité des IgG1. On fixe sur la plaque les IgG2 ainsi que la toxine correspondante. On essaie par la suite de détecter cette toxine fixée à l'aide des IgG1 anti-Cry4, anti-Cry11 et anti-Cyt. La Figure 28 présente les résultats obtenus ainsi que les résultats attendus de l'expérience.

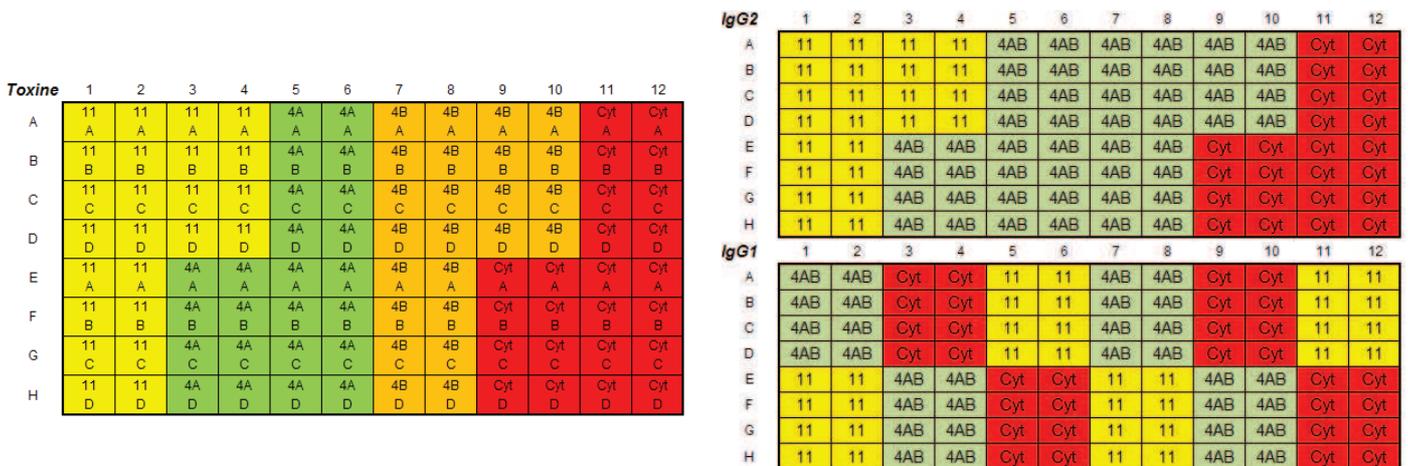


Figure 27. Plans de dépôt des toxines (gauche), des IgG2 spécifiques (haut) et IgG1 testées (bas) utilisés pour le test de la spécificité des IgG2. Les IgG1, IgG2 et la toxine Cry4Aa sont représentés en vert, Cry4Ba en orange, Cry11Aa en jaune et Cyt1Aa en rouge. Les lettres A à D correspondent aux concentrations des toxines : A, 0 ; B, 50 ; C, 100 et D, 150 ng/mL.

Observé	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,14	0,07	0,07	0,04	0,05	0,03	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
B	0,17	0,11	0,05	0,06	0,04	0,03	0,11	0,11	0,03	0,02	0,07	0,01
C	0,18	0,18	0,05	0,04	0,05	0,03	0,20	0,17	0,02	0,01	0,02	0,01
D	0,21	0,18	0,04	0,04	0,04	0,03	0,25	0,23	0,01	0,00	0,00	0,01
E	0,07	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01	0,00	0,02
F	0,31	0,28	0,24	0,25	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,48	0,52
G	0,47	0,43	0,44	0,41	0,04	0,05	0,03	0,03	0,02	0,01	0,73	0,76
H	0,69	0,60	0,58	0,57	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,88	0,94



Figure 28. Résultats obtenus (haut) en densité optique mesurées à 450 nm et résultats attendus (bas). Les résultats attendus positifs sont surlignés en vert, les résultats attendus négatifs en rouge.

Tous les témoins positifs (e.g. IgG1-Cry11 / Toxine-Cry11Aa / IgG2-Cry11) montrent un signal fort. Les IgG1 ciblant les toxines Cry11Aa et Cyt1Aa sont spécifiques de la toxine

considérée. Seul un couple non spécifique (**IgG1-Cry4 / Toxine-Cry11Aa / IgG2-Cry11**) réagit mais l'intensité du signal est deux à trois fois moins intense que pour la combinaison spécifique IgG1-Cry11 / Toxine-Cry11Aa / IgG2-Cry11 (Figure 28).

#### 4. Test des couples IgG1 – IgG2

Dans ce test, on tente de détecter chaque toxine avec des couples IgG1 – IgG2 dirigés vers chacune des quatre toxines (e.g. Cry11Aa que l'on essaie de détecter avec IgG1-Cry4 et IgG2-Cry4) (Tableau 3).

**Tableau 3.** Résultats de la détection des toxines (haut) par les couples d'anticorps IgG1 – IgG2 (gauche) en densité optique mesurées à 450 nm. Trois concentrations de toxines sont testées : 50, 100 et 150 ng/mL. Les résultats positifs sont surlignés en vert.

	Cry4A			Cry4B			Cry11			Cyt		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150	50	100	150
<b>4AB</b>	0,138	0,214	0,270	0,086	0,124	0,178	0,022	0,020	0,013	0,007	0,009	0,001
<b>11</b>	0,057	0,037	0,036	0,027	0,021	0,009	0,224	0,372	0,471	0,037	0,044	0,004
<b>Cyt</b>	0,057	0,044	0,033	0,030	0,020	0,014	0,004	0,001	0,005	0,421	0,637	0,775

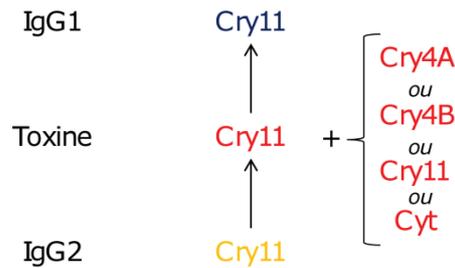
Les couples IgG1 – IgG2 sont spécifiques de la toxine pour laquelle ils ont été développés.

En conclusion :

**Malgré une légère non-spécificité de l'IgG1-Cry4 observée lors des premiers tests, on peut affirmer que les couples IgG1-IgG2 sont spécifiques de la toxine qu'ils ciblent.**

#### 5. Test de spécificité du couple IgG1 – IgG2 avec toxines en compétition

Nous avons réalisé un test ELISA en utilisant le couple IgG1 – IgG2 correspondant à une toxine et en mettant la toxine à trois concentrations différentes (50, 100 et 150 ng/mL) en compétition avec Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa ou Cyt1Aa à une concentration de 150 ng/mL. La Figure 29 illustre le protocole avec l'exemple de Cry11Aa.



**Figure 29.** Schéma illustrant les tests de spécificité des couples d'anticorps IgG1 – IgG2 lorsque les toxines sont en compétition avec les autres toxines du *Bti*.

**Tableau 4.** Densités optiques à 450 nm obtenues pour chaque toxine à 3 concentrations différentes (50, 100 et 150 ng/mL) (haut) mis en présence avec chaque toxine à 150 ng/mL (gauche). Le tableau A présente les DO obtenues suite à l'expérimentation et le tableau B représente les valeurs attendues sans effet de compétition ni de synergie entre toxines.

A Observé (150)	Cry4Aa			Cry4Ba			Cry11Aa			Cyt1Aa		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Cry4Aa				0,26	0,31	0,35	0,20	0,24	0,26	0,24	0,22	0,24
Cry4Ba	0,24	0,29	0,35				0,18	0,16	0,20	0,17	0,18	0,19
Cry11Aa	0,42	0,43	0,48	0,37	0,34	0,38				0,36	0,36	0,38
Cyt1Aa	0,78	0,79	0,84	0,73	0,68	0,76	0,72	0,73	0,73			

B Attendu (150)	Cry4Aa			Cry4Ba			Cry11Aa			Cyt1Aa		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Cry4Aa				0,25	0,30	0,35	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29
Cry4Ba	0,25	0,30	0,35				0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Cry11Aa	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47				0,47	0,47	0,47
Cyt1Aa	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77			

On n'observe aucune variation significative du signal lorsque l'on met les toxines en compétition avec d'autres toxines du *Bti* (Tableau 4).

En conclusion :

**Le test ELISA peut être réalisé avec des couples IgG1-IgG2 spécifiques des toxines ciblées non perturbés en milieu complexe de plusieurs toxines mélangées.**

#### D. Gammes de toxines séparées

Afin de pouvoir quantifier et normaliser les résultats entre plusieurs tests ELISA réalisés sur plusieurs jours différents, il est nécessaire de réaliser des gammes de toxines du *Bti*.

## 1. Purification et conservation des toxines

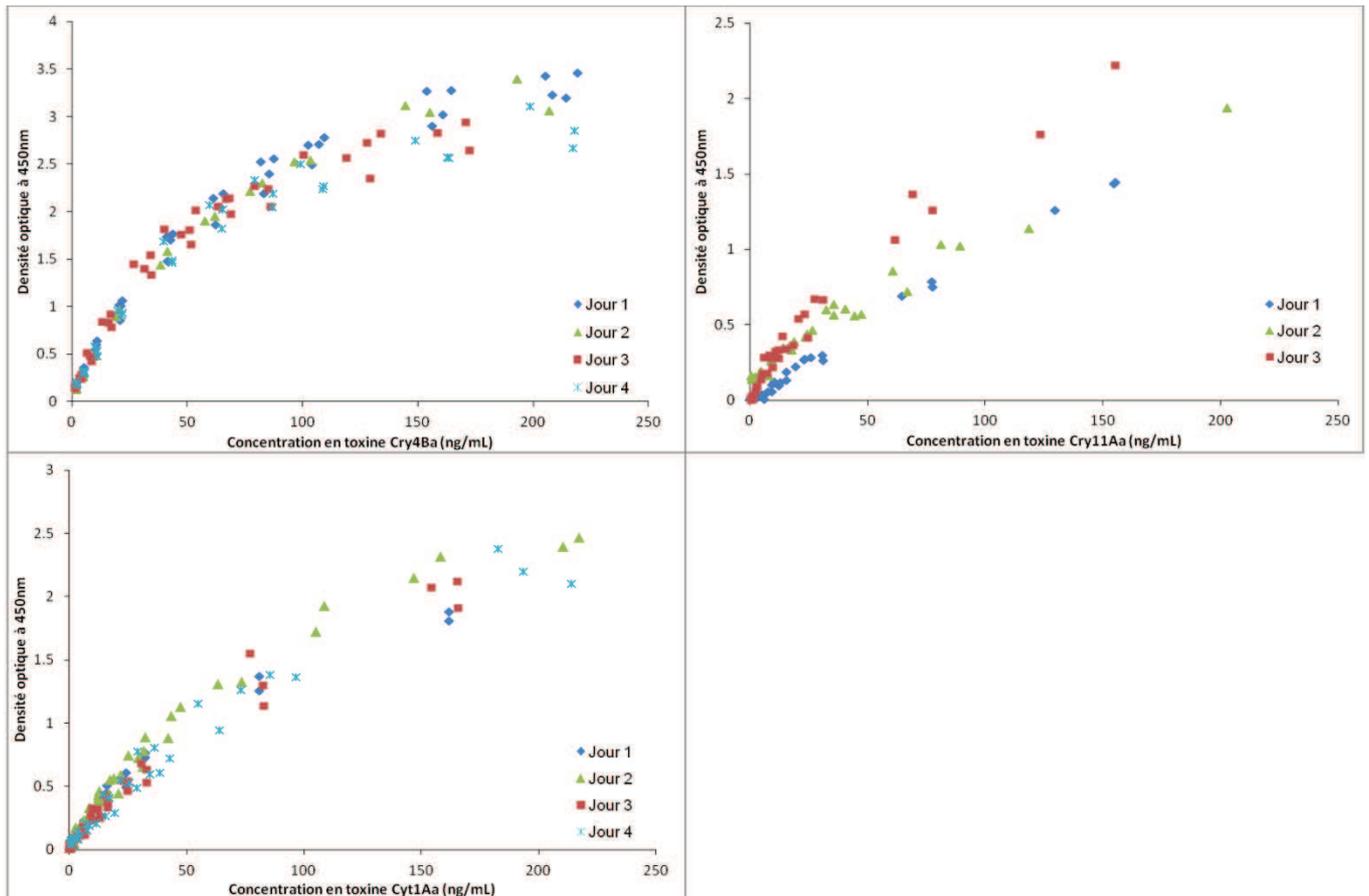
Les toxines sont produites comme décrit précédemment (page 52). Une fois solubilisées, les toxines sont purifiées à l'aide d'une colonne échangeuse d'ions (HiPrep DEAE FF 16/10, Amersham) puis « désalées » à l'aide d'une colonne HiPrep 26/10 Desalting (Amersham) assurant le même rôle qu'une dialyse (*i.e.* permet de supprimer les ions  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  qui peuvent nuire à la conservation et la quantification des toxines).

La quantité de protéines est estimée à l'aide d'un test de Bradford en utilisant la BSA (Albumine de Sérum Bovin) pour réaliser la gamme de concentrations connues. Les toxines purifiées sont ensuite aliquotées dans des tubes de 1,5mL puis lyophilisées. Elles sont conservées ainsi à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

## 2. Gammes de toxines

Pour réaliser la gamme, on resuspend les toxines lyophilisées dans 1mL d'eau distillée et on réalise un test de Bradford pour quantifier précisément la quantité de protéines juste avant le test ELISA et s'affranchir des potentielles variations liées à la lyophilisation. Les toxines sont ensuite diluées dans le tampon d'extraction (EB).

La Figure 30 présente les gammes obtenues sur plusieurs jours différents respectivement pour les toxines Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa. Plusieurs gammes ont été réalisées à partir de différents aliquotes de toxines lyophilisées le même jour et permettent de se rendre compte de la variabilité intra-plaque. Les gammes réalisées le même jour sont codées avec les mêmes pictogrammes pour faciliter la lecture graphique et faire ressortir l'information sur la variabilité inter-plaques entre plusieurs jours.



**Figure 30.** Densités optiques mesurées à 450 nm en fonction de concentrations croissantes en toxine Cry4Ba (A), Cry11Aa (B) et Cyt1Aa (C) exprimées en ng/mL. Les valeurs de chaque jour regroupent entre 2 et 4 gammes réalisées sur des plaques différentes.

Pour toutes les toxines, on remarque une très bonne réponse en fonction de la concentration en toxines. Plusieurs gammes réalisées à partir d'aliquotes lyophilisées différents mais réalisés le même jour sont très reproductibles, même lorsque les gammes sont réalisées par plusieurs personnes différentes.

Les expérimentations réalisées sur plusieurs jours ne montrent qu'une très faible fluctuation du signal pour Cry4Ba et Cyt1Aa, imputable à la variabilité inhérente aux anticorps eux-mêmes. Comparé aux autres toxines, les valeurs obtenues pour Cry11Aa présentent une variabilité plus importante entre les différents jours. Cela est due à sa conservation une fois lyophilisée qui est moindre que pour les deux autres toxines. Ainsi, les taux de récupérations peuvent varier, contrairement aux toxines Cry4Ba et Cyt1Aa.

En conclusion :

**Les gammes de toxines lyophilisées présentent peu de variation inter-plaques et inter-jours, permettant une quantification précise et reproductible des toxines dans les échantillons à tester.**

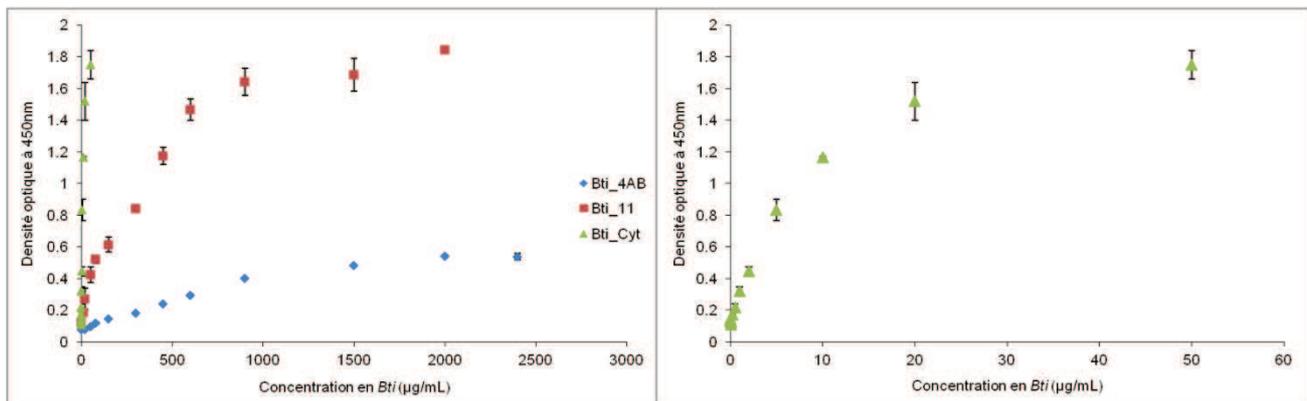
## E. Validation de l'outil

Pour pouvoir valider l'utilisation de cet outil pour quantifier les toxines et leurs proportions relatives dans les échantillons environnementaux, nous devons nous assurer que : **1.** le test ELISA permet une bonne détection de chacune des toxines du *Bti* et une conservation des proportions de chaque toxine et que **2.** l'extraction permet d'obtenir un signal proportionnel à la quantité de *Bti* présent dans l'échantillon.

### 1. Gammes de *Bti* commercial

#### a) Détection des toxines par ELISA

Le *Bti* commercial (Vectobac WG, 3000 UTI.mg<sup>-1</sup>) est solubilisé à l'aide du tampon Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mM) + DTT (10 mM) comme décrit précédemment (page 53). Il est dilué et directement déposé en triplicats dans les puits de la plaque ELISA pour l'expérimentation telle que décrit dans l'Annexe I.



**Figure 31.** Densités optiques mesurées à 450 nm en fonction de concentrations croissantes en *Bti* exprimées en µg de produit formulé par mL d'eau distillée. Les valeurs de DO obtenues pour les anticorps anti-Cry4 (losanges bleus), anti-Cry11 (carrés rouges) et anti-Cyt (triangles verts) sont présentés à gauche. Pour plus de lisibilité, les résultats obtenus avec les anticorps anti-Cyt sont également présentés seuls à droite. Chaque mesure est réalisée en triplicats. Erreur : écart-type.

On voit que le signal est très fort, notamment pour la toxine Cyt dont le signal sature rapidement pour des concentrations en *Bti* très faibles (moins de 50 µg/mL) (Figure 31). On observe une bonne corrélation entre le signal ELISA et la quantité de *Bti* quelle que soit la toxine considérée.

### b) Calcul des proportions de chaque toxine

Les valeurs de densité optique sont reportées sur les courbes étalons des toxines et les proportions de chaque toxine sont calculées à partir des résultats obtenus précédemment par ELISA. Les proportions des toxines sont également calculées après migration du *Bti* solubilisé sur un gel de protéines SDS-PAGE.

Le *Bti* commercial Vectobac WG solubilisé est déposé dans un gel de protéines (SDS-PAGE). Les différentes protoxines vont migrer en fonction de leur taille (kDa). Le gel est coloré avec du bleu de coomassie. Le gel obtenu est ensuite numérisé et l'intensité de chaque bande (*i.e.* bande de 130kDa pour Cry4Aa et Cry4Ba, 70kDa pour Cry11Aa et 28kDa pour Cyt1Aa) est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ v.1.41o (Girish et Vijayalakshmi, 2004)<sup>6</sup>. L'intensité de bandes colorées avec du bleu de Coomassie est directement proportionnelle à la taille des protéines. Pour avoir des valeurs d'intensité non biaisées par la taille pour chacune des toxines, nous avons divisé l'intensité de la bande par la taille (en kDa) des protéines correspondantes avant de calculer les proportions de chaque toxine. Les toxines Cry4Aa et Cry4Ba ayant des tailles très proches, il est difficile de les distinguer sur gel et sont donc groupées pour ces analyses.

**Tableau 5.** Proportions des toxines du *Bti* parmi toutes les toxines du *Bti* et parmi les toxines Cry uniquement calculées après migration sur gel de protéine (SDS-PAGE) ou par ELISA.

	Parmi toutes les toxines			Parmi les toxines Cry	
	Cry4Aa & Cry4Ba	Cry11Aa	Cyt1Aa	Cry4Aa & Cry4Ba	Cry11Aa
<i>Bti</i> solubilisé – SDS-PAGE	2,9%	15,5%	81,6%	15,7%	84,3%
<i>Bti</i> solubilisé – ELISA	1,0%	8,1%	90,9%	11,1%	88,9%

Comme décrit dans la littérature (Lacey, 2007), la toxine Cyt1Aa est largement majoritaire, représentant plus de 80% de la totalité des toxines du *Bti* (Tableau 5). Les toxines Cry restantes sont constituées d'environ 85% de toxine Cry11Aa et de seulement 15% de toxines Cry4Aa et Cry4Ba. Le test ELISA montre les mêmes proportions que le gel de protéines.

En conclusion :

**La quantification à l'aide du test ELISA montre que le signal est corrélé à la quantité de *Bti* déposée et que les proportions sont conservées pour toutes les toxines du *Bti*.**

<sup>6</sup> Un protocole vidéo de quantification de l'intensité des bandes d'un gel à l'aide du logiciel ImageJ est disponible à l'adresse suivante : [http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:analysis:gel\\_quantification\\_analysis](http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:analysis:gel_quantification_analysis).

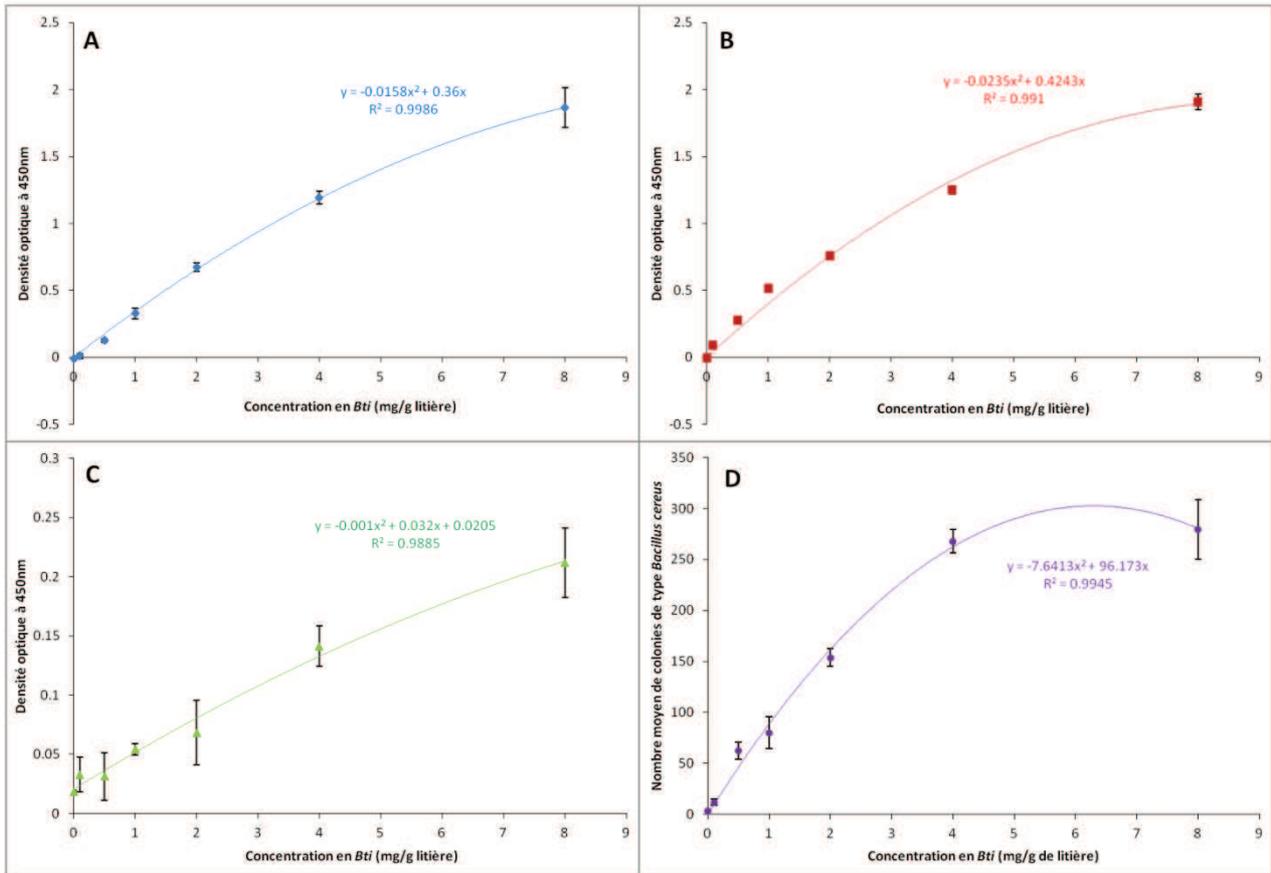
## 2. Extraction des toxines à partir de litières végétales contaminées

Les litières végétales utilisées pour ce test proviennent de gîtes larvaires jamais traités au *Bti* de la région lyonnaise (Rhône, 69). Elles sont constituées majoritairement de feuilles de chêne (*Quercus sp.*) et de quelques feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Leur pH est quasiment neutre (6,8).

### a) Efficacité de l'extraction

Les litières ont été contaminées avec des concentrations croissantes en *Bti* commercial (Vectobac WG, 3500 UTI.mg<sup>-1</sup>) : 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 et 8 mg de produit formulé par gramme de litière. L'extraction et la détection par ELISA sont réalisées telles que décrites en Annexe I.

Afin d'estimer l'efficacité de l'extraction des cristaux de *Bti*, des comptages de spores sont également réalisés. Pour cela, 1g de litière contaminée broyée est suspendue dans 10mL de milieu de culture TSB (Tryptic Soy Broth), agité 1h à 25°C puis incubé 30 min à 70°C. L'échantillon est dilué (1/10, 1/100 et 1/1000), puis décanté 1 min. Le surnageant est déposé et étalé sur un milieu LB-agar et incubé 24h à 30°C. Quatre réplicats sont réalisés pour chaque étalement. Les colonies de type *Bacillus cereus* sont alors comptabilisées (Figure 32D).



**Figure 32.** Densités optiques mesurées à 450 nm pour des extraits de litières contaminées avec des concentrations croissantes en *Bti* commercial (Vectobac WG). Les extraits sont analysés à l'aide d'anticorps anti-Cry4 (A, bleu), anti-Cry11 (B, rouge) et anti-Cyt (C, vert). Chaque mesure est réalisée en triplicats. Le nombre de colonies de type *Bacillus cereus* à partir de dilutions à 1/100 est également indiqué en fonction de la concentration en *Bti* dans l'échantillon (D, violet). Erreur : écart-type.

Plus les litières sont contaminées avec des concentrations importantes en *Bti*, plus le signal ELISA est important. De plus, l'augmentation de signal est corrélée avec l'augmentation de la concentration en *Bti* avec de fortes valeurs de  $R^2$  ( $>0,98$ ), tout comme le nombre de colonies de type *Bacillus cereus* comptabilisées (Figure 32). Cependant, on remarque que le signal ELISA obtenu avec les anticorps anti-Cyt est très faible comparé à ce que l'on obtient avec le *Bti* commercial solubilisé (Figure 31).

### b) Calcul des proportions de chaque toxine

De même que précédemment (page 61), on réalise un calcul des proportions des différentes toxines parmi toutes les toxines du *Bti* et parmi les toxines Cry uniquement. Les proportions des toxines extraites des litières contaminées ainsi que les proportions précédemment calculées sont indiquées (Tableau 6).

**Tableau 6.** Proportions des toxines du *Bti* parmi toutes les toxines du *Bti* et parmi les toxines Cry uniquement. Les proportions sont calculées à partir de *Bti* solubilisé après migration sur gel de protéine (SDS-PAGE) ou détecté par ELISA (Tableau 5) mais également à partir de *Bti* extrait de litières contaminées et détecté par ELISA.

	Parmi toutes les toxines			Parmi les toxines Cry	
	Cry4Aa & Cry4Ba	Cry11Aa	Cyt1Aa	Cry4Aa & Cry4Ba	Cry11Aa
<i>Bti</i> solubilisé – SDS-PAGE	2,9%	15,5%	81,6%	15,7%	84,3%
<i>Bti</i> solubilisé – ELISA	1,0%	8,1%	90,9%	11,1%	88,9%
<i>Bti</i> extrait – ELISA	12,6%	61,7%	26,7%	17,2%	82,8%

Après extraction des toxines à partir des litières contaminées au *Bti*, on remarque que les proportions des toxines parmi toutes les toxines du *Bti* sont modifiées alors qu'elles sont conservées pour les toxines Cry4 et Cry11 parmi les toxines Cry (Tableau 6). Il semble donc que l'on récupère les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa dans les mêmes proportions que celles observées dans le *Bti* commercial alors que la toxine Cyt1Aa est difficilement récupérable.

En conclusion :

**L'extraction ainsi que la détection par ELISA permettent d'obtenir un signal fort, proportionnel à la quantité de *Bti* présent dans la litière et reproductible. Les proportions sont conservées pour les toxines Cry alors que la toxine Cyt est plus difficilement récupérable après contact avec la litière végétale.**

### III. Application de l'outil

#### A. Caractérisation des litières toxiques

Quatre litières présentant une toxicité importante contre les larves de moustiques ont été utilisées. Toutes ont été prélevées en 1998 dans des gîtes à moustiques des environs de Talissieu (Ain, 01). Deux litières sont constituées majoritairement de feuilles de peuplier (*Populus nigra* – P23 et P26) et deux autres de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa* – Aul1 et Aul2). Broyées et tamisées à 0,05mm, elles sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Les litières sont pesées, les toxines du *Bti* extraites puis détectées en ELISA comme décrit en Annexe I. Six répliquats d'extractions (RE) sont réalisés pour les litières P26 et Aul1, cinq pour P23 et trois pour Aul2. Toutes les mesures sont répliquées quatre fois sur les plaques ELISA (RT) (Figure 33).

**Cry4AB**

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	
P26	RT1	0,575	0,523	0,536	0,520	0,548	0,486	
	RT2	0,557	0,506	0,528	0,526	0,546	0,481	
	RT3	0,533	0,518	0,523	0,518	0,536	0,484	
	RT4	0,550	0,516	0,525	0,525	0,550	0,484	
Moyenne		0,554	0,516	0,528	0,522	0,545	0,484	<b>0,525</b>
Ecart-type		0,017	0,007	0,006	0,004	0,006	0,002	0,024

**Cry11**

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	
P26	RT1	0,343	0,322	0,224	0,229	0,337	0,235	
	RT2	0,297	0,254	0,129	0,186	0,223	0,176	
	RT3	0,345	0,280	0,170	0,185	0,228	0,216	
	RT4	0,287	0,233	0,132	0,137	0,182	0,182	
Moyenne		0,318	0,272	0,164	0,184	0,242	0,202	<b>0,230</b>
Ecart-type		0,030	0,038	0,045	0,038	0,067	0,028	0,066

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	
P23	RT1	0,370	0,337	0,368	0,302	0,326	
	RT2	0,419	0,399	0,363	0,336	0,329	
	RT3	0,440	0,386	0,347	0,347	0,358	
	RT4	0,438	0,383	0,352	0,378	0,355	
Moyenne		0,417	0,376	0,358	0,341	0,342	<b>0,367</b>
Ecart-type		0,032	0,027	0,010	0,032	0,017	0,037

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	
P23	RT1	0,085	0,150	0,182	0,216	0,223	
	RT2	0,078	0,150	0,181	0,187	0,201	
	RT3	0,080	0,131	0,190	0,252	0,211	
	RT4	0,074	0,136	0,121	0,241	0,220	
Moyenne		0,079	0,142	0,169	0,224	0,214	<b>0,165</b>
Ecart-type		0,005	0,010	0,032	0,029	0,010	0,057

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	
Aul1	RT1	0,515	0,533	0,522	0,506	0,490	0,590	
	RT2	0,500	0,534	0,522	0,521	0,494	0,585	
	RT3	0,528	0,531	0,519	0,507	0,480	0,575	
	RT4	0,498	0,531	0,529	0,499	0,492	0,579	
Moyenne		0,510	0,532	0,523	0,508	0,489	0,582	<b>0,524</b>
Ecart-type		0,014	0,002	0,004	0,009	0,006	0,007	0,031

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	
Aul1	RT1	0,147	0,148	0,131	0,173	0,134	0,124	
	RT2	0,141	0,109	0,125	0,162	0,133	0,128	
	RT3	0,144	0,143	0,125	0,164	0,125	0,121	
	RT4	0,149	0,111	0,121	0,160	0,147	0,119	
Moyenne		0,145	0,128	0,126	0,165	0,135	0,123	<b>0,137</b>
Ecart-type		0,004	0,020	0,004	0,006	0,009	0,004	0,017

		RE1	RE2	RE3	
Aul2	RT1	0,294	0,283	0,281	
	RT2	0,293	0,269	0,272	
	RT3	0,294	0,269	0,275	
	RT4	0,284	0,268	0,269	
Moyenne		0,291	0,272	0,274	<b>0,279</b>
Ecart-type		0,005	0,007	0,005	0,010

		RE1	RE2	RE3	
Aul2	RT1	0,141	0,118	0,127	
	RT2	0,119	0,111	0,123	
	RT3	0,139	0,111	0,102	
	RT4	0,102	0,105	0,069	
Moyenne		0,125	0,111	0,105	<b>0,114</b>
Ecart-type		0,018	0,005	0,027	0,019

**Cyf**

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	
P26	RT1	0,092	0,107	0,092	0,073	0,076	0,065	
	RT2	0,083	0,093	0,086	0,079	0,072	0,078	
	RT3	0,092	0,086	0,099	0,094	0,087	0,080	
	RT4	0,105	0,084	0,088	0,080	0,159	0,071	
Moyenne		0,093	0,092	0,091	0,082	0,098	0,073	<b>0,088</b>
Ecart-type		0,009	0,010	0,006	0,009	0,041	0,007	0,018

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	
P23	RT1	0,086	0,088	0,087	0,074	0,123	
	RT2	0,090	0,095	0,076	0,088	0,079	
	RT3	0,094	0,084	0,079	0,089	0,084	
	RT4	0,086	0,081	0,082	0,086	0,092	
Moyenne		0,089	0,087	0,081	0,084	0,094	<b>0,087</b>
Ecart-type		0,004	0,006	0,005	0,007	0,020	0,010

		RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	
Aul1	RT1	0,071	0,083	0,088	0,081	0,083	0,106	
	RT2	0,057	0,074	0,076	0,072	0,061	0,106	
	RT3	0,063	0,077	0,074	0,072	0,073	0,086	
	RT4	0,065	0,073	0,080	0,062	0,077	0,103	
Moyenne		0,064	0,077	0,080	0,072	0,073	0,100	<b>0,078</b>
Ecart-type		0,006	0,005	0,006	0,007	0,009	0,010	0,013

		RE1	RE2	RE3	
Aul2	RT1	0,089	0,082	0,083	
	RT2	0,095	0,085	0,073	
	RT3	0,084	0,080	0,084	
	RT4	0,078	0,084	0,076	
Moyenne		0,087	0,083	0,079	<b>0,083</b>
Ecart-type		0,007	0,002	0,005	0,006

**Figure 33.** Densités optiques mesurées à 450 nm pour les deux litières toxiques de peuplier (P26 et P23) et d'aulne (Aul1 et Aul2). RT1 à RT4 représentent les quatre réplicats techniques et RE1 à RE6 représentent les six réplicats d'extractions réalisés. Les densités optiques moyennes sont surlignées en jaune pour chaque litière et chaque toxine. Les échantillons sont tous dilués trois fois.

Les résultats obtenus pour les quatre litières toxiques montrent que les réplicats d'extraction sont très peu variables, gageant de la **très bonne reproductibilité de l'extraction** (Figure 33). De même, les réplicats techniques sont quasiment identiques,

reflétant la faible variabilité entre les différents puits de plaques ELISA réalisées le même jour.

De même que précédemment (page 61), les proportions de chaque toxine sont calculées. Le Tableau 7 recense les proportions calculées pour les litières toxiques ainsi que l'ensemble des résultats du Tableau 6 afin de faciliter la discussion.

**Tableau 7.** Proportions des toxines du *Bti* parmi toutes les toxines du *Bti* et parmi les toxines Cry uniquement. Les proportions sont calculées à partir de *Bti* solubilisé après migration sur gel de protéine (SDS-PAGE) ou détecté par ELISA ou à partir de *Bti* extrait de litières contaminées et détecté par ELISA (Tableau 6). Les proportions des toxines dans les litières toxiques sont également indiquées.

	Parmi toutes les toxines			Parmi les toxines Cry	
	Cry4Aa & Cry4Ba	Cry11Aa	Cyt1Aa	Cry4Aa & Cry4Ba	Cry11Aa
<i>Bti</i> solubilisé – SDS-PAGE	2,9%	15,5%	81,6%	15,7%	84,3%
<i>Bti</i> solubilisé – ELISA	1,0%	8,1%	90,9%	11,1%	88,9%
<i>Bti</i> extrait – ELISA	12,6%	61,7%	26,7%	17,2%	82,8%
P26 extrait – ELISA	59,7%	28,3%	11,9%	67,8%	32,2%
P23 extrait – ELISA	56,7%	27,4%	15,9%	67,4%	32,6%
Aul1 extrait – ELISA	68,9%	19,1%	12,0%	78,3%	21,7%
Aul2 extrait – ELISA	55,8%	24,7%	19,6%	69,3%	30,7%

Les proportions des toxines sont globalement comparables entre les quatre litières toxiques (Tableau 7). Cela signifie que dans des milieux différents et avec deux essences végétales différentes, les toxines de *Bti* se comportent de manière similaire. Lorsque l'on compare les concentrations de toxines extraites des litières toxiques avec celles des toxines extraites de la litière contaminée au *Bti* commercial, on remarque que la concentration en toxines Cry4Aa et Cry4Ba est augmentée de plus de 26% par rapport à la dose opérationnelle de *Bti* Vectobac WG de 1kg/hectare (calculé sur la moyenne des quatre litières toxiques). Ce résultat conforte l'hypothèse d'une **remise en culture des spores de *Bti*** ayant entraîné une production de nouveaux cristaux dans les litières toxiques prélevées sur le terrain. Cependant, les concentrations en toxines Cry11Aa et Cyt1Aa sont respectivement 18 et 1557 fois moins importantes qu'avec une dose opérationnelle de *Bti*.

Après un contact avec de la litière végétale, on avait noté une diminution drastique de la proportion de toxine Cyt récupérée. Ce phénomène est amplifié ici avec une perte supplémentaire d'environ 15% de la toxine Cyt (Tableau 7). Ces résultats confirment le **comportement singulier de la toxine Cyt1Aa** en contact avec de la litière végétale. Cependant, alors que les toxines Cry conservaient leur proportions respectives après extraction de litières contaminées au *Bti* (85% Cry11 et 15% Cry4), on observe une inversion

de ces proportions dans les litières toxiques, les toxines Cry4Aa et Cry4Ba devenant majoritaires (70% des toxines Cry) par rapport à la toxine Cry11Aa (30%) (Tableau 7). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc une **persistance différentielle des toxines du *Bti* dans l'environnement**.

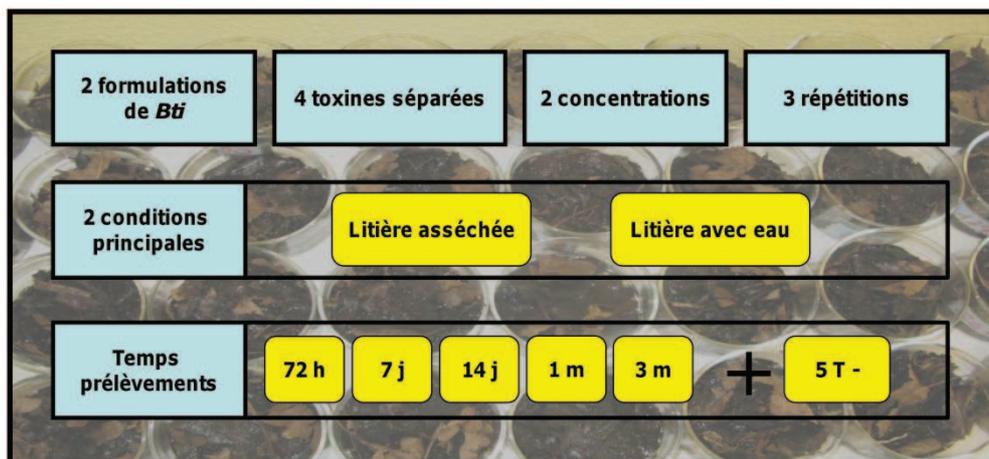
En conclusion :

**L'analyse des litières toxiques montre que, quelle que soit l'essence végétale, les toxines Cry4Aa et Cry4Ba sont devenues majoritaires par rapport aux autres toxines et dans des proportions plus importantes que dans le *Bti* commercial. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une remise en culture des spores et d'une persistance différentielle des toxines du *Bti* dans l'environnement.**

## B. Persistance différentielle des toxines

Afin de vérifier l'hypothèse d'une persistance différentielle des toxines, nous avons contaminé des litières végétales jamais traitées au *Bti* (décrites précédemment – page 62) avec différentes concentrations de toxines et de *Bti* formulé (Figure 34). La mise en place de l'expérimentation ainsi que les prélèvements ont été réalisés par Mattia Alessi lors de son stage de Master II BEE (Biodiversité, Ecologie, Environnement – Grenoble) sous mon encadrement ainsi que celui de Laurence Després.

### 1. Démarche expérimentale

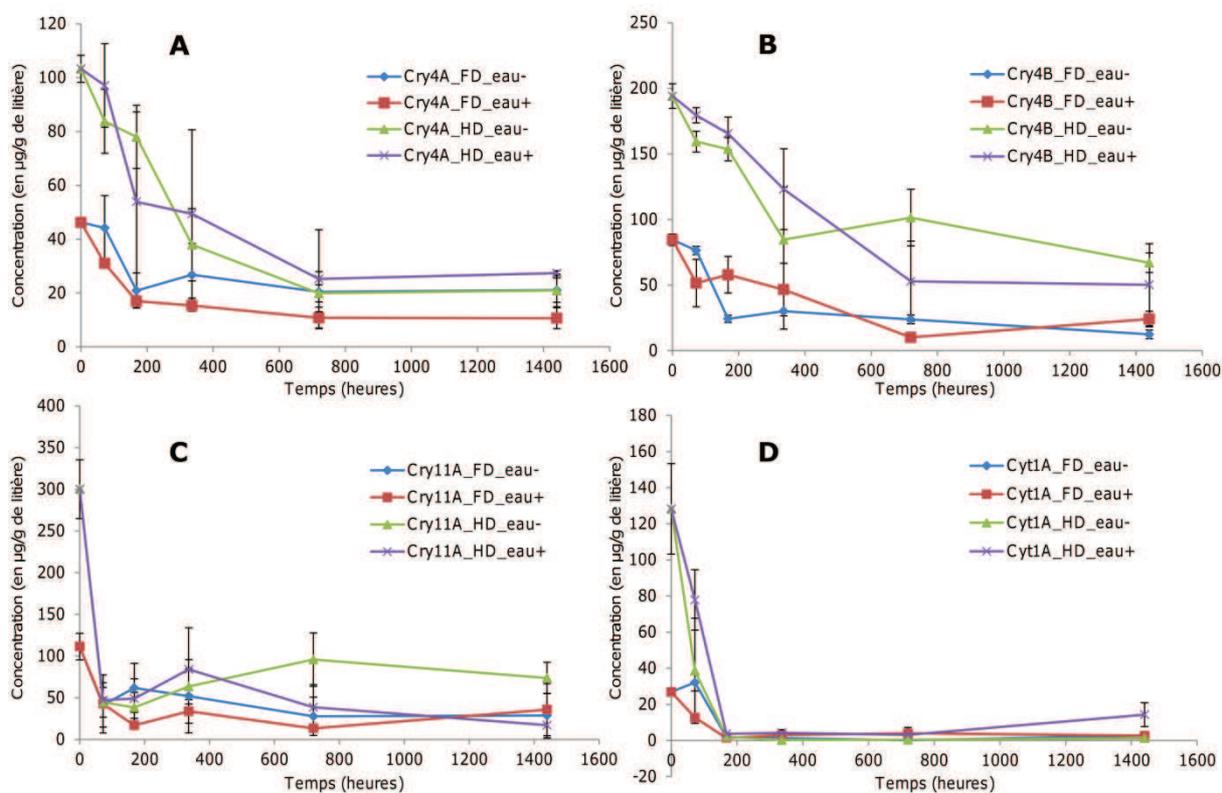


**Figure 34.** Plan de l'expérience réalisée pour étudier le devenir des toxines du *Bti* en contact avec de la litière végétale. Cinq témoin négatifs (5T-) ont été réalisés et récupérés à chaque temps de prélèvement. Auteur de la figure : Mattia Alessi.

10g de litière végétale ont été disposés dans plus de 300 cristallisoirs en verre contenant 60mL d'eau du robinet. Les litières sont contaminés avec 2 concentrations différentes pour chacune des 4 toxines du *Bti* (sous forme d'une suspension de cristaux et de spores) et pour les 2 formulations de *Bti* commercial utilisées par les EID : formulation en

granulés dispersibles Vectobac WG (3000 UTI.mg<sup>-1</sup>) et formulation liquide Vectobac 12AS (1200 UTI.mg<sup>-1</sup>) (Figure 34). Chaque contamination est réalisée en triplicats. Les concentrations sont choisies pour maximiser le signal ELISA pour les toxines Cry et Cyt, les hautes doses étant 3 à 4 fois plus concentrés que les faibles doses, alors que l'on a sélectionné la dose opérationnelle pour les deux *Bti* commerciaux ainsi qu'une dose cinq fois plus importante. Deux conditions différentes sont également testées : soit le niveau de l'eau est maintenu en ajoutant 4mL d'eau chaque jour, soit la litière est laissée intacte jusqu'à assèchement complet au bout de 17 jours. Les cristallisoirs sont exposés à des conditions d'insectarium (27°C, 70-80% d'humidité, 14h/10h jour/nuit). Les prélèvements sont réalisés à T<sub>0</sub>, 72h, 7 jours, 14 jours, 1 mois et 2 mois de contact. Lors du prélèvement, les litières sont mises à sécher pour être broyées finement. Deux réplicats d'extractions sont réalisés et testés en ELISA selon le protocole décrit en Annexe I. Les temps de demi-vie (t<sub>1/2</sub>), temps nécessaire pour perdre 50% du signal ELISA détecté en T<sub>0</sub>, sont calculés à l'aide d'une analyse de décroissance exponentielle réalisée avec le logiciel XLSTAT v.2009.4.06 (Addinsoft).

## 2. Analyse des résultats



**Figure 35.** Evolution de la concentration (en µg par g de litière végétale) en toxine Cry4Aa (A), Cry4Ba (B), Cry11Aa (C) et Cyt1Aa (D) en fonction du temps selon différentes concentrations (FD, Faible dose ; HD, Haute dose) et le maintien de l'eau (eau+ ou non (eau-)). Erreur : erreur standard.

Quelle que soit la toxine considérée, on n'observe aucune modification de la concentration en toxine que la litière soit maintenue immergée dans l'eau ou non (Figure 35). Ainsi, l'assèchement des litières végétales, courant dans les gîtes larvaires de moustiques, influe peu sur la persistance des toxines du *Bti*. Par la suite, tous les calculs seront donc réalisés sur la moyenne des deux modalités (eau+ et eau-) pour chaque concentration de chaque toxine. De plus, la différence entre les deux concentrations utilisées s'estompe rapidement ; la quantité de toxines présentes initialement en plus forte concentration diminue plus rapidement que celles présentes initialement en plus faible concentration. Cet effet est d'autant plus marqué pour les toxines Cry11Aa et Cyt1Aa pour lesquelles la différence n'est plus mesurable dès 72h de contact (Figure 35A,B) alors qu'il faut attendre 14 jours pour que la distinction entre les deux modalités de contaminations ne soit plus possible pour Cry4Aa et Cry4Ba (Figure 35C,D). Ainsi, augmenter la quantité de *Bti* épandu ne permet pas d'augmenter significativement la persistance des toxines. Ces résultats montrent l'importance de respecter les doses opérationnelles lors des traitements insecticides et sont cohérents avec les observations des gestionnaires sur le terrain où un surdosage du *Bti* ne permet pas d'augmenter sa durée d'efficacité (Mulla *et al.*, 1993).

La toxine Cry11Aa est celle qui montre la diminution la plus rapide (temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 63h et 24h pour les faibles (FD) et hautes doses (HD) respectivement) suivie par la toxine Cyt1Aa ( $t_{1/2}$  de 86h et 53h pour FD et HD respectivement). Les toxines Cry4Aa et Cry4Ba présentent toutes les deux des temps de demi-vie beaucoup plus importants (respectivement 5j20h et 8j20h pour les faibles doses et 12j20h et 22j15h pour les hautes doses). Cependant, même après 2 mois de contact, on observe une persistance importante des toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa (23%, 30% et 15% respectivement lorsque les litières sont contaminées à haute dose et 34%, 21% et 29% respectivement à faible dose) alors que la toxine Cyt1Aa n'est plus détectable après 2 semaines de contact. Toutes les toxines observent une diminution très importante de leur concentration dans les premiers jours puis une diminution plus lente. Ces profils de diminution non linéaires sont cohérents avec des études réalisées sur la persistance des toxines solubles Cry1 et Cry3 dans différents types de sols (Palm *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2005; Helassa *et al.*, 2011a; Helassa *et al.*, 2011b). Il semble ainsi que la structure hétérogène de la litière s'apparente à celle d'un sol et génère des profils d'adsorption des toxines similaires (Madliger *et al.*, 2011).

Aucun signal n'a été détecté pour les contaminations avec les deux formulations de *Bti* commercial. Cela est probablement dû à une trop faible concentration choisie, même si un signal suffisamment important avait été détecté lors des tests préliminaires. L'expérimentation doit donc être réitérée en choisissant des doses plus importantes ou lorsque la sensibilité du test ELISA aura été augmentée. Cela permettra de déterminer si le

comportement du *Bti* est différent de celui des toxines cristallines testées séparément, dû notamment à l'enveloppe lamellaire qui maintient les différents cristaux entre eux, absente pour les toxines produites séparément, ou à la formulation commerciale qui peut influencer sur la stabilité des toxines dans l'environnement.

En conclusion :

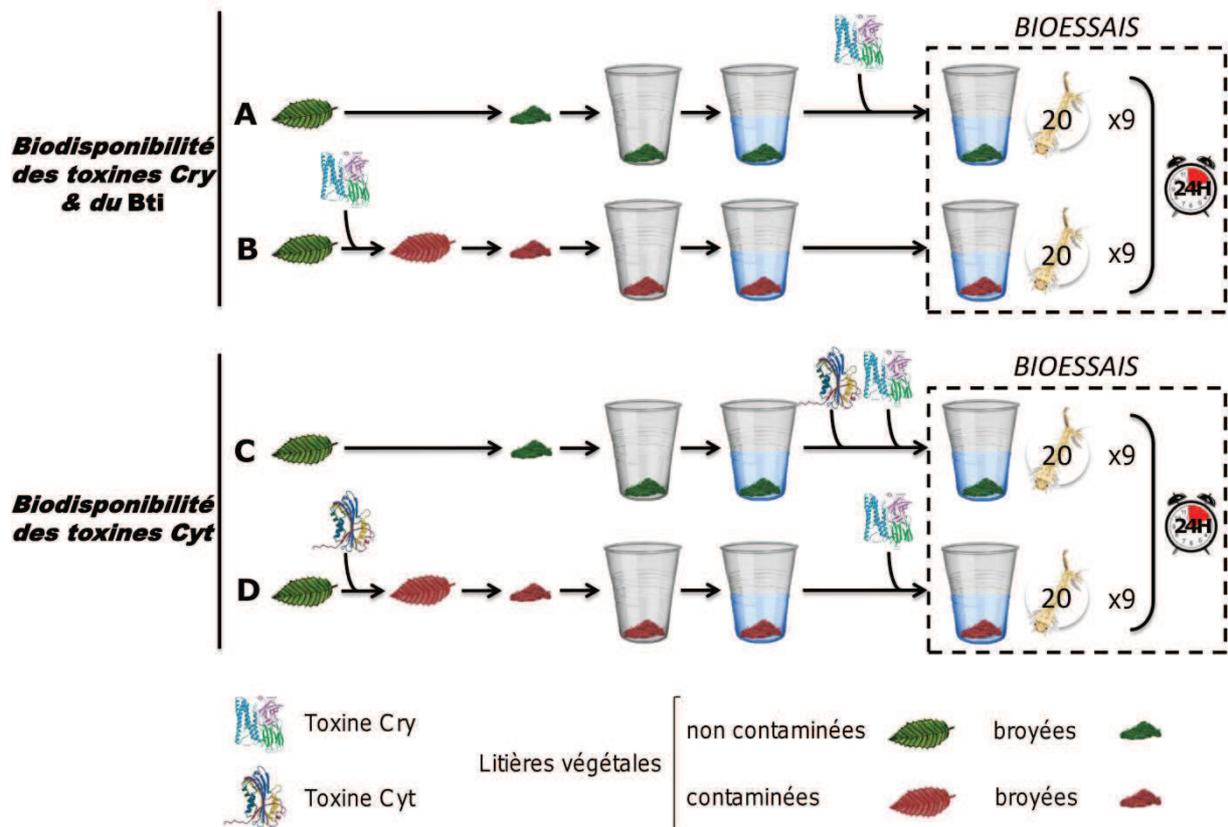
**L'assèchement des litières n'altère pas la persistance des toxines. La toxine Cry11Aa est celle dont la détectabilité diminue le plus rapidement, suivi de la toxine Cyt1Aa. Entre 15% et 34% de la quantité de toxine Cry inoculée est encore détectable après 2 mois de contact alors que la toxine Cyt1Aa est indétectable après seulement 14 jours. Un suivi du *Bti* commercial doit être réalisé dans les mêmes conditions pour valider ces observations et pouvoir mieux comprendre le comportement des toxines en milieu naturel.**

### C. Cyt, une toxine au comportement singulier

Lors d'un contact, même court, du *Bti* avec de la litière végétale, nous avons vu que la toxine Cyt1Aa était difficilement récupérable contrairement aux autres toxines (Tableau 6 - page 64). Ce phénomène s'est confirmé avec une faible proportion des toxines Cyt dans les litières toxiques (Tableau 7 - page 66) ainsi qu'une rapide « disparition » de la toxine Cyt lorsque l'on contamine des litières avec la toxine seule (Figure 35).

Nous avons voulu tester l'impact de la forte affinité des toxines Cyt pour les litières végétales sur leur biodisponibilité pour les larves de moustiques. Les toxines Cyt n'étant toxiques pour les larves de moustiques qu'à fortes doses, nous avons testé si le contact des toxines Cyt avec les litières altérait leur activité synergique sur les toxines Cry, et non leur toxicité directe pour les larves. Nous avons également réalisé des essais avec les toxines Cry en contact avec la litière en mesurant les variations de leur toxicité directe sur les larves de moustiques. Les mêmes expérimentations ont été réalisées avec deux formulations de *Bti* commercial (Vectobac WG et Vectobac 12AS) et du *Bti* produit en laboratoire. Ces travaux ont été valorisés par un article sous presse dans le journal *Applied and Environmental Microbiology* (Article VI) (Tetreau *et al.*, 2012b). La conception de l'expérimentation et les tests préliminaires ont été réalisés avec l'aide de Renaud Stalinski (Master II BEE) et de Dylann Kersusan (niveau Master I, stagiaire bénévole) sous ma direction et celle de Laurence Després.

## 1. Démarche expérimentale



**Figure 36.** Schéma du protocole suivi pour mesurer l'effet du contact du *Bti* commercial et des toxines Cry et Cyt avec des litières végétales sur leur biodisponibilité pour les larves de moustiques.

Pour ces tests, nous avons utilisé les litières non traitées au *Bti* décrites précédemment (page 62). Les tests toxicologiques sont réalisés dans des gobelets en plastique contenant 50mL d'eau du robinet et 20 larves de moustique *Ae. aegypti* de stade 4 précoce (OMS, 2005). Les bioessais ont été réalisés dans des conditions d'insectarium (27°C, 14h/10h jour/nuit, 80% d'humidité). Pour chaque condition, neuf réplicats ont été réalisés et la mortalité a été mesurée au bout de 24h d'exposition.

**L'originalité de cette approche est de comparer des toxines mises en contact au préalable avec de la litière (Figure 36B,D) avec des toxines directement déposées dans les gobelets contenant de la litière broyée non contaminée (Figure 36A,C).**

Afin de mesurer la **biodisponibilité des toxines Cry** pour les larves de moustiques, les concentrations des toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa ont été choisies pour atteindre environ 70% de mortalité après 24h (5,20, 3,13 and 0,97 µg/mL respectivement). Nous avons donc comparé deux conditions : **1.** Soit les toxines sont ajoutées dans les gobelets contenant au préalable la litière finement broyée, l'eau et les 20 larves (Figure 36A). **2.** Soit les litières sont contaminées avec la toxine Cry, laissées à sécher toute la nuit puis broyées

et ajoutées dans les gobelets contenant l'eau et les 20 larves (Figure 36B). Les différences statistiques entre les toxines préalablement mises en contact ou non avec la litière ont été calculées à l'aide de régressions linéaires réalisées avec le logiciel R 2.8.1 (R, 2007).

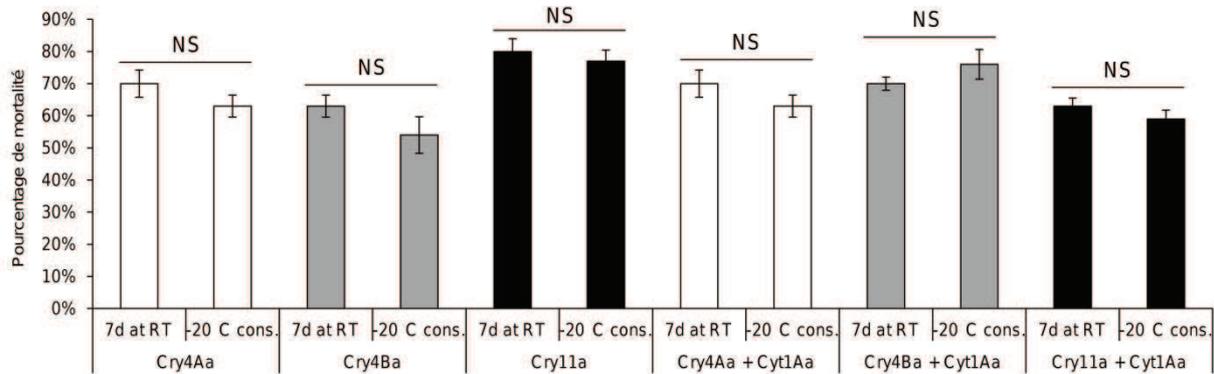
La **biodisponibilité de deux formulations de *Bti* commercial** a également été testée : Vectobac WG (poudre mouillable) et Vectobac 12AS (formulation liquide). Afin de tester l'effet de la formulation commerciale, du ***Bti* a été produit en Nutrient Agar**, tel que décrit précédemment (page 53), à partir de spores isolées du *Bti* Vectobac WG et a également été testé. Leur biodisponibilité est mesurée de la même manière que les toxines Cry (Figure 36A,B) sauf que le *Bti* est mis en contact avec la litière pendant quatre durées d'exposition différentes : 3 heures, 1j, 2j et 7 jours (Figure 36B). La concentration en *Bti* a été choisie pour atteindre 70-80% de mortalité : Vectobac WG, 319 ng de produit formulé par mL ; Vectobac 12AS,  $6,4 \times 10^{-4}$   $\mu\text{L/mL}$  et *Bti* produit, 1.7 ng/mL.

Afin de mesurer la **biodisponibilité des toxines Cyt** pour les larves de moustiques, les concentrations des toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa ont été choisies pour atteindre 10% de mortalité après 24h (586, 47, and 23 ng/mL respectivement). Les concentrations en toxine Cyt1Aa ont été choisies pour que, ajoutée aux toxines Cry, l'effet synergique attendu permette d'atteindre une mortalité d'environ 70% après 24h (4 ng/mL pour la synergie de Cry4Aa, et 21 ng/mL pour la synergie de Cry4Ba et Cry11Aa). Deux conditions sont également testées : **1.** Soit les toxines Cyt et Cry sont ajoutées dans les gobelets contenant au préalable la litière broyée finement, l'eau et les 20 larves (Figure 36C). **2.** Soit les litières sont contaminées avec la toxine Cyt puis laissées en contact 3 heures, 1j, 2j ou 7 jours avant d'être broyées. Les litières contaminées sont ajoutées dans les gobelets contenant l'eau, les 20 larves ainsi que la toxine Cry considérée (Figure 36D). Les différences statistiques entre les toxines mises en contact au préalable ou non avec la litière ont été calculées à l'aide de régressions linéaires couplées à un test de comparaison multiple des moyennes (test de Tukey's Honestly Significant Difference) réalisées avec le logiciel R 2.8.1 (R, 2007).

Pour vérifier que les différences observées ne sont pas liées à une **solubilisation et/ou une dégradation des toxines avec le temps**, plusieurs tests complémentaires ont été réalisés. **1.** Les toxines Cry et Cyt sont laissées 3 heures, 1j, 2j et 7 jours à température ambiante et à 4°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10.000g pendant 10 minutes et le surnageant est analysé en gel de protéines SDS-PAGE ainsi qu'en ELISA pour détecter la présence potentielle de toxine solubilisée et/ou dégradée. **2.** Les toxines Cry et Cyt sont laissées 7 jours à température ambiante puis sont comparées avec les mêmes lots conservés à -20°C en bioessais pour tester une éventuelle diminution de leur toxicité avec le temps. Pour cette expérience, cinq réplicats ont été réalisés pour le bioessai. L'analyse

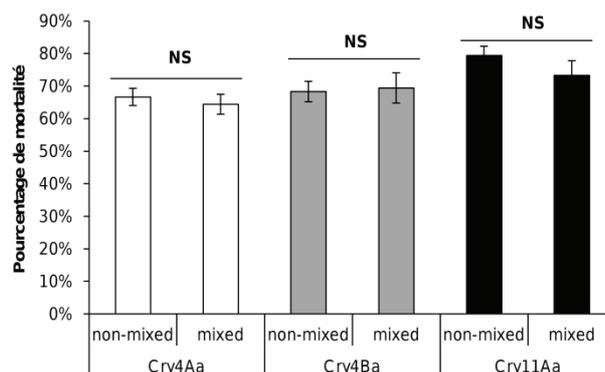
statistique est réalisée comme pour l'étude de la biodisponibilité des toxines Cry (régressions linéaires).

## 2. Analyse des résultats



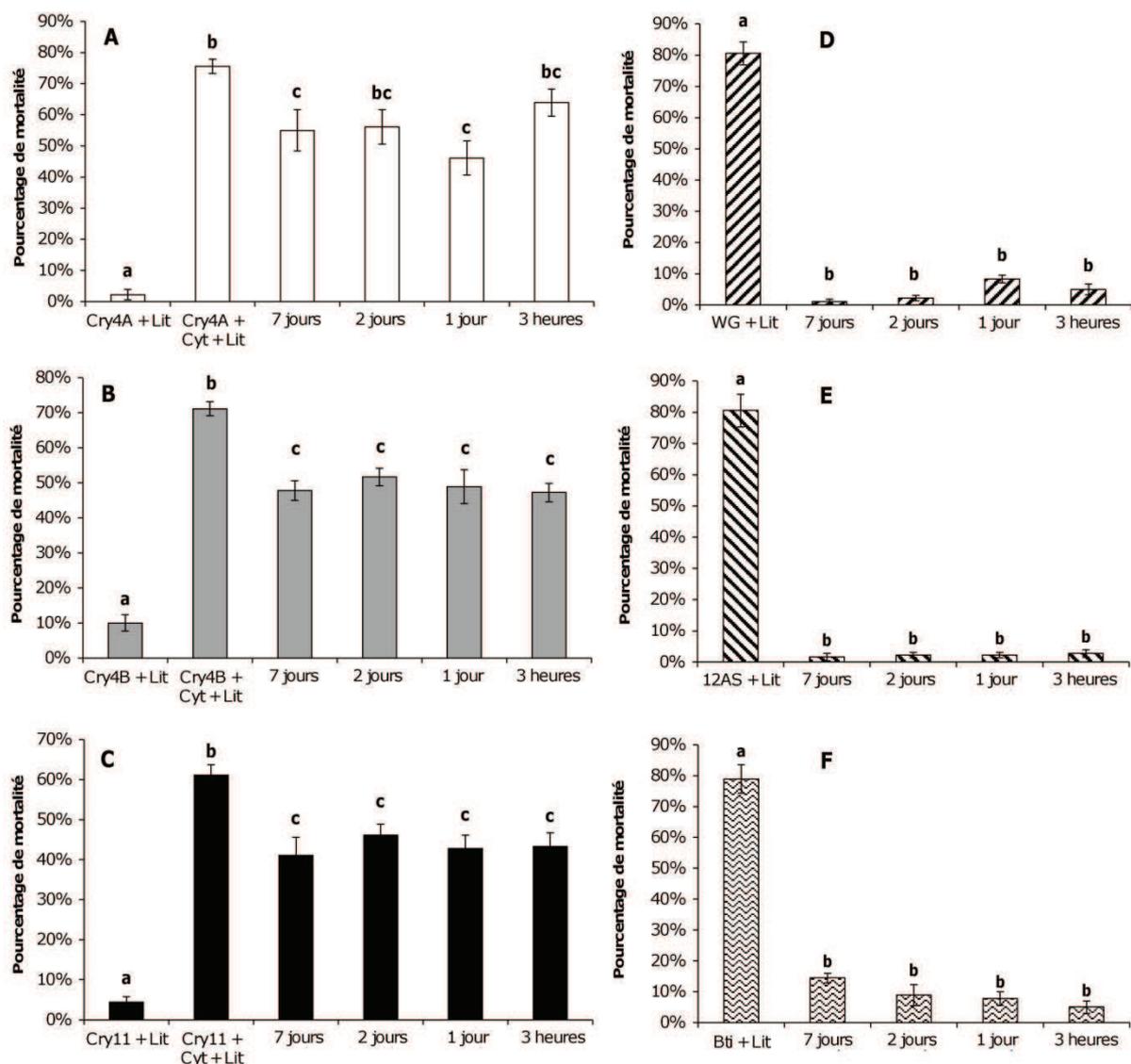
**Figure 37.** Pourcentage de mortalité des larves exposées aux toxines Cry4Aa (blanc), Cry4Ba (gris) et Cry11Aa (noir) laissées 7 jours à température ambiante (7d at RT) ou conservées au congélateur (-20°C cons.). Le même test est réalisé sur la toxine Cyt1Aa laissée 7 jours à température ambiante ou conservée au congélateur à laquelle on rajoute des toxines Cry4Aa (blanc), Cry4Ba (gris) et Cry11Aa (noir). Tous les tests sont réalisés en présence de litière végétale. Les différences non significatives entre les deux conditions de conservation pour une même toxine sont indiquées par « NS ». Erreur : erreur standard.

Aucune solubilisation ni dégradation des toxines n'a été observée en SDS-PAGE ni en ELISA lorsque les toxines sont laissées à température ambiante et à 4°C de 3 heures à 7 jours de contact. De plus, lorsque les toxines sont laissées pendant 7 jours à température ambiante, leur activité insecticide n'est pas altérée, quelle que soit la toxine considérée (Figure 37).



**Figure 38.** Pourcentage de mortalité des larves exposées aux toxines Cry4Aa (blanc), Cry4Ba (gris) ou Cry11Aa (noir) en contact (mixed) ou non (non-mixed) avec de la litière végétale. Les différences non significatives entre les toxines sont indiquées par « NS ». Erreur : erreur standard.

Lorsque les toxines Cry sont mises en contact avec de la litière végétale, il n'y a aucune altération de leur toxicité pour les larves de moustiques (Figure 38).



**Figure 39. A.B.C.** Pourcentage de mortalité des larves exposées aux toxines Cry4Aa (A, blanc), Cry4Ba (B, gris) ou Cry11Aa (C, noir) sans la toxine Cyt1Aa (Cry + Lit) ou avec la toxine Cyt1Aa non-mixée avec la litière (Cry + Cyt + Lit) ou en contact 3h, 1, 2 ou 7 jours. **D.E.F.** Pourcentage de mortalité de larves exposées à deux formulations de *Bti* commercial, Vectobac WG (D) et Vectobac 12AS (E), et à du *Bti* produit (F) non-mixé avec la litière (*Bti* + Lit) ou en contact 3h, 1, 2 ou 7 jours. Les différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont indiquées par des lettres différentes entre les barres. Erreur : erreur standard.

Nos résultats **confirment l'activité synergique des toxines Cyt sur les toxines Cry** : on observe une augmentation de 73%, 61% et 57% de la mortalité quand la toxine Cyt1Aa est ajoutée aux toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa respectivement (Figure 39A,B,C). Au contact de la litière, l'action synergique des toxines Cyt pour les toxines Cry diminue d'environ 20% quelle que soit la durée de contact et la toxine considérée (20,28%, 22,22% and 17,18% de diminution pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa respectivement - Figure 39A,B,C). Cela signifie que la toxine Cyt se fixe rapidement à la litière, la diminution de 20% apparaissant dès 3h d'exposition. On note cependant une différence entre la quantité de toxine Cyt fixée de manière irréversible à la litière (environ

60% - Tableau 6, page 64) et la diminution d'activité synergique des toxines Cyt fixées (environ 20% - Figure 39A,B,C). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer cette différence :

1. Cette différence peut être due au **fort pouvoir synergique des toxines Cyt** : peu de toxines Cyt sont nécessaires pour augmenter de manière exponentielle la toxicité des toxines Cry pour les larves de moustiques. De ce fait, la faible proportion de toxines Cyt encore extractible pour l'ELISA et biodisponible serait suffisante pour induire 80% de l'activité synergique totale. De plus, l'activité des toxines Cyt peut être augmentée par des composants de la litière ingérés par la larve en même temps que les protoxines, tels que les acides tanniques, capables d'augmenter la toxicité de *Bt var. kurstaki* chez *Trichoplusa ni* (Gibson *et al.*, 1995). Cependant, l'influence des acides tanniques n'est pas claire car ils ont également été décrits comme capables d'inhiber la toxicité de *Bt var. aizawai* chez *Spodoptera litura* (Isayama *et al.*, 2011).

2. Une partie des toxines **Cyt fixées à la litière peut encore être capable de synergiser** les toxines Cry. Il a déjà été démontré que des toxines Cry solubilisées fixées à du sol peuvent conserver leur toxicité (Gonzalez *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003a). Cependant, le contexte de notre étude est très différent (cristaux, litières) et le comportement des toxines Cyt peut complètement différer des toxines Cry.

3. Les toxines **Cyt peuvent être plus rapidement dégradées que les toxines Cry**, notamment par les microorganismes présents dans la litière. En effet, le *Bti* est connu pour être dégradé par les microorganismes (Lacey, 2007). Néanmoins, si la diminution d'activité était liée à une activité microbienne, on s'attendrait à ce qu'elle évolue avec le temps ce qui n'est pas le cas ici. Cela exclue donc l'implication de l'activité microbienne dans la différence de toxicité entre les toxines Cyt et les toxines Cry en présence de litière.

4. La fixation des toxines Cyt à la litière peut entraîner une **modification de leur structure tridimensionnelle** induisant une diminution de leur activité synergique et/ou de leur détection par le test ELISA. Il a été montré que des toxines Cry liées à du sol (Stotzky, 2004) ou à de la litière (présente thèse) conservent leur antigénicité et leur activité insecticide. Cependant, la toxine Cyt a une conformation 3D très différente de celle des toxines Cry et peut interagir plus fortement que les toxines Cry avec la structure hétérogène de la litière végétale (Madliger *et al.*, 2011), pouvant expliquer la diminution de son activité synergique et de sa détection par ELISA. De plus, les toxines Cyt agissant comme des récepteurs pour les toxines Cry en s'insérant de manière non spécifique dans la membrane intestinale des larves de moustiques, leur fixation à la litière pourrait supprimer leur effet synergique.

Lorsque le *Bti* est laissé en contact avec de la litière végétale, quel que soit le temps de contact, on observe une **perte quasi-totale de la toxicité du *Bti*** pour les larves de moustiques (Figure 39D,E,F). Aucun effet de la formulation commerciale n'a été détecté, les trois *Bti* testés (Vectobac WG, Vectobac 12AS et *Bti* produit) ont montré les mêmes profils de diminution de leur toxicité. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Nous avons vu que lorsque la toxine Cyt est fixée à la litière, son effet synergique sur chacune des toxines Cry diminue de 20% (Figure 39A,B,C). Au sein du *Bti*, on observe probablement un effet cumulatif de cette perte de synergie sur chacune des toxines Cry, entraînant une importante diminution de la toxicité du *Bti* dans son ensemble. De plus, contrairement aux expériences réalisées sur les toxines produites et testées séparément, le cristal de *Bti* possède une **enveloppe lamellaire** enveloppant les trois cristaux et maintenant leur cohésion, pouvant expliquer une interaction différente avec la litière et un piégeage potentiellement plus important du cristal par la litière végétale.

Ces travaux ouvrent de nouvelles voies de recherche pour mieux comprendre comment plusieurs toxines sous forme de cristal peuvent interagir avec des litières végétales et pourquoi les toxines Cyt perdent une partie de leur activité synergique alors que les toxines Cry conservent leur toxicité. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pourquoi le *Bti* perd quasi totalement sa toxicité en contact avec la litière. Cette observation permet de mieux comprendre pourquoi l'activité résiduelle du *Bti* perdure moins longtemps dans certains milieux, notamment lorsqu'il y a une présence importante de matière organique (Boisvert et Lacoursière, 2004) : le *Bti*, en atteignant la litière végétale qui tapisse le fond des gîtes, se retrouve « piégé » et perd ainsi son activité insecticide pour les larves de moustiques. Les mêmes expériences doivent également être réalisées avec des sols pour voir si ce phénomène est inhérent aux litières végétales ou s'il peut être généralisé à d'autres composants des gîtes à moustiques.

En conclusion :

**Le contact des toxines Cyt avec la litière végétale entraîne une diminution de leur activité synergique sur les toxines Cry. Le contact du *Bti* avec la litière entraîne également une diminution drastique de sa toxicité. Ces résultats ouvrent la voie à de nombreuses études afin de caractériser les mécanismes responsables de ces interactions.**

## D. Application à grande échelle

Dans le cadre d'un projet financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR – projet DIBBECO) en collaboration avec les EID des régions Rhône-Alpes (RA) et Méditerranée (Med), un large échantillonnage de gîtes traités et non traités a été réalisé. Des prélèvements de litières végétales (RA) et de sol (RA et Med) ont été réalisés dans plus de 30 gîtes à moustiques non traités ou traités régulièrement en 2009, 2010 et 2011.

Les étalements bactériens, permettant de caractériser la présence de spores, sont en cours d'analyse. Les extractions de toxines ainsi que les tests ELISA ont été réalisés sur ces échantillons. **Aucun signal ELISA pour aucune des toxines n'a été détecté dans aucun des échantillons prélevés sur le terrain.** Dans des conditions « normales » d'utilisation, le *Bti* n'est pas détectable dans les prélèvements, même quelques jours après un traitement. Cela signifie que l'outil que nous avons développé n'est pas encore assez sensible pour détecter finement les traces de *Bti* épandue dans l'environnement.

## IV. Vers une meilleure compréhension du devenir du *Bti* dans l'environnement

### A. Amélioration de l'outil

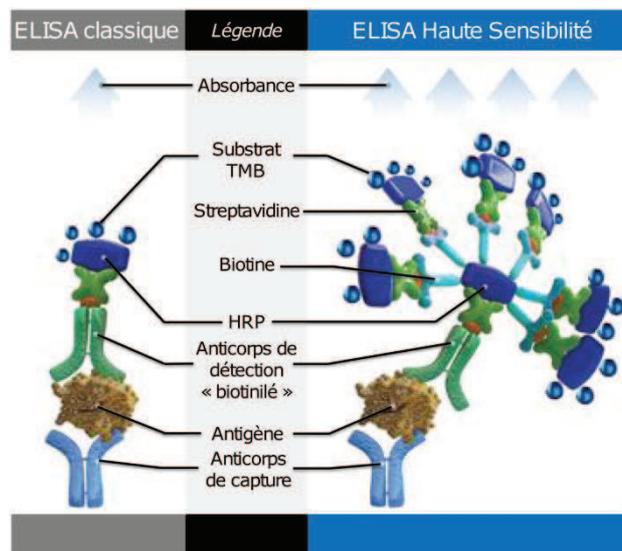
Comme nous venons de le voir, l'outil que nous avons développé est tout à fait adapté pour extraire et suivre le devenir du *Bti* et des différentes toxines qui le composent dans un contexte de laboratoire. Cependant, dans des conditions environnementales, la dose de *Bti* épandue est trop faible pour pouvoir être détectée par notre test. Seule une remise en culture (*i.e.* contexte des litières toxiques) peut permettre de générer un signal ELISA important. De ce fait, en l'état actuel du développement de l'outil, il peut être utilisé dans deux contextes différents : **1.** En laboratoire pour réaliser des cinétiques d'adsorption/désorption des toxines du *Bti* (test quantitatif) ; **2.** A partir d'échantillons environnementaux pour détecter une éventuelle remise en culture des spores (test de présence/absence de recyclage).

**L'amélioration de l'outil passe donc par une augmentation de sa sensibilité**, soit en concentrant les toxines présentes dans l'échantillon, soit en augmentant le signal ELISA.

La **concentration des toxines** dans l'extrait peut être réalisée par immunoprécipitation. Cette étape permettrait de faire précipiter les toxines spécifiquement à l'aide des anticorps utilisés lors de l'ELISA. L'inconvénient majeur de cette étape est d'alourdir la procédure d'extraction et d'être coûteux, nécessitant d'utiliser une plus grande

quantité d'anticorps. De plus, elle peut apporter un biais important si la précipitation n'est pas homogène entre les extraits, risquant de diminuer la reproductibilité de l'extraction.

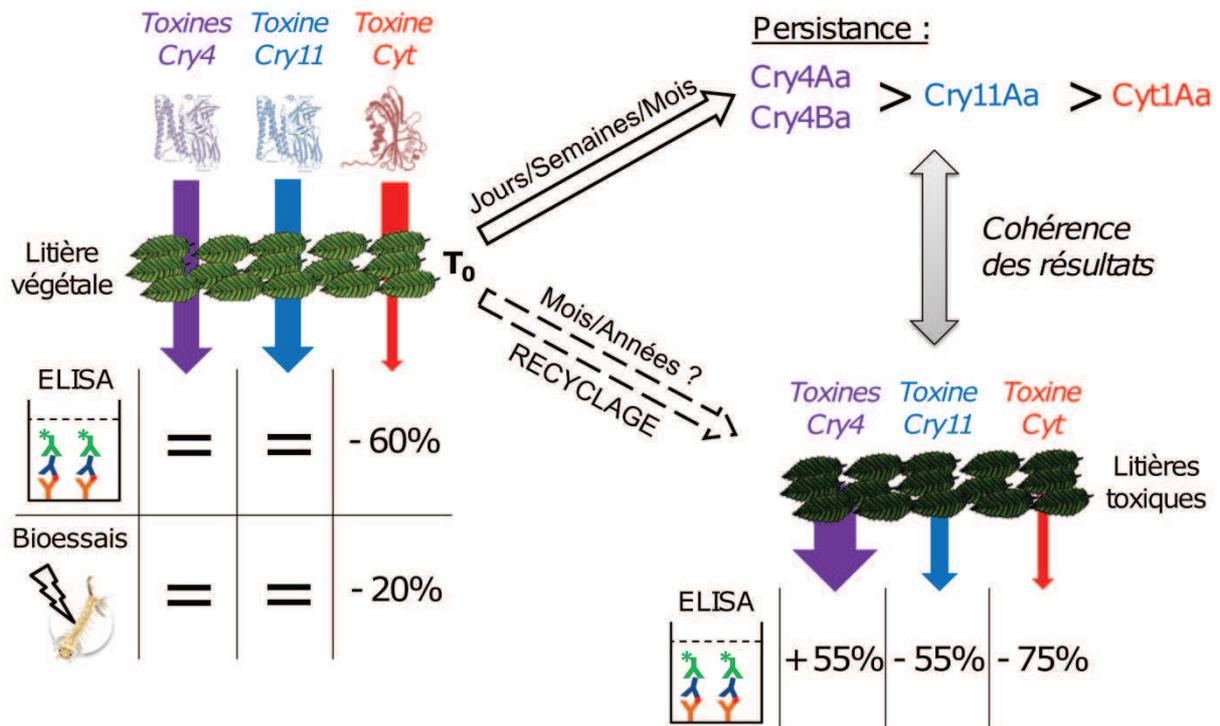
L'**augmentation du signal ELISA** semble donc l'amélioration la plus pertinente dans notre contexte. Tout d'abord, le **développement de nouveaux anticorps** permettra de contrôler leur spécificité ainsi que de sélectionner les plus performants et adaptés à notre outil. Nous utiliserons des anticorps monoclonaux comme anticorps de capture, et des anticorps polyclonaux comme anticorps de détection, afin d'augmenter le nombre d'épitopes reconnus et donc le signal spécifique. Une optimisation de l'ELISA peut également passer par l'utilisation d'un système d'**ELISA haute sensibilité basé sur un complexe biotine-streptavidine** (Figure 40).



**Figure 40.** Différence entre un ELISA classique (un seul anticorps de détection) avec un ELISA Haute Sensibilité (avec un complexe biotine-streptavidine). Modifié d'après une image de <http://www.ebioscience.com>.

Ce système permet d'augmenter le nombre de peroxydases (HRP) par anticorps de détection et de ce fait par antigène détecté. Un résidu de biotine est ainsi fixé à l'anticorps, lui-même couplé à plusieurs streptavidines, portant chacune une enzyme HRP (Figure 40). Ce système permet d'amplifier le signal spécifique sans augmenter le bruit de fond (signal non spécifique). Ce système a déjà été utilisé en milieu complexe lorsque la cible est présente en très faible proportion et semble tout à fait adapté à notre contexte (Raiko *et al.*, 2010; Addanki *et al.*, 2011).

## B. Discussion des résultats et perspectives



**Figure 41.** Schéma bilan des résultats des travaux réalisés sur la persistance du *Bti*. A gauche sont représentés les résultats des tests ELISA suite à une contamination de litières avec du *Bti* ainsi que les résultats des bioessais avec des toxines en contact avec la litière. En haut sont représentés les résultats des expériences sur la persistance des toxines du *Bti* en fonction du temps. En bas sont représentés les résultats de l'analyse des litières toxiques. Les pourcentages correspondent à la variation de la toxine parmi toutes les toxines (Cyt) ou seulement parmi les toxines Cry (Cry4 et Cry11) par rapport aux proportions retrouvées dans le *Bti* commercial.

Dans ce chapitre, nous avons démontré que le *Bti* ne doit plus être considéré comme un cristal cohésif mais comme un **complexe de plusieurs entités aux comportements très différents dans l'environnement** (Figure 41).

Peu de travaux ont été réalisés sur la toxine Cyt et son devenir dans l'environnement. Nos travaux montrent que sous forme de cristal, les toxines Cyt sont rapidement piégées dans la litière végétale entraînant une diminution de leur activité synergique sur les larves de moustiques. L'absence de résistance au *Bti* étant généralement attribuée à la présence de la toxine Cyt, son piégeage rapide peut entraîner une exposition des larves qui se nourrissent de litière végétale aux toxines Cry, connues pour induire des résistances en laboratoire (Georghiou et Wirth, 1997). Nous avons également démontré que les toxines sous forme de cristal avaient des persurances différentes en fonction du temps, les toxines Cry4Aa et Cry4Ba étant les plus persistantes. Afin de mieux comprendre le devenir de ces toxines dans l'environnement, un travail de caractérisation de la nature de l'interaction toxines-litière est nécessaire. Des travaux similaires doivent également être réalisés en utilisant différentes matrices environnementales issues de gîtes larvaires, tels que des sols.

Nos résultats supportent également le fait que **la toxicité des litières toxiques collectées sur le terrain est due à une remise en culture des spores de *Bti*** aboutissant à une production *in natura* de cristaux de toxines. Les toxines ont ensuite pu persister selon l'ordre de persistance que nous avons caractérisé (Cry4Aa/Cry4Ba > Cry11Aa > Cyt1Aa), comme montré par les proportions relatives des toxines dans les litières toxiques comparées au *Bti* commercial. Même si les échantillons environnementaux prélevés dans les régions Rhône-Alpes et Méditerranée se sont tous avérés négatifs en ELISA, il nous a semblé primordial de caractériser les conditions particulières qui sont susceptibles de permettre au *Bti* de se recycler et de rendre ces litières toxiques.

Dans ce but, des **mésocosmes**<sup>7</sup> ont été réalisés dans les locaux de l'EID Méditerranée afin de caractériser le devenir du *Bti* en fonction de différents paramètres (salinité, présence de matière organique, hauteur d'eau, présence de larves de moustiques). Les résultats des étalements microbiologiques montrent que ni la salinité, ni la hauteur d'eau n'ont d'influence sur le recyclage du *Bti*. La présence de matière organique favorise la persistance des spores et la présence de larves leur recyclage (données non publiées). Notre outil ELISA doit être appliqué sur ces échantillons afin de voir si, dans certaines combinaisons de paramètres, nous avons réussi à recréer les conditions permettant un recyclage des spores de *Bti* et une production de nouveaux cristaux. Ces résultats permettront de mieux comprendre les conditions dans lesquelles un recyclage du *Bti* est possible afin de mieux gérer les traitements au *Bti* en milieu naturel.

En effet, en populations naturelles, le recyclage couplé à la persistance différentielle des toxines, tel qu'observé dans le cas des litières toxiques, risque d'exposer les moustiques à un cocktail de toxines dépourvu de toxine Cyt, connue pour limiter l'apparition de résistances aux toxines Cry (Wirth *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2005). Exposées à des toxines Cry que l'on sait capables d'entraîner des résistances, les moustiques pourraient ainsi développer une résistance à ces toxines et par conséquent au *Bti*. Pour pouvoir détecter et prévenir l'apparition de telles résistances dans l'environnement, il est nécessaire de caractériser les mécanismes de résistance développés par les moustiques contre les toxines du *Bti*.

---

<sup>7</sup> Mésocosme : Dispositif expérimental clos, de taille moyenne, destiné aux études écologiques et dont les paramètres physico-chimiques sont contrôlés.

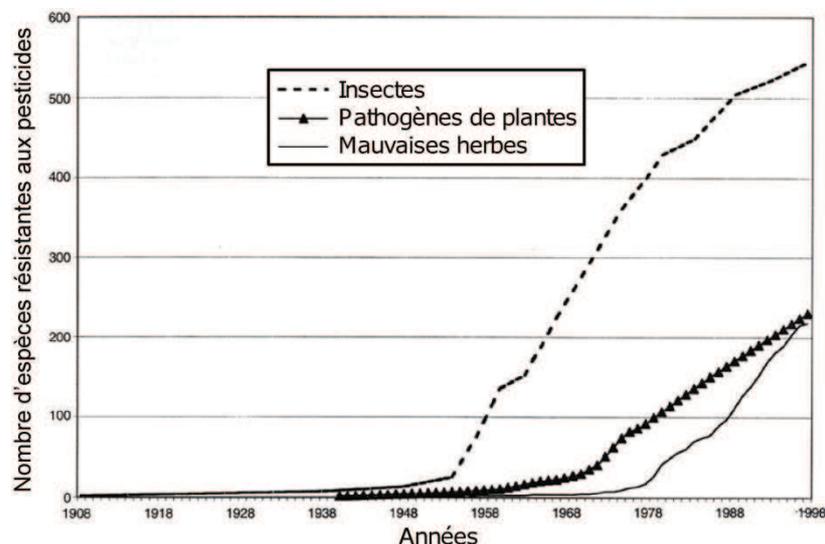
# Chapitre II :

## Caractérisation de la résistance au *Bti* chez le moustique en laboratoire

### I. Mieux comprendre les mécanismes de résistance pour mieux la gérer

#### A. Qu'est-ce que la résistance ?

La résistance à un pesticide se définit comme la capacité d'individus à survivre à des doses de pesticide létales pour des individus sensibles de la même espèce. En populations naturelles, la résistance se traduit par une incapacité récurrente des traitements pesticides à contrôler une population en respectant les doses opérationnelles conseillées pour cette espèce (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC). Ainsi, l'utilisation grandissante de pesticides au cours du XX<sup>ème</sup> siècle a conduit à une augmentation exponentielle du nombre d'espèces résistantes à travers le monde (Holt et Lebaron, 1990) (Figure 42).



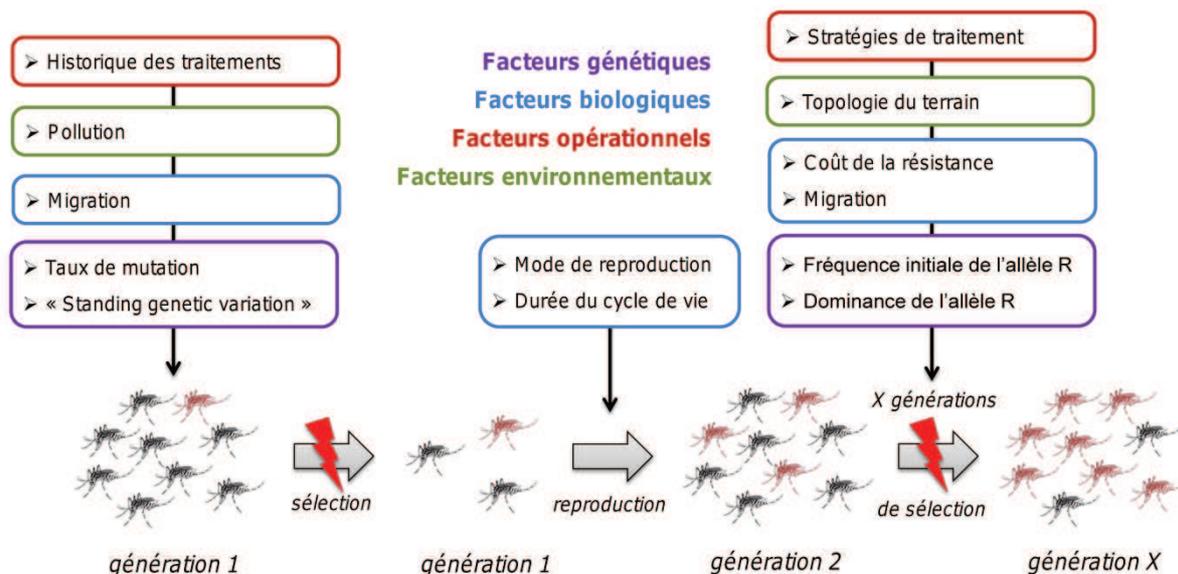
**Figure 42.** Nombre d'espèces d'insectes (ligne en pointillés), de pathogènes de plantes (triangles) et de mauvaises herbes (ligne simple) résistantes aux pesticides recensées entre 1908 et 1998. Adapté de (Holt et Lebaron, 1990).

Les conséquences de l'apparition de résistance sont multiples, notamment en termes de santé publique lorsque des vecteurs de maladies sont concernés, mais également au niveau économique lié à la nécessité d'utiliser des quantités plus importantes de pesticides ou de nouveaux pesticides plus coûteux pour contrôler efficacement les populations d'espèces nuisibles. Ainsi, il est nécessaire de comprendre quels facteurs favorisent le

développement de la résistance afin de pouvoir anticiper et limiter son apparition (Williamson *et al.*, 2003; Sivasupramaniam *et al.*, 2007).

## B. Facteurs influant sur l'apparition et la propagation de la résistance aux pesticides

Plusieurs facteurs participent à l'apparition de résistances et permettent leur dispersion au sein et entre les populations (Figure 43).



**Figure 43.** Paramètres susceptibles d'influer sur l'apparition et la propagation de la résistance à un pesticide (exemple du moustique). Les individus résistants sont colorés en rouge et les individus sensibles en noir. Les facteurs génétiques sont indiqués en violet, les facteurs biologiques en bleu, les facteurs environnementaux en vert et les facteurs opérationnels en rouge. L'allèle de résistance est appelé « allèle R » dans le cas d'une résistance monogénique. Le terme « standing genetic variation », traduit par « polymorphisme génétique initial » signifie que l'allèle de résistance est présent dans la population avant l'application du pesticide.

### 1. Facteurs influant sur l'apparition de la résistance

Deux modèles théoriques sont proposés pour expliquer l'apparition d'une résistance aux pesticides au niveau moléculaire dans une population (Nielsen, 2005; French-Constant, 2007) : l'apparition d'un allèle<sup>8</sup> de résistance par une nouvelle **mutation** ou la sélection d'un allèle de résistance déjà présent au sein de la population (« **polymorphisme génétique initial** »).

<sup>8</sup> Allèles : différentes versions d'un même gène.

**a) Apparition d'un allèle de résistance par une nouvelle mutation**

Lorsqu'une mutation apparaît dans une population de grande taille, elle est soumise à la **sélection naturelle** : soit la mutation est avantageuse et elle sera conservée (sélection directionnelle), soit elle est délétère et elle sera éliminée de la population (sélection purificatrice), soit elle est neutre (aucun impact sur la valeur sélective<sup>9</sup> de l'individu) et elle sera conservée, participant ainsi au polymorphisme génétique de la population.

Les mutations conférant une résistance à un pesticide sont très souvent délétères en l'absence du pesticide (*i.e.* valeur sélective plus faible qu'un individu sensible, entraînant une sélection purificatrice). En présence du pesticide, des **mutations** affectant un ou plusieurs gènes permettant à l'individu de devenir résistant seront sélectionnées (sélection directionnelle). Si la pression du pesticide perdure (facteur opérationnel), la mutation pourra s'implanter rapidement et durablement au sein de la population. La probabilité d'apparition et d'implantation d'un allèle de résistance dans une population est d'autant plus importante que l'espèce a un **cycle de vie** court (facteur biologique) et que son **taux de mutation** est élevé (facteur génétique). C'est le cas des bactéries, connues pour développer rapidement de forts niveaux de résistance aux antibiotiques, notamment grâce à leur temps de génération rapide (de quelques minutes à quelques heures) et leur taux de mutation élevé (Denamur et Matic, 2006). Le **degré de dominance** de l'allèle (facteur génétique) joue également un rôle important sur la vitesse d'implantation d'un allèle résistant (Raymond *et al.*, 2001). Dans le cas d'un allèle récessif, seuls les individus homozygotes résistants seront sélectionnés alors que dans le cas d'un allèle dominant, les individus hétérozygotes seront également favorisés, accélérant le processus de propagation de la résistance au sein de la population.

Alors que la sélection de caractères adaptatifs favorise des mutations sur plusieurs gènes différents ayant des effets additifs, la pression imposée par les pesticides tend à sélectionner un **nombre restreint d'allèles à effets majeurs** (Hemingway *et al.*, 2004). Les allèles de résistance ont été caractérisés pour de nombreux pesticides, notamment pour les insecticides chimiques chez le moustique (Brogdon et McAllister, 1998). Dans ce cas, les mutations ciblent généralement les gènes codant pour la protéine **cible de l'insecticide** (*e.g.* mutations *kdr* modifiant les canaux sodium auxquels se fixent les pyréthroïdes et le DDT) et/ou les **enzymes de détoxification** qui permettent de dégrader et/ou de séquestrer l'insecticide (*e.g.* augmentation de l'activité de cytochromes P450, glutathion S-transférases et/ou estérases) (Hemingway *et al.*, 2004).

<sup>9</sup> La valeur sélective d'un individu (=fitness) correspond au nombre de descendants viables et fertiles qu'il produira à la génération suivante.

Certaines classes d'insecticides chimiques ciblant les mêmes récepteurs, l'**historique des traitements** de la population (facteur opérationnel) peut avoir un impact sur le développement de résistance à un nouvel insecticide (Ferré *et al.*, 1995; Brogdon et McAllister, 1998). Ainsi, des populations traitées avec du DDT peuvent avoir développé une résistance, notamment grâce à la mutation *kdr* qui confèrera également une résistance aux pyréthroides, même si ces populations n'ont jamais été en contact avec ce type d'insecticide auparavant (Brogdon et McAllister, 1998; Matambo *et al.*, 2007). C'est ce que l'on appelle le phénomène de **résistance croisée**<sup>10</sup>. Afin de l'éviter, une stratégie de gestion de l'apparition de résistance consiste à utiliser des insecticides ayant des modes d'actions différents en alternance (**stratégie de rotation**) (Byford *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2010).

Il a également été démontré que l'exposition de populations de moustiques à des **polluants** au stade larvaire peut moduler les phénomènes de résistance/tolérance aux insecticides chimiques, notamment par l'augmentation des activités enzymatiques de détoxification (Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009; Poupardin *et al.*, 2012).

### ***b) Implantation de la résistance à partir du « polymorphisme génétique initial » de la population***

Cette théorie relativement récente propose que des mutations conférant une résistance puissent apparaître bien avant l'introduction du pesticide (Orr, 2005; Barrett et Schluter, 2008). Ces mutations, neutres ou faiblement délétères en l'absence du pesticide, seraient apparues et maintenues en faibles proportions dans la population grâce à un équilibre entre mutation, sélection et dérive génétique (Hermisson et Pennings, 2005; Przeworski *et al.*, 2005). Cette variabilité génétique cryptique « attendrait » que les conditions environnementales changent pour s'exprimer et faire apparaître un nouveau phénotype (Gibson et Dworkin, 2004). Cela suppose que ces allèles soient majoritairement récessifs, ne subissant qu'un faible effet de la sélection due à leur rareté dans la population en l'absence de pesticide (Haldane, 1927; Barrett et Schluter, 2008).

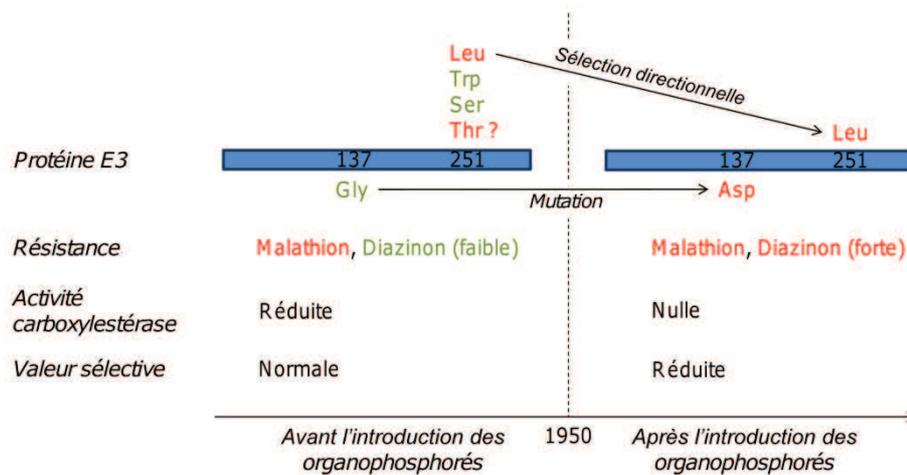
La vitesse d'implantation de l'allèle résistant est directement dépendante de sa **fréquence initiale** dans la population, du **nombre de copies** présentes au moment de l'introduction du pesticide et de l'intensité de la pression de sélection exercée (Hermisson et Pennings, 2005).

---

<sup>10</sup> On parle de résistance croisée entre deux insecticides lorsqu'une souche a été sélectionnée à un insecticide et montre une forte résistance à un autre insecticide auquel elle n'a jamais été sélectionnée.

### c) Des modèles non mutuellement exclusifs

Comparée à de nouvelles mutations, la sélection à partir d'allèles préexistants permet aux populations d'évoluer rapidement, fixant de nombreux allèles récessifs aux effets additifs, mais n'entraînant que des niveaux de résistance modérés. A l'inverse, la sélection à partir de nouvelles mutations, fortement dépendante du taux de mutation de l'espèce considérée, sera plus longue à se mettre en place mais permettra d'atteindre des niveaux de résistances très élevés, malgré les coûts souvent importants sur la valeur sélective des individus en l'absence du pesticide. Ces deux modèles, pourtant souvent opposés dans la littérature, peuvent se combiner afin de permettre à une population de s'adapter rapidement et durablement à une pression pesticide constante (ffrench-Constant, 2007) (Figure 44).



**Figure 44.** Apparition et sélection des mutations conférant une résistance au malathion et au diazinon chez *Lucilia* spp. avant et après l'introduction des organophosphorés. La position des mutations de l'estérase E3 ainsi que leur effet sur les activités carboxylestérase et la valeur sélective sont indiqués. Adapté de (ffrench-Constant, 2007).

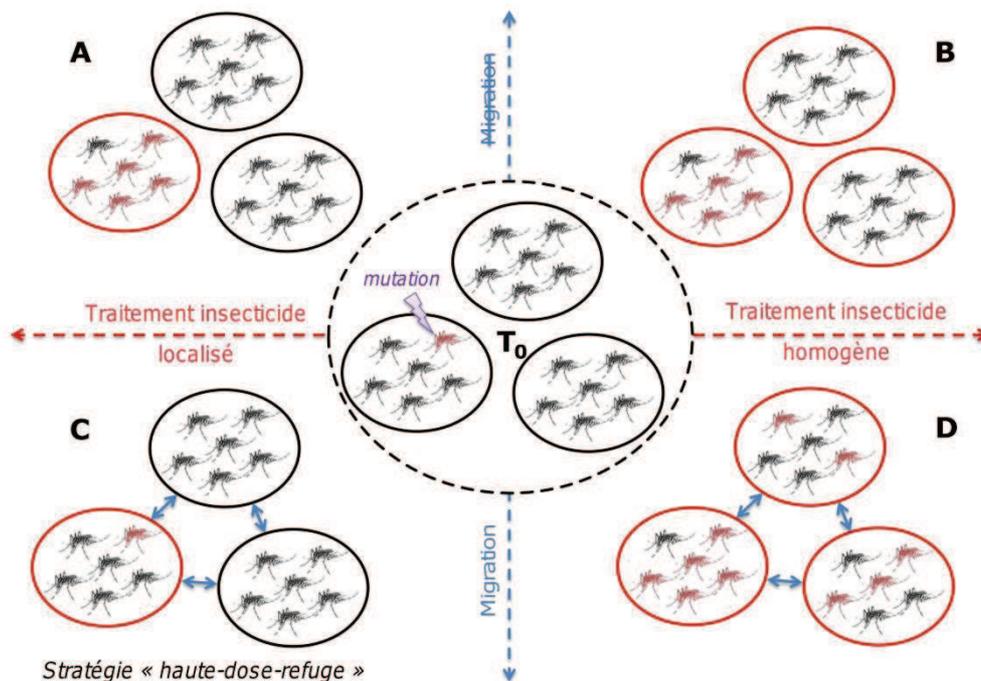
Prenons l'exemple de la mouche bouchère du genre *Lucilia* (Figure 44). Avant l'introduction des organophosphorés pour la lutte contre ces mouches, environ 19% des individus de *L. cuprina* possédaient déjà les mutations conférant une résistance au malathion (Hartley *et al.*, 2006). L'introduction des organophosphorés a appliqué une sélection directionnelle sur l'allèle préexistant le plus efficace, lui permettant de s'implanter rapidement dans les populations devenant résistantes au malathion (ffrench-Constant, 2007). A l'inverse, aucune mutation conférant de résistance au Diazinon n'avait été décelée sur des individus de *L. cuprina* et *L. sericata* avant l'introduction des organophosphorés (Hartley *et al.*, 2006). Il semble qu'une nouvelle mutation soit à l'origine de l'apparition de la résistance au Diazon, s'accompagnant d'une diminution de la valeur sélective des individus (Newcomb *et al.*, 2005; ffrench-Constant, 2007).

Cet exemple illustre bien la complexité des phénomènes aboutissant à l'apparition de résistances dans les populations exposées aux pesticides, combinant la variabilité génétique initiale de l'espèce avec sa capacité à muter et générer de nouveaux allèles de résistance plus performants.

## 2. Propagation de la résistance entre populations : le rôle complexe de la migration

Si les mécanismes à l'origine de l'apparition de phénomènes de résistance au sein d'une population sont complexes, ceux qui conditionnent sa propagation entre les populations le sont tout autant. La **migration** entre les populations (facteur biologique) est un paramètre à double facette. Pour comprendre son rôle dans la propagation de la résistance, il est nécessaire de prendre en considération l'**espèce** à traiter (facteur biologique), la **topologie du terrain** (facteur environnemental) et surtout la **stratégie de traitement** (facteur opérationnel).

En biologie des populations, la migration est un facteur d'homogénéisation, favorisant les échanges de gènes entre des populations proches. Dans le cas d'une pression insecticide, le rôle de la migration varie selon que le traitement touche seulement une population ou touche l'intégralité des populations susceptibles de migrer entre elles (Figure 45).



**Figure 45.** Influence de la migration et du traitement insecticide sur la propagation et l'implantation de la résistance entre plusieurs populations d'une même espèce (ici de moustique). Les individus résistants sont colorés en rouge et les individus sensibles en noir. Les populations traitées sont cerclées de rouge et les populations non traitées cerclées de noir.

Si l'espèce considérée est peu migratrice ou si le milieu de vie empêche les populations de communiquer entre elles, on observera le même phénomène, que le traitement insecticide cible toutes les populations ou non : la résistance, apparue au temps initial ( $T_0$ ), se propagera au sein de la population mais n'atteindra pas les autres populations (Figure 45A,B). Ce phénomène peut arriver lorsque les populations sont isolées par des barrières naturelles telles qu'une étendue maritime (Chevillon *et al.*, 1995; Kayondo *et al.*, 2005).

Si l'espèce peut migrer facilement entre plusieurs populations proches (*e.g.* espèce migratrice, présence de corridors écologiques, déplacements par l'homme), deux cas de figures se présentent :

Soit le **traitement pesticide est homogène**, c'est-à-dire que l'intégralité des populations en interaction sont traitées (Figure 45D). Dans ce cas, s'il y a apparition d'un allèle de résistance dans une population, les individus porteurs de la mutation seront avantagés : si un individu résistant migre vers une autre population, sa valeur sélective élevée lui permettra de s'implanter et favorisera ainsi une propagation rapide de la résistance. Pour éviter ce phénomène, on peut utiliser des insecticides aux modes d'action différents entre les populations adjacentes (**stratégie en mosaïque**). Cela permet de contrôler l'intégralité des populations connectées tout en limitant la probabilité de propagation des résistances, théoriquement différentes pour les insecticides utilisés (Byford *et al.*, 1999).

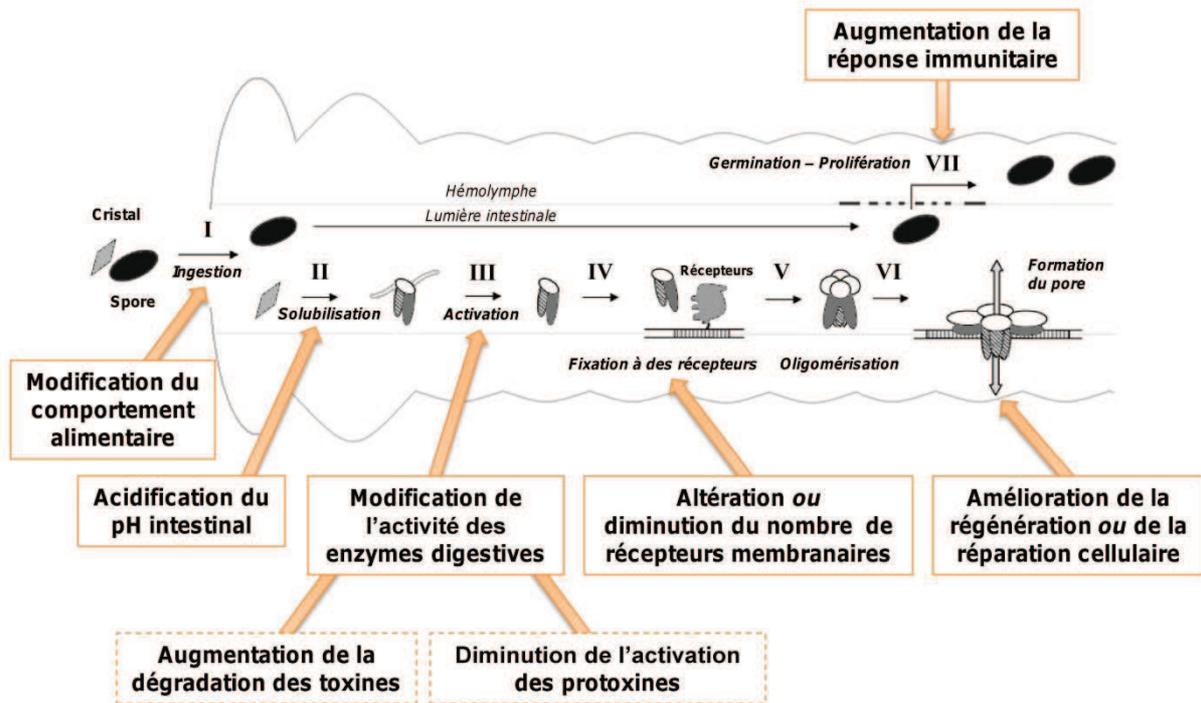
Soit le **traitement pesticide est localisé**, c'est-à-dire que seules certaines populations sont traitées, laissant quelques populations adjacentes non traitées (Figure 45C). Dans ce cas, la migration a le rôle inverse : les individus porteurs de la résistance, généralement moins compétitifs que les individus sensibles en l'absence d'insecticide, n'arriveront pas à s'implanter dans les populations non traitées, limitant ainsi la propagation de la résistance. Le phénomène est d'autant plus intéressant que les individus sensibles pourront migrer vers les zones traitées, permettant de diluer la résistance et d'en ralentir l'implantation. C'est ce que l'on appelle la **stratégie « haute-dose-refuge »** qui permet de limiter très efficacement la propagation d'une résistance (Lenormand et Raymond, 1998; Tabashnik, 2008; Tabashnik et Carriere, 2009; Carriere *et al.*, 2012).

En conclusion :

**Les cas de résistance aux pesticides ont connu une augmentation exponentielle depuis le siècle dernier, notamment chez les insectes. L'apparition de résistance peut être la conséquence de nouvelles mutations ou de la sélection d'allèles existants au sein de la population. Leur propagation est dépendante de plusieurs facteurs, intrinsèques à l'espèce traitée (biologiques et génétiques), à son environnement et aux modalités de traitement avec le pesticide. La connaissance de ces facteurs permet d'établir des stratégies adaptées pour prévenir l'apparition de la résistance en populations naturelles.**

## **II. Résistance au *Bacillus thuringiensis***

Aucun mécanisme de résistance aux toxines du *Bti* n'a encore été décrit et validé chez les moustiques et les mouches noires. Néanmoins, de nombreux mécanismes ont déjà été décrits chez les Lépidoptères, les Coléoptères et même chez les Nématodes (Heckel *et al.*, 2007; Bravo et Soberon, 2008). Nous avons vu précédemment que le mode d'action des toxines Cry de *Bacillus thuringiensis* était composé de plusieurs étapes, allant de l'ingestion par la larve à son infection. La résistance au *Bt* peut être développée en agissant à chacune de ces étapes (Figure 46). Les paragraphes suivants résument les connaissances actuelles sur les mécanismes de résistance les mieux caractérisés à ce jour.



**Figure 46.** Mécanismes potentiels de résistance aux toxines Cry de *Bacillus thuringiensis* en relation avec leur mode d'action. Source des pictogrammes : (Bravo *et al.*, 2007).

#### A. Modification des récepteurs membranaires (Figure 46, étape IV)

La modification des récepteurs membranaires intestinaux aux toxines Cry est le mécanisme le plus étudié, permettant d'atteindre des niveaux de résistance très élevés (Pigott et Ellar, 2007; Bravo et Soberon, 2008). Les **cadhérines** sont des récepteurs clé pour de nombreuses toxines et ont pour la première fois été impliquées dans la résistance à Cry1Ac chez une souche d'*Heliothis virescens* (YHD2, 10.000 fois résistante) (Gahan *et al.*, 2001). Depuis, des mutations non-synonymes<sup>11</sup> dans la séquence de cadhérines induisant des résistances aux toxines Cry1A ont été décrites chez plusieurs Lépidoptères : *H. armigera* (Xu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007), *Ostrinia nubilalis* (Bel *et al.*, 2009) et *Pectinophora gossypiella* (Morin *et al.*, 2003; Tabashnik *et al.*, 2006). Il a également été démontré que la sous-expression d'un gène codant pour une cadhérine est liée de la résistance à Cry1Ab chez *Diatraea saccharalis* (Yang *et al.*, 2011). Même si l'altération de cadhérines semble induire de fortes résistances au *Bt*, elles ne suffisent pas forcément à expliquer la totalité de la résistance observée chez ces souches. Ainsi, une altération de **phosphatases alcalines** est également à l'origine d'une partie de la résistance à Cry1Ac chez la souche YHD2 (Jurat-Fuentes et Adang, 2004; Jurat-Fuentes et Adang, 2006) ainsi que chez *H. armigera* and *S. frugiperda* (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). La sous-expression

<sup>11</sup> Une mutation non-synonyme dans la séquence d'ADN induit une modification de la séquence d'acides aminés de la protéine, pouvant modifier sa structure tridimensionnelle et sa fonction.

d'**aminopeptidases N** (APN) a également été reliée à la résistance à Cry1Ca chez *S. exigua* (Herrero *et al.*, 2005) alors que c'est une mutation non-synonyme d'un gène codant pour une APN qui est à l'origine de la résistance à Cry1Ac chez *H. armigera* (Zhang *et al.*, 2009). Enfin, la modification d'un récepteur **glycolipidique** est responsable de la résistance à Cry5B chez une souche de nématode *C. elegans* (Griffitts *et al.*, 2001; Griffitts *et al.*, 2005).

Certaines toxines peuvent partager des récepteurs membranaires, entraînant des phénomènes de **résistance croisée** entre les toxines. Ainsi, une souche d'*H. virescens* (YHD2) et deux de *P. glossipiella*, sélectionnées et résistantes à Cry1Ac, ont toutes montré une résistance croisée à Cry1Aa et Cry1Ab (entre 500 et 10.000 fois), due à un récepteur membranaire commun aux trois toxines (Gould *et al.*, 1995; Tabashnik *et al.*, 2000; Tabashnik *et al.*, 2002). Cependant, ce phénomène peut fortement varier selon les toxines, les espèces, voire même les souches sélectionnées pour une même espèce (Ferré *et al.*, 1995; Griffitts et Aroian, 2005). Ainsi, la résistance par mutation de cible induit souvent des résistances élevées pour un nombre restreint de toxines (Griffitts et Aroian, 2005). Pourtant, d'autres cas de résistances croisées ont montré des résistances modérées à spectre large, entre les toxines Cry1A, Cry1C, Cry1D et Cry2Aa chez *H. virescens* (souche CP73-3) et *P. interpunctella* (souche 198<sup>f</sup>) (Gould *et al.*, 1992; McGaughey et Johnson, 1994). Cela suppose que des mécanismes de résistance plus généralistes peuvent compléter les résistances par mutation de récepteurs.

## **B. Modification des activités enzymatiques intestinales (Figure 46, étape III)**

La diminution de l'activité des protéases à sérine, due à l'absence d'une enzyme digestive intestinale, induisant une **diminution de l'activation des protoxines en toxines**, est en partie responsable de la résistance généraliste observée chez la souche 198<sup>f</sup> (Oppert *et al.*, 1994; Oppert *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2001). Deux souches résistantes d'*H. virescens* (YHD2 et CP73-3) montrent également une altération de leurs activités protéolytiques (Forcada *et al.*, 1996; Karumbaiah *et al.*, 2007). Cela suggère qu'une même protéase est capable d'activer des toxines Cry très différentes (Oppert *et al.*, 1997). Les protéases intestinales ayant un rôle majeur dans la digestion des aliments, une altération trop importante de l'expression ou de la nature de certaines d'entre elles pourrait être coûteuse ou même létale pour la larve. C'est probablement pour cela que la modification de leur activité n'est jamais corrélée à des niveaux de résistance très élevés (Oppert *et al.*, 1997; Griffitts et Aroian, 2005).

La précision du clivage des protoxines est essentielle à leur toxicité (Bravo *et al.*, 2002). Ainsi, la résistance modérée (72 fois) à Cry1Ac d'une souche d'*H. armigera* serait liée à un **défaut de clivage** des 28 premiers acides aminés de la région N-terminale de la toxine dû à la sous-expression du gène HaSP2 codant pour une protéase à sérine impliquée dans l'activation de la protoxine (Rajagopal *et al.*, 2009). Ce défaut de clivage peut ainsi entraîner une diminution de son affinité pour ses récepteurs membranaires (Bravo *et al.*, 2002).

Enfin, les enzymes digestives peuvent également induire une résistance en **dégradant les toxines** après leur activation, tel qu'il a été démontré chez deux souches d'*H. virescens* et une souche de *Choristoneura fumiferana* résistantes à Cry1Ab et Cry1Aa respectivement (Forcada *et al.*, 1996; Bah *et al.*, 2004).

### C. Autres mécanismes pouvant contribuer à la résistance

De nombreux mécanismes de résistance complémentaires ont été décrits. Ainsi, la résistance à Cry1Ac est en partie liée à une augmentation de la **régénération des cellules intestinales** chez *H. virescens* (Castagnola et Jurat-Fuentes, 2009) (Figure 46, étape VI) alors que c'est la surexpression d'estérases intestinales, capables de **séquestrer la toxine**, qui induirait une résistance plus élevée chez *H. armigera* (Gunning *et al.*, 2005). Une production accrue de **protéines coagulantes** (hexamérines et lipophorines), capables de s'agréger autour de pathogènes et de toxines, a également été décrite chez des souches de *Ephestia kuehniella* et *H. armigera* résistantes à Cry1Ac (Rahman *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2007). Le rôle du **système immunitaire** est également soupçonné (Figure 46, étape VII). Ainsi, l'inhibition de peptides antimicrobiens, tels que les glovérines, peut entraîner une sensibilité accrue de larves de Lépidoptères au *Bt* (Kwon et Kim, 2007; Kwon et Kim, 2008; Hwang et Kim, 2011).

Enfin, la **modification du comportement alimentaire** des larves peut potentiellement jouer un rôle dans la tolérance au *Bt* (Figure 46, étape I), même si cela n'a encore jamais été démontré (Stoops et Adler, 2006). De même, une **acidification du pH intestinal** des larves (Figure 46, étape II) pourrait affecter l'ensemble des toxines Cry en diminuant la solubilisation de leur cristal (Lacey, 2007) mais également en affectant les activités des enzymes intestinales (Karumbaiah *et al.*, 2007), la conformation des toxines (Venugopal *et al.*, 1992; Feng et Becktel, 1994) et la formation de pores dans la paroi intestinale (Tran *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2005). Même si une altération du pH intestinal a été mesurée chez deux souches résistantes d'*H. virescens* (KCBhyb et YHD2-B), leur implication dans la résistance n'a pas été clairement démontrée (Karumbaiah *et al.*, 2007).

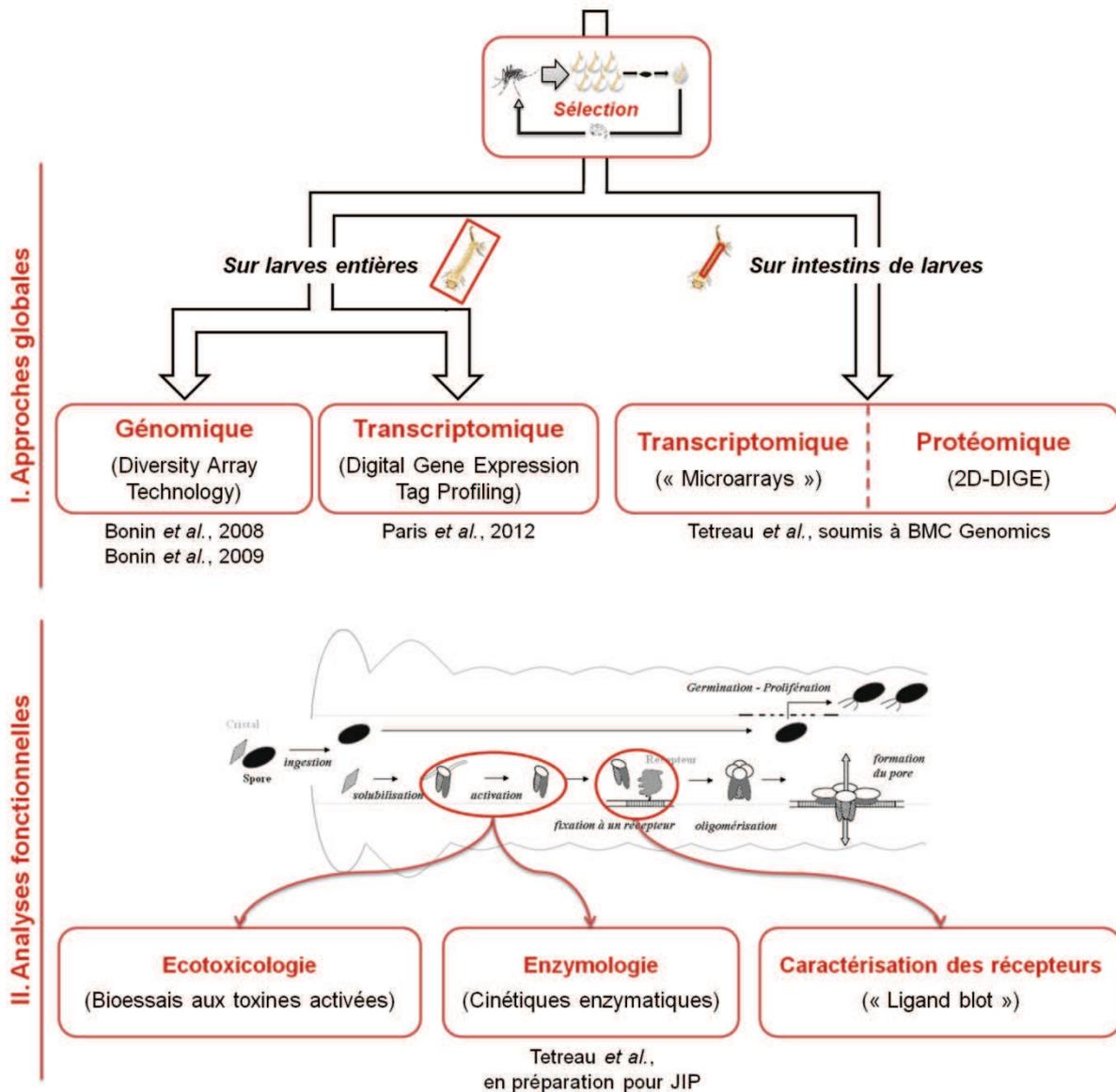
En conclusion :

Chaque étape du mode d'action des toxines Cry est susceptible de porter un ou plusieurs mécanismes de résistance, dont certains ont été décrits chez de nombreuses larves de Lépidoptères et de Coléoptères. Les forts niveaux de résistance aux toxines Cry s'expliquent généralement par des mutations au niveau des récepteurs membranaires tandis que l'altération des activités protéolytiques est le plus souvent impliquée dans des cas de résistance modérée à large spectre.

### III. Caractérisation de la résistance au *Bti* chez les moustiques

Durant ce chapitre, je présenterai les différentes étapes, développées en amont et au cours de cette thèse au LECA, ayant permis la sélection de la résistance au *Bti* jusqu'à sa caractérisation par différentes approches globales puis ciblées sur certaines étapes et fonctions potentiellement impliquées dans la résistance (Figure 47).

Caractérisation des mécanismes de résistance au *Bti* chez le moustique *Aedes aegypti*



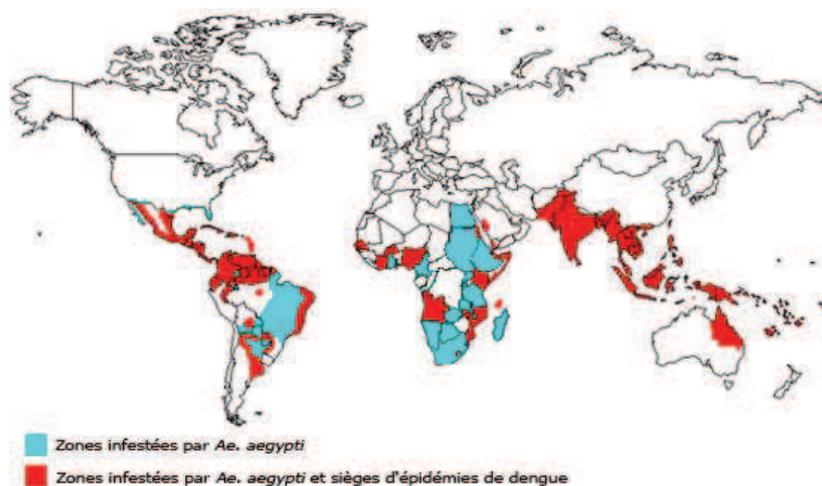
**Figure 47.** Plan schématique de la démarche expérimentale du chapitre II. La recherche des mécanismes de résistance au *Bti* chez la souche LiTOX a donné lieu à trois articles publiés sur des approches globales réalisées sur larves entières : deux par une approche génomique (Bonin *et al.*, 2008; Bonin *et al.*, 2009) et une en transcriptomique (Paris *et al.*, 2012). Un article ciblant les transcrits et protéines intestinaux a été publié dans BMC Genomics (Tetreau *et al.*, 2012a). Enfin, l'article traitant de la caractérisation des activités protéolytiques des larves LiTOX et sensible est en préparation pour le Journal of Invertebrate Pathology (Tetreau *et al.*, Soumis à JIP).

## A. Du choix du modèle à la sélection de la résistance

### 1. Le moustique : un modèle de choix

Afin d'étudier la résistance au *Bti*, nous avons choisi d'utiliser une espèce modèle de moustique : *Aedes aegypti* (Severson *et al.*, 2004). Comme nous l'avons présenté en introduction, le moustique *Ae. aegypti* a un fort impact économique et sanitaire, étant vecteur de la dengue, de la fièvre jaune et du chikungunya (Tomori, 2004; Kyle et Harris, 2008;

Schwartz et Albert, 2010). Le moustique *Ae. aegypti* est largement présent dans l'hémisphère sud, dans des régions tropicales et équatoriales où sévit notamment la dengue (Figure 48). Il est très souvent rencontré en milieux urbains ou péri-urbains où la distribution des gîtes larvaires est souvent compatible avec l'utilisation du *Bti* comme moyen de lutte (Mulla *et al.*, 2004; de Araujo *et al.*, 2007; de Melo-Santos *et al.*, 2009).



**Figure 48.** Carte de répartition mondiale du moustique *Aedes aegypti* (bleu et rouge) ainsi que de la dengue (rouge). Adapté de (Malavige *et al.*, 2004), source de la carte : <http://www.cdc.gov>

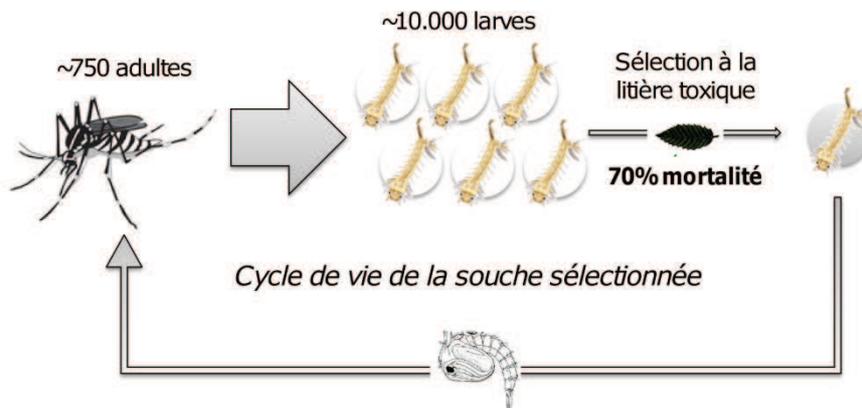
Etant une des espèces d'arthropodes les plus étudiées, elle a fait l'objet de nombreuses études aboutissant à d'importantes ressources génétiques disponibles. Ainsi, son **génomme a été entièrement séquencé** (Nene *et al.*, 2007) et la séquence consensus est accessible gratuitement sur plusieurs bases de données (Vectorbase, NCBI, etc.) avec ceux d'autres espèces de moustiques tels que *Anopheles gambiae* ou *Culex quinquefasciatus* (Holt *et al.*, 2002; Arensburger *et al.*, 2010).

Le moustique *Ae. aegypti* est également **facile à élever en laboratoire**, capable de réaliser un cycle complet en un mois et demi à deux mois, permettant d'atteindre jusqu'à 7 générations de sélection par an. De plus, ses œufs peuvent être séchés et conservés pendant plusieurs mois, permettant de contrôler efficacement les mises en eau et le nombre de larves nécessaires. Les adultes et les larves sont maintenues en conditions standardisées à une température de 27°C, une hygrométrie de 70-80% et un cycle jour/nuit de 14h/10h. Les larves sont nourries avec de la nourriture pour lapin (foin compacté) et les adultes avec du miel (mâles et femelles). Les repas de sang sont réalisés à l'aide de souris une à deux fois par semaine. Lors de ma thèse, j'ai rédigé un **manuel d'élevage de moustiques du genre Aedes en laboratoire** qui centralise l'ensemble des informations et astuces issues de ma propre expérience et de celle de mes collègues afin de faciliter l'élevage de cette espèce et d'obtenir des données de qualité lors des expérimentations (Annexe II).

## 2. Sélection de la résistance au *Bti* : la souche LiTOX

### a) Protocole de sélection avec la litière toxique

Des moustiques de laboratoire appartenant à l'espèce *Ae. aegypti*, souche Bora-Bora sensible à tous les insecticides connus, ont été sélectionnés à l'aide de la litière végétale contenant des toxines de *Bti* (litière toxique). L'objectif de cette expérimentation est de savoir si la sélection de larves de moustiques à chaque génération avec du *Bti* sous sa forme persistante dans l'environnement peut entraîner une résistance. Cela permettra de caractériser les mécanismes de résistance développés par le moustique pour pouvoir, à plus long terme, détecter et prévenir leur apparition en milieu naturel. La caractérisation de la souche résistante, nommée LiTOX, ainsi que le protocole de sélection ont été décrits dans un article publié dans le journal *Pest Management Science* (Paris *et al.*, 2011b) (Article III).



**Figure 49.** Cycle de vie et sélection de la résistance de la souche LiTOX

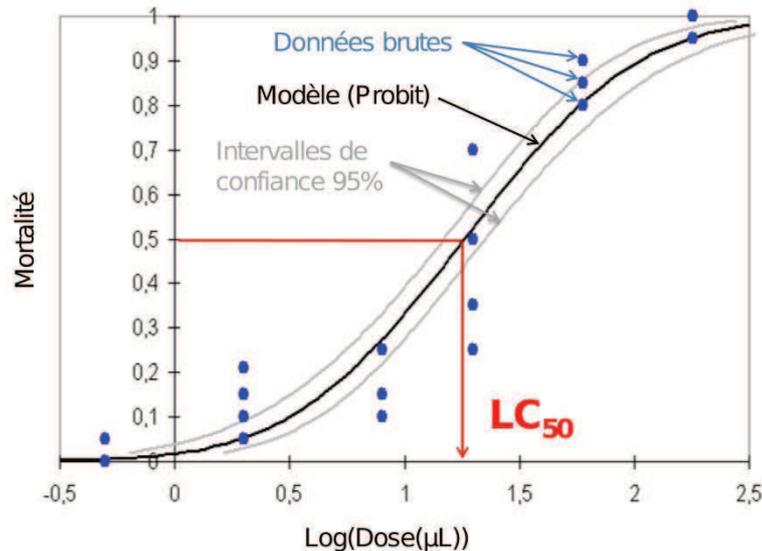
A chaque sélection, environ 10.000 larves de stade 3 sont exposées à une litière finement broyée d'Aulne contenant des toxines rémanentes de *Bti* (Aul1) jusqu'à obtenir environ 70% de mortalité. Les larves survivantes sont remises dans de l'eau dépourvue d'agent sélectif jusqu'au stade nymphal et l'émergence des adultes. Les adultes sont mis en cages afin qu'ils se reproduisent, les œufs étant stockés dans l'attente d'une nouvelle génération de sélection ou d'expérimentations.

### b) Mesure de l'évolution de la résistance

#### (1) Méthode de mesure de la résistance

Afin de suivre l'évolution de la résistance de la souche LiTOX, des **bioessais** sont réalisés. Lors de ces tests toxicologiques, on compare la sensibilité à la litière toxique (ou aux toxines du *Bti*) des larves de la souche résistante (LiTOX) à celle des larves de la souche sensible (souche parentale). Des lots de 20 larves sont déposés dans des gobelets

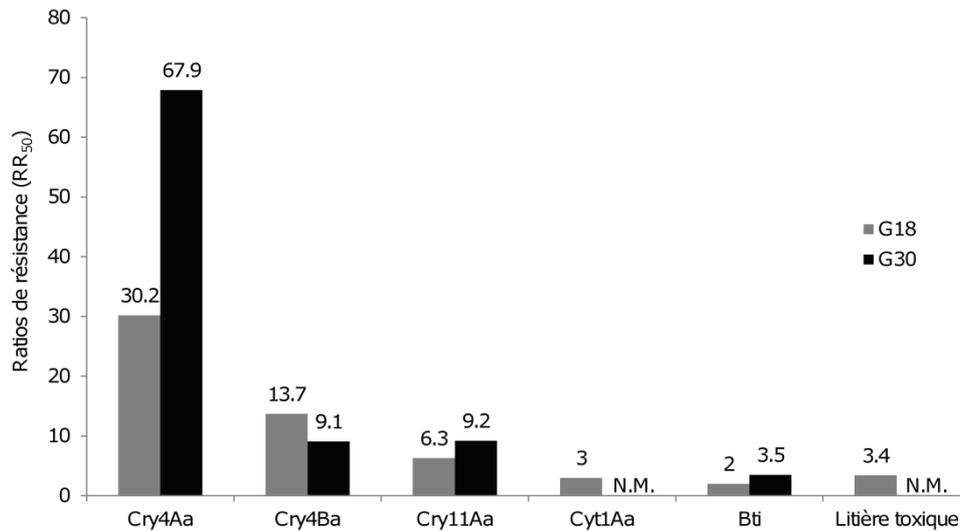
contenant 50 mL d'eau du robinet, tel que recommandé par l'OMS (OMS, 2005). Afin de comparer les deux souches, nous calculons les  $LC_{50}$ , c'est-à-dire les concentrations d'insecticide nécessaires pour tuer 50% des individus (Figure 50). Pour cela, au moins six doses sont choisies pour induire entre 5% et 95% de mortalité chez chaque souche. Chaque dose est réalisée au moins en triplicat. Les données de mortalité sont ensuite analysées à l'aide du module 'dose' du logiciel XLSTAT v.2009.4.06 (Addinsoft). Le protocole suivi est détaillé dans l'Annexe II.



**Figure 50.** Courbe sigmoïdale de la mortalité en fonction du logarithme décimal de la dose d'insecticide, caractéristique de données de bioessais, obtenue avec le module 'Dose' du logiciel XLSTAT.

## (2) Evolution de la résistance chez la souche LiTOX

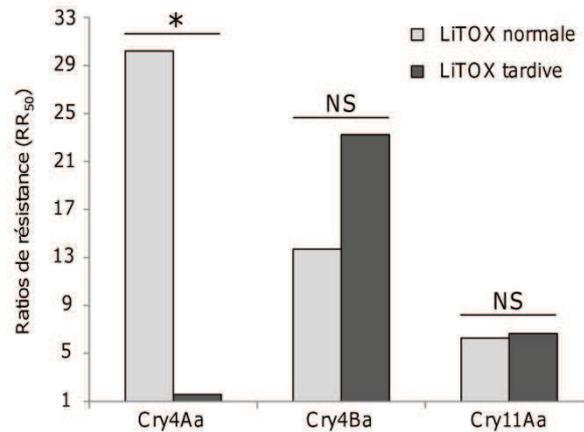
La résistance de la souche LiTOX a été mesurée au *Bti* ainsi qu'aux toxines testées séparément à la génération 18 ainsi qu'à la génération 30 (Paris *et al.*, 2011b; Tetreau *et al.*, 2012a) (Figure 51). Les rapports de résistance ( $RR_{50}$ ) correspondent à la  $LC_{50}$  de la souche LiTOX divisée par la  $LC_{50}$  de la souche sensible.



**Figure 51.** Rapports de résistance (RR<sub>50</sub>) de la souche LiTOX comparée à la souche sensible à la génération 18 (gris) et 30 (noir) pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa, le *Bti* commercial (Vectobac WG) et la litière toxiques d'Aulne Aul1. Les toxines non testées à la génération 30 sont indiquées par « N.M. » (non mesuré). D'après des données issues de (Paris *et al.*, 2011b; Tetreau *et al.*, 2012a).

A la génération 18, la résistance de la souche LiTOX à la litière toxique avait également été mesurée (3,4 fois). On remarque qu'elle était plus importante qu'au *Bti* (2 fois). Cette différence est probablement due à la forte diminution dans la litière toxique de la quantité de toxine Cyt1Aa, connue pour être un puissant synergiste des toxines Cry (Fernandez-Luna *et al.*, 2010b). Ce résultat est corroboré par une faible résistance à la toxine Cyt1Aa. Alors que la résistance reste globalement stable pour les toxines Cry4Ba et Cry11Aa entre la génération 18 et 30, on observe une augmentation de la résistance au *Bti* commercial (Vectobac WG) et à Cry4Aa. Ces résultats sont cohérents avec la persistance plus importante des toxines Cry4 dans la litière toxique mesurée à l'aide du test ELISA. Des anticorps spécifiques de chacune des toxines Cry4 permettraient de s'assurer que c'est effectivement la toxine Cry4Aa qui persiste plus longtemps que la toxine Cry4Ba, expliquant cette différence de résistance de la souche LiTOX vis à vis des deux toxines.

En étudiant la cinétique d'émergence des adultes de la souche LiTOX à la génération 18, deux cohortes de femelles LiTOX ont été décrites : une cohorte (LiTOX « tardives », représentant environ 25% du total de femelles) émergeant 5 jours après les autres femelles de la souche LiTOX « normales » et celles de la souche sensible (Paris *et al.*, 2011b). La résistance des deux cohortes à chacune des toxines Cry a été mesurée (Figure 52).



**Figure 52.** Rapports de résistance (RR<sub>50</sub>) de la souche LiTOX normale (gris clair) et LiTOX tardive (gris foncé) comparées à la souche sensible à la génération 18 pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa. Les différences sont considérées comme significatives (\*) lorsque les intervalles de confiance à 95% des rapports de résistance ne se chevauchent pas entre les deux cohortes. NS : Non significatif. Adapté de (Paris *et al.*, 2011b).

Les deux cohortes présentent des niveaux de résistance identiques pour les toxines Cry4Ba et Cry11Aa tandis que la cohorte tardive n'est pas du tout résistante à la toxine Cry4Aa. Ces résultats semblent indiquer que la **résistance est multigénique**, impliquant au moins deux mécanismes différents, non partagés entre les toxines Cry4Ba & Cry11Aa et la toxine Cry4Aa. De plus, on remarque qu'un **coût de la résistance** (retard de développement) est porté par des femelles de la cohorte montrant le moins de résistances (2 toxines contre 3 pour les LiTOX normales). Cela suppose que le(s) mécanisme(s) de résistance développé(s) par les LiTOX tardives sont plus coûteux et moins efficaces que ceux développés par les LiTOX normales, les LiTOX tardives étant probablement homozygotes à un allèle récessif pléiotrope<sup>12</sup> pour le développement. Cela va dans le sens d'une sélection d'allèles ayant moins d'effets pléiotropes délétères au sein de la souche LiTOX, permettant une plus forte résistance avec un coût moins important sur leur valeur sélective. Ce phénomène a déjà été caractérisé chez de nombreuses espèces, notamment chez des souches de moustique *Culex pipiens* résistantes aux insecticides chimiques (Guillemaud *et al.*, 1998; Labbe *et al.*, 2009). Parce qu'il aurait été trop difficile et trop coûteux de réaliser toutes les expérimentations sur les deux cohortes, nous avons choisi de nous concentrer uniquement sur la cohorte au développement normal, présentant la résistance la plus importante à Cry4Aa.

## B. Etude de la résistance chez la souche LiTOX

Pour étudier les bases génétiques d'une adaptation telle que l'apparition de résistance, deux approches différentes peuvent être envisagées, allant du phénotype au

<sup>12</sup> Un gène a un effet pléiotrope lorsqu'il détermine plusieurs caractères phénotypiques.

génotype (« **top-down** ») ou du génotype au phénotype (« **bottom-up** ») (Wright et Gaut, 2005; Ross-Ibarra *et al.*, 2007; Tenaillon et Tiffin, 2008; Stapley *et al.*, 2010).

La première approche est traditionnellement favorisée lorsque l'implication de certains gènes dans l'adaptation évolutive d'une espèce est suspectée (Tenaillon et Tiffin, 2008). Elle est également appelée **approche « gènes candidats »**. Permettant une étude ciblée et détaillée d'un nombre restreint de gènes d'intérêt, elle a été largement utilisée dans l'étude de la résistance aux insecticides chimiques chez le moustique (Marcombe *et al.*, 2009; Riaz *et al.*, 2009) ou aux toxines Cry chez les Lépidoptères (Zhu *et al.*, 2000; Bel *et al.*, 2009) dont les modes d'action et les cibles sont bien caractérisés. Comme nous l'avons vu, le *Bti* est constitué de plusieurs toxines Cry et Cyt aux modes d'actions et aux cibles différents. La multiplicité des familles de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX limite donc l'application de cette approche.

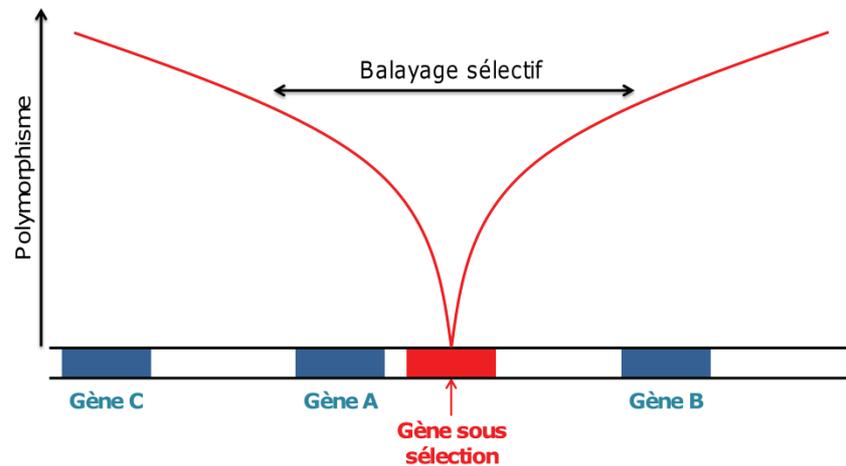
## 1. Etudier la résistance par des approches globales

Les **approches globales** permettent d'étudier l'ensemble du génome, transcriptome et/ou protéome afin de chercher le ou les gène(s)/protéine(s) potentiellement impliqué(s) dans la résistance sans *a priori*.

### a) *Etude de la résistance au niveau génomique*

#### (1) L'approche par « scans génomiques »

Les scans génomiques permettent de comparer deux populations (e.g. résistante et sensible à un insecticide) et d'identifier des régions de leur génome qui subissent l'effet de la sélection naturelle. Lorsqu'une région du génome est soumise à la sélection naturelle, notamment une sélection directionnelle favorisant un gène particulier, on va observer une baisse de la variabilité nucléotidique dans ce gène mais également dans les régions flanquantes de ce gène. C'est ce que l'on appelle un **balayage sélectif** (Figure 53).



**Figure 53.** Représentation théorique des variations du polymorphisme génétique en fonction de la distance au gène sous sélection directionnelle. Ainsi, le gène A possèdera une diversité allélique plus faible que le gène B ; le gène C possède une diversité allélique identique à celle attendue sans effet de la sélection naturelle (modèle neutre). Adapté de (Barrett et Schluter, 2008).

Les scans génomiques sont basées sur l'utilisation de marqueurs génétiques<sup>13</sup> répartis sur l'ensemble du génome permettant de repérer ceux qui possèdent une signature de sélection, c'est-à-dire dont le polymorphisme est anormalement plus faible par rapport à un locus non soumis à la sélection naturelle dans la souche sélectionnée. Ces marqueurs présentent une différenciation génétique (mesurée par le *Fst*, indice de différenciation entre deux populations) entre la souche sensible et la souche résistante significativement plus élevée que tous les autres marqueurs neutres. Ces marqueurs potentiellement soumis à la sélection sont appelés des **marqueurs « outliers »**.

Les scans génomiques ont été initialement développés et utilisés pour répondre aux questions de dynamique des populations. Dans ce contexte, les **marqueurs microsatellites**<sup>14</sup> ont été largement utilisés, étant multialléliques et facilement utilisables en multiplex. Cependant, ils nécessitent une bonne connaissance du génome étudié pour être caractérisés et ne peuvent couvrir l'intégralité du génome. Etant peu abondants chez le moustique *Ae. aegypti* (Severson *et al.*, 2004), ils ne sont donc pas adaptés à la recherche de gènes impliquées dans la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX.

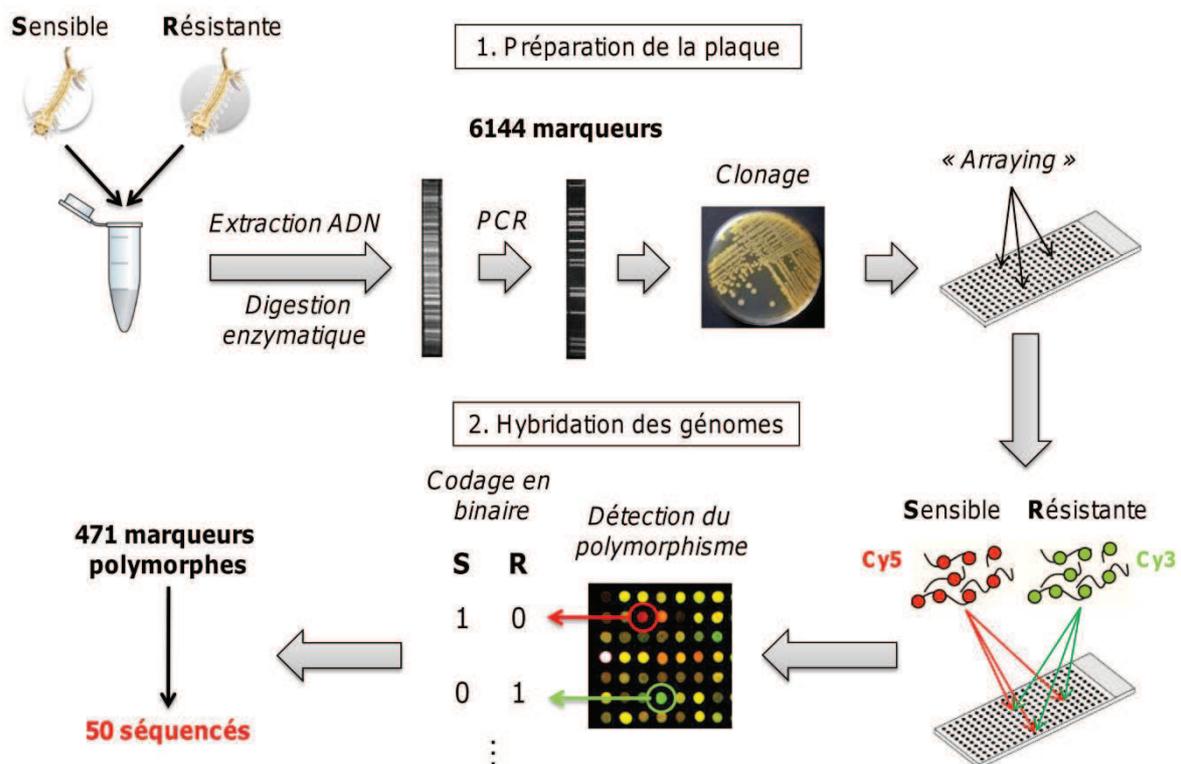
Dans notre contexte, il est préférable d'utiliser des marqueurs multiloci générés par des techniques telles que la technique **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995). Elle permet de générer rapidement et à moindre coût un nombre important de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome, sans connaissance préalable de ce génome. L'étude de la résistance de la souche LiTOX (génération 18) à l'aide de cette approche a été réalisée par Margot Pâris lors de sa thèse (2006 - 2009) (Paris et Despres,

<sup>13</sup> Un marqueur génétique est une séquence polymorphe d'ADN facilement détectable.

<sup>14</sup> Un microsatellite est une répétition en tandem d'un motif court (quelques nucléotides). C'est le nombre de répétitions du motif qui détermine la variabilité d'un microsatellite à un locus donné.

2012). L'inconvénient majeur de cette approche réside dans la difficulté d'isoler et de séquencer les marqueurs « outliers », détectés à l'aide de méthodes d'analyses spécifiques des marqueurs dominants et bialléliques (Beaumont et Nichols, 1996; Foll et Gaggiotti, 2008). Leur séquençage nécessite par exemple l'utilisation de technologies de type pyroséquençage haut-débit 454 (Roche) très coûteuses afin de pouvoir les replacer sur le génome d'*Ae. aegypti* et de rechercher des gènes candidats à analyser (Paris et Despres, 2012).

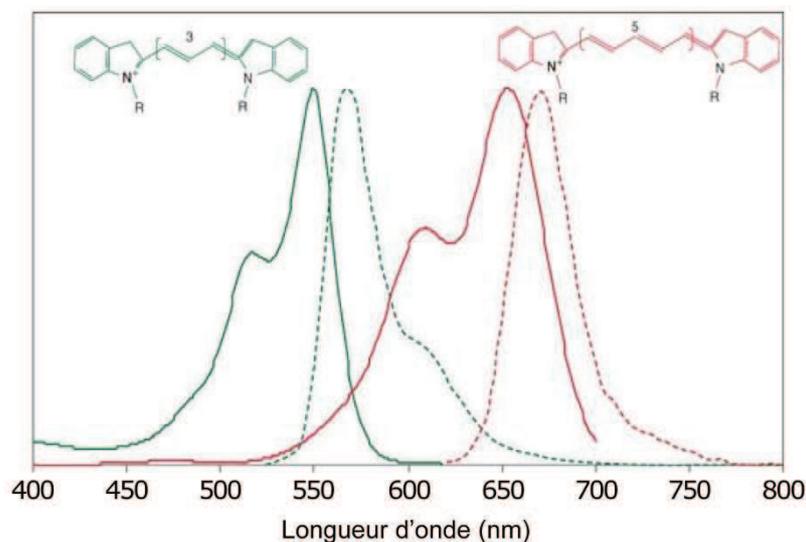
La technique **DArT** (Diversity Array Technology) est une alternative intéressante, permettant de coupler la technique AFLP à un isolement et une détection des marqueurs par puce à ADN (« microarray ») (Jaccoud *et al.*, 2001) (Figure 54). Cela facilite la détection des marqueurs « outliers » et diminue les coûts liés à leur séquençage.



**Figure 54.** Etapes nécessaires à la réalisation de la technique DArT pour détecter les marqueurs sous sélection. Adapté de (Jaccoud *et al.*, 2001; Bonin *et al.*, 2008).

Initialement développée pour l'étude des phénomènes adaptatifs chez les végétaux (Jaccoud *et al.*, 2001; Wenzl *et al.*, 2004; Wenzl *et al.*, 2006), la technique DArT a été appliquée à la souche LiTOX (génération 18) par Aurélie Bonin lors de son post-doctorat (Bonin *et al.*, 2008) (Article I). Lors de mon travail de Master II, j'ai réalisé l'analyse des gènes candidats détectés, valorisée par une publication lors de ma première année de thèse (Bonin *et al.*, 2009) (Article II). Ces deux articles ont été publiés dans la revue *BMC Genomics*.

La technique DArT se décompose en deux grandes étapes (Figure 54). La première consiste à préparer la puce à ADN. Pour cela, on mélange les ADN génomiques des deux souches à comparer (ici LiTOX et sensible) puis on les digère à l'aide d'enzymes de restrictions. Des adaptateurs, aux séquences complémentaires des sites de coupure, sont fixés et des amorces spécifiques des adaptateurs sont utilisées pour amplifier ces fragments génomiques. L'originalité de la technique DArT adaptée au moustique est de cibler des **éléments transposables** (ici de type MITE) pour l'ancrage de la deuxième amorce (Bonin *et al.*, 2008). Les éléments transposables sont des séquences d'ADN capables de se dupliquer et de se déplacer de manière autonome dans un génome et ont déjà été impliqués dans des cas d'adaptation rapide, notamment dans des cas de résistance aux insecticides chez le moustique (Darboux *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Chaque marqueur ainsi amplifié par PCR est ensuite isolé par clonage et fixé dans un puits d'une puce à ADN. La seconde étape consiste à marquer les génomes des deux souches avec des **fluorophores** différents (e.g. marqueur Cy3 pour la souche résistante et Cy5 pour la souche sensible). Ces fluorophores absorbant et émettant à des longueurs d'ondes distinctes, il est possible de les utiliser simultanément sans interférence pour mesurer des différences d'abondance de fragments marqués entre les deux souches (Figure 55).



**Figure 55.** Structure moléculaire et spectres d'absorption (lignes pleines) et d'émission (lignes pointillées) des fluorophores Cy3 (vert) et Cy5 (rouge). Le nombre inscrit dans les structures moléculaires indique le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne centrale. Adapté de : (Lee, 2009).

La présence/absence de chacun des marqueurs est ensuite codée en binaire pour chacune des souches et seuls les marqueurs polymorphes (*i.e.* présents chez au moins 2% des individus d'une souche et au plus 98% des individus de l'autre souche) sont considérés. Les 50 marqueurs pour lesquels les *Fst* sont les plus élevés ont été séquencés pour pouvoir être remplacés sur le génome d'*Ae. aegypti*.

Une fois les marqueurs « outliers » replacés sur le génome, les gènes adjacents et potentiellement impliqués dans la résistance de la souche LiTOX ont été recherchés. Deux gènes candidats ont ainsi été analysés : une **cadhérine** (CAD AAEL001196, localisée à environ 100.000 paires de bases des marqueurs outliers DArT\_467 et DArT\_298) et une **leucine-aminopeptidase** (LAP AAEL001649, localisée à plus de 900.000 pb du marqueur outlier DArT\_102). Ces gènes ont été séquencés chez une dizaine d'individus sensibles et résistants et leur expression a également été mesurée par RT-qPCR. Aucune mutation diagnostique<sup>15</sup> n'a été décelée et seulement une faible diminution de leur expression a été mesurée chez la souche résistante (CAD, 2,17 fois ; LAP, 1,68 fois). L'utilisation de tests de neutralité<sup>16</sup> a permis de déterminer que la **cadhérine est sous sélection directionnelle**, indiquant que la sélection agit sur ce gène mais qu'aucun allèle n'est encore fixé (Bonin *et al.*, 2009).

L'inconvénient de ces approches (AFLP, DArT) est d'utiliser des marqueurs neutres, non localisés dans les gènes. La majorité des 17.346 gènes décrits sur le génome d'*Ae. aegypti* ont été annotés automatiquement, avec de nombreuses erreurs d'annotation, et plus de 44% sont annotés en tant que « protéines hypothétiques ». Ainsi, l'annotation lacunaire du génome d'*Ae. aegypti* induit un biais non négligeable lors de la recherche de gènes candidats, expliquant notamment les distances importantes entre nos marqueurs et les gènes candidats analysés. Certains gènes n'étant pas ou mal annotés, on peut ainsi aisément passer à côté du gène réellement sous sélection.

## (2) L'approche QTL

L'approche **QTL** (Quantitative Trait Loci) est une autre méthode permettant de caractériser des adaptations multigéniques en étudiant le degré d'association entre des marqueurs moléculaires (e.g. des SNPs<sup>17</sup>) répartis sur l'ensemble du génome et un trait phénotypique quantitatif associé (e.g. temps mis par une larve pour mourir à une dose donnée de *Bti*) (Heckel *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2003; Coates *et al.*, 2011). Cette approche présente l'avantage de générer une cartographie physique de l'emplacement des marqueurs et de relier directement chaque génotype au phénotype de résistance. L'inconvénient majeur reste cependant la lourdeur de la démarche expérimentale. En effet, cette technique nécessite de réaliser de nombreux croisements entre les lignées pures différenciées selon le

<sup>15</sup> On parle de mutation diagnostique lorsqu'un allèle est toujours présent chez une souche et toujours absent chez une autre souche de la même espèce.

<sup>16</sup> Les tests de neutralité sélective comparent la variabilité nucléotidique observée sur un gène avec celle attendue en l'absence de sélection. Cela permet de déterminer si il y a action de la sélection et si oui, quel type de sélection (directionnelle, balancée, purificatrice) agit.

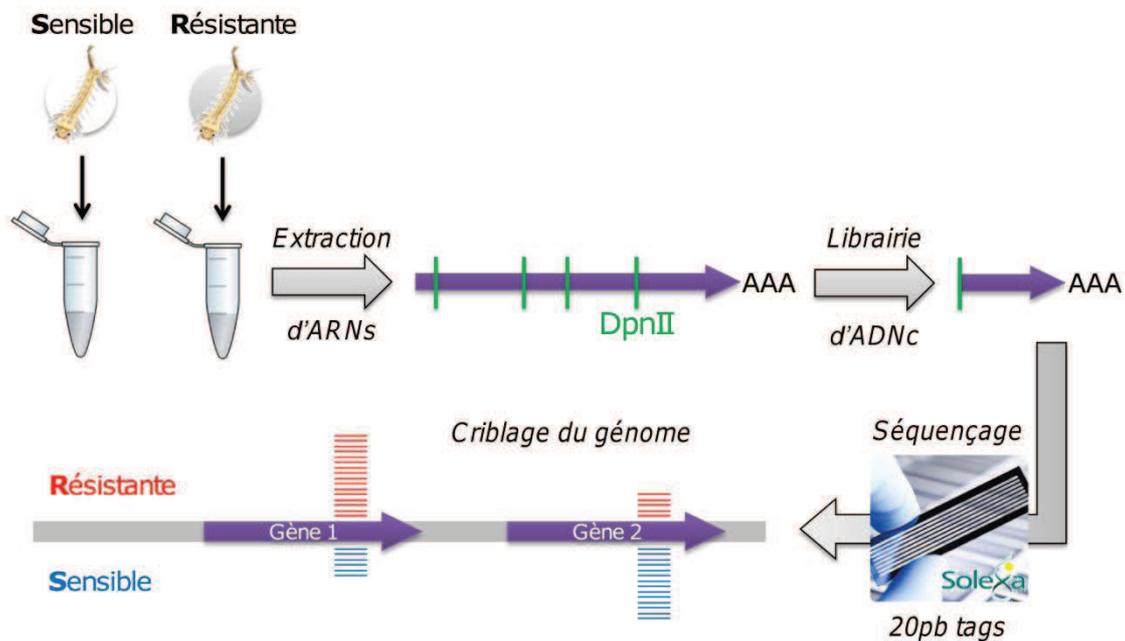
<sup>17</sup> Les SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism) sont des variations d'une seule paire de bases à un locus donné dans le génome.

trait phénotypique étudié (e.g. résistance au *Bti*) et requiert également de posséder des données phénotypiques au niveau individuel pour pouvoir ensuite les relier à leur génotype.

Cette approche étant très longue, elle n'a pas été envisagée dans le cadre de ma thèse mais a été réalisée par Aurélie Bonin (Post-doctorante), assistée d'Erica Bianco (stagiaire Master). La cartographie et les résultats sont en cours d'analyse et permettront dans l'idéal de croiser toutes les données obtenues lors des autres approches réalisées afin de faire ressortir les gènes candidats fortement susceptibles d'être impliqués dans la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX.

### b) Etude de la résistance par transcriptomique

Le développement des nouvelles technologies de séquençage a récemment permis d'accéder à l'expression de la quasi-totalité des gènes exprimés par les individus d'une espèce, là où les méthodes conventionnelles (e.g. PCR quantitatives) ne permettaient de cibler que certains gènes ou catégories de gènes. Ainsi, la technique **DGETP** (Digital Gene Expression Tag Profiling) a été appliquée pour étudier la résistance chez des larves de la souche LiTOX comparée à la souche sensible (Figure 56) (Paris *et al.*, 2012) (Article IV).



**Figure 56.** Etapes nécessaires à la réalisation de la technique DGETP. Les ARNs sont extraits à partir de larves entières issues de la souche LiTOX et sensible. Les ARN messagers sont ensuite rétrotranscrits en ADNc pour être clivés par l'enzyme de restriction DpnII. Après différentes étapes de fixation d'adaptateurs spécifiques, clivage par une enzyme de restriction MmeI puis amplification des fragments de 20 paires de bases générés. Pour plus de détails sur l'étape de construction de la bibliothèque d'ADN complémentaires, voir la figure supplémentaire 4 de (David *et al.*, 2010). Dans le cas présenté sur la figure, le gène 1 présente plus de tags chez la souche résistante que chez la souche sensible, indiquant une surexpression de ce gène alors que c'est le contraire pour le gène 2. Adapté de (Paris *et al.*, 2012).

Cette approche a permis de générer plus de 6 millions de fragments de cDNA (« tags ») de 20 pb, replacés ensuite sur plus de 6.000 gènes décrits chez *Ae. aegypti*, dont 86 présentaient des différences d'expression de plus de 4 fois entre les deux souches (Paris *et al.*, 2012). Parmi eux, certains gènes candidats tels que des protéases à sérine, des phosphatases alcalines et des alpha-amylases étaient représentés. Cependant, cette expérimentation a été réalisée sur des larves entières alors que le mode d'action du *Bti* se déroule essentiellement au niveau de l'intestin. Ainsi, il est difficile de déterminer si la variation au niveau de la larve entière de l'expression de gènes codant par exemple pour des récepteurs membranaires reflète bien une variation similaire au niveau de l'intestin. Il peut exister des phénomènes de compensation au sein de l'organisme qui peuvent limiter la détection des mécanismes de résistances proximaux, *i.e.* qui opèrent au niveau de l'intestin des larves.

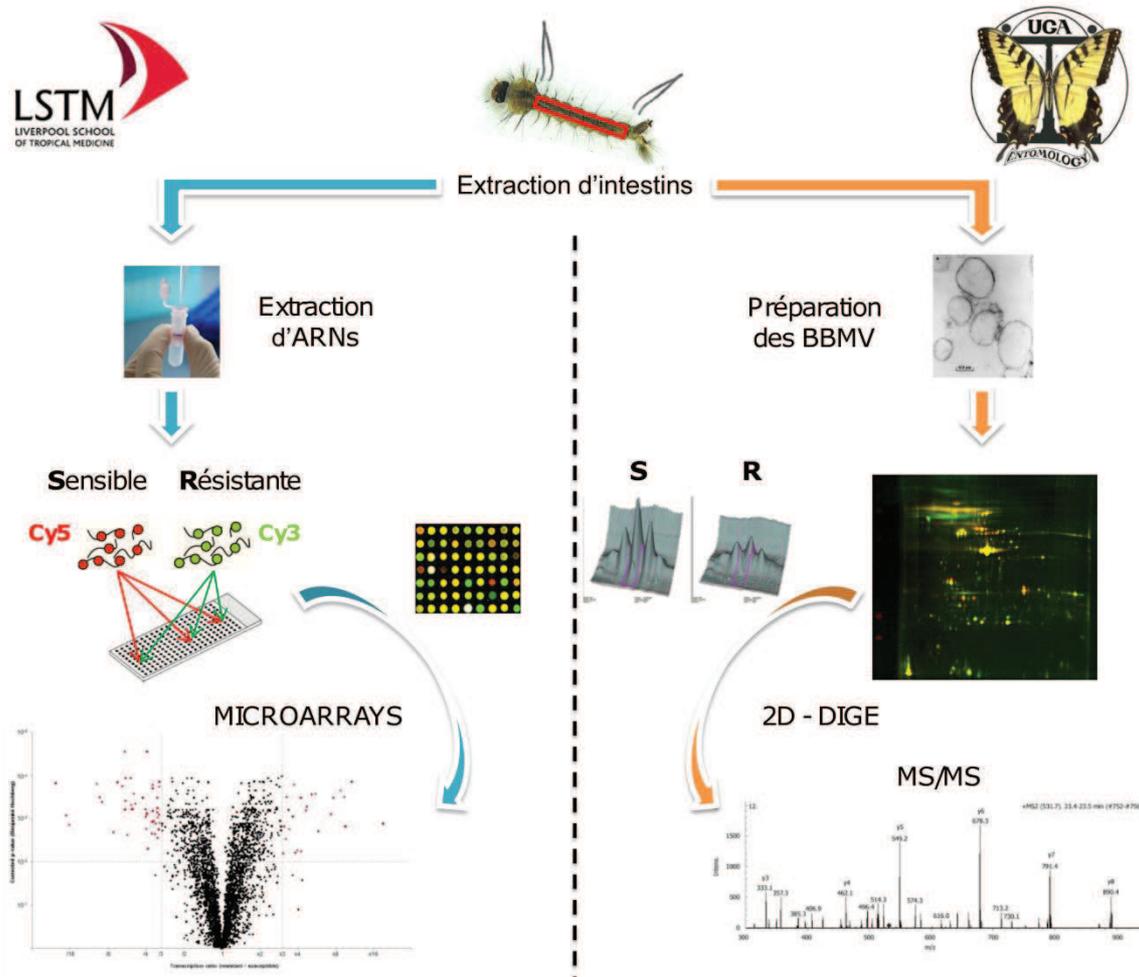
Cette approche nécessite donc d'être affinée et complétée par des approches centrées sur le tissu majoritairement impliqué dans le mode d'action des toxines du *Bti* : l'intestin des larves. De plus, devant la difficulté à conclure sur l'implication des gènes différentiellement transcrits entre la souche LiTOX et la souche sensible parentale, nous avons choisi de coupler deux approches différentes mais complémentaires (*e.g.* transcriptomique et protéomique) pour tenter de faire ressortir des gènes candidats fortement susceptible d'être impliqués dans la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX.

### ***c) Approches transcriptomique/protéomique sur intestins de larves de moustiques***

L'étude de l'expression des gènes et des protéines intestinales a été réalisée en collaboration avec deux laboratoires. L'analyse des transcrits a été réalisée à l'aide de la technique des puces à ADN (collaboration avec la Liverpool School of Tropical Medicine, Angleterre). Parallèlement, j'ai personnellement initié la collaboration avec Pr. Michael Adang qui m'a permis de faire un séjour de deux mois au sein de son laboratoire (Université de Georgie, Athens, Etats-Unis) afin de réaliser la technique DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) sur les protéines intestinales de larves de la souche LiTOX. L'ensemble de ces travaux a donné lieu à un article publié dans la revue *BMC Genomics* (Article V) (Tetreau *et al.*, 2012a).

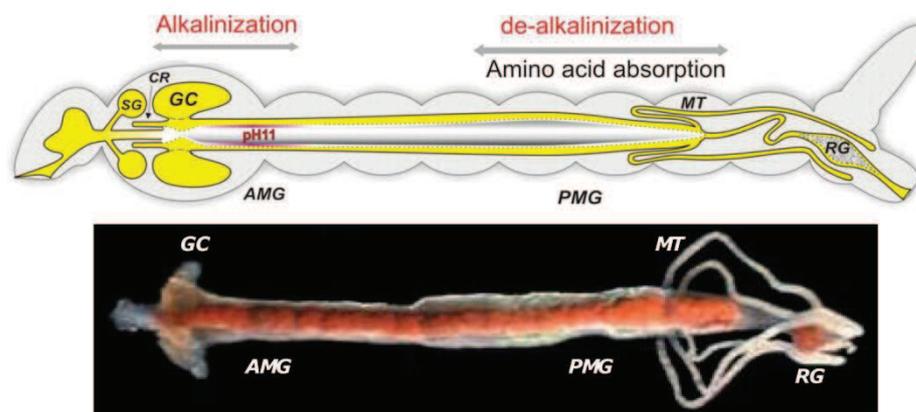
#### **(1) Matériel et méthodes**

La démarche expérimentale suivie ainsi que les différentes étapes inhérentes à chacune des deux techniques sont représentées dans la Figure 57.



**Figure 57.** Protocole illustré des approches transcriptomique (réalisée à la LSTM de Liverpool, Angleterre) et protéomique (réalisée au laboratoire de Michael Adang de l'Université de Georgie, Etats-Unis) appliquées à des extraits d'intestins de larves de moustiques.

(a) Description et extraction des intestins de moustiques



**Figure 58.** Représentation schématique (haut) et photographie (bas) de l'appareil digestif d'une larve de moustique *Aedes aegypti*. SG, glandes salivaires ; CR, cardia ; GC, cæca gastriques ; AMG, intestin moyen antérieur (anterior midgut) ; PMG, intestin moyen inférieur (posterior midgut) ; MT, tubes de Malpighi ; RG, rectum. Source de la figure : (Okech *et al.*, 2008). Auteur de la photographie : Dr Tom Clark, source : <http://www.wagner.edu/faculty/horst.onken/sites/wagner.edu.faculty.horst.onken/files/images/Intestine.jpg>

Le système digestif des larves de moustiques est constitué de cæca gastriques, d'un intestin moyen, de tubes de Malpighi et d'un rectum (Figure 58). Le pH est alcalin tout le long du système digestif, avec des valeurs de 7,6 à 8,5 dans les cæca gastriques, de 9,7 à 10,1 (maximum à 11) dans la partie antérieure de l'intestin moyen, 10,1 à 9,3 vers son milieu (zone de transition) pour redescendre jusqu'à 7,0 dans sa partie postérieure ; le pH se stabilise ensuite vers des valeurs entre 6,5 et 7,5 au niveau des tubes de Malpighi (Clements, 1992; Boudko *et al.*, 2001; Okech *et al.*, 2008).

L'**intestin moyen** étant la cible privilégiée des toxines de *Bti* (Singh *et al.*, 1986; Lacey, 2007), nous avons donc sélectionné cette partie en sectionnant l'appareil digestif après les cæca gastriques et avant les tubes de Malpighi après dissection. Les intestins moyens ont été extraits de larves de stade 4 de la souche LiTOX (phénotype normal, génération 30) et de la souche parentale sensible Bora-Bora. Pour les microarrays, 150 intestins ont été extraits pour chacun des trois réplicats biologiques de chacune des deux souches. Pour la protéomique, 1500 intestins ont été extraits pour chacun des deux réplicats biologiques de chaque souche.

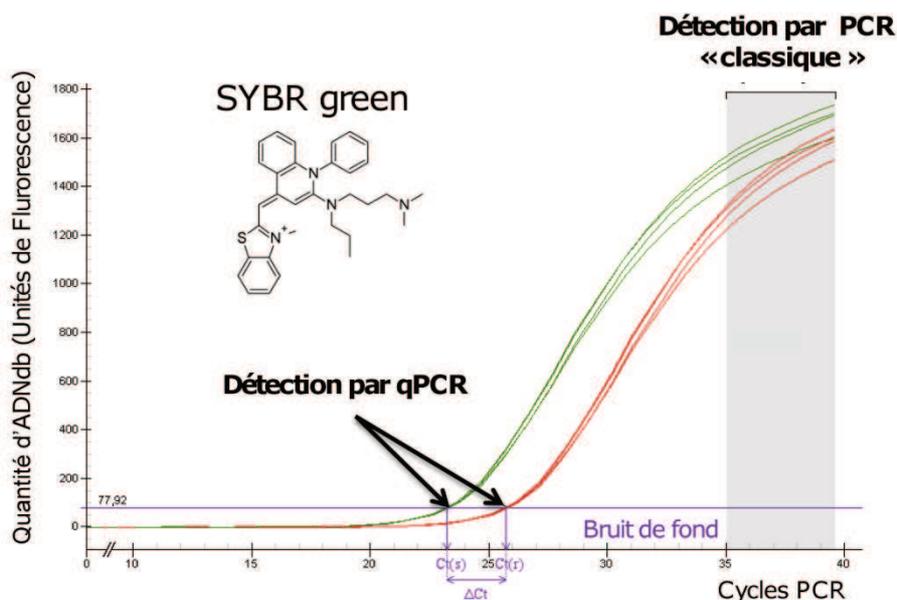
#### (b) *Protocole d'analyse par transcriptomique*

Les intestins ont été disséqués puis conservés à 4°C dans du RNA<sup>later</sup>® (Ambion) pour éviter que les ARN messagers ne se dégradent avant l'extraction. Les ARN ont ensuite été extraits à l'aide du kit RNAqueous®-4PCR (Ambion) puis traités à la DNase I (Ambion) afin d'éliminer les traces d'ADN génomique résiduelles. Les ARN messagers provenant des deux souches ont été amplifiés avec une ARN polymérase T7 et marqués avec deux fluorophores cyanines différents (Cy3 et Cy5) à l'aide du kit Low Input Quick Amp Labeling, two-color (Agilent) puis purifiés à l'aide du kit Absolutely RNA® Nanoprep (Stratagene). Toutes les préparations ont été réalisées en suivant le protocole fourni par les fabricants. La qualité et la quantité d'ARNs ont été vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop et d'un Bioanalyzer (Agilent).

Les ARNm marqués ont été hybridés sur la **puce à ADN 15K Agilent 'Aedes detox chip plus'** (numéro d'accèsion ArrayExpress : A-MEXP-1966), contenant huit puces répliquées constituées de sondes de 60 bases représentant plus de 14.000 transcrits différents d'*Ae. aegypti* et plusieurs sondes contrôles. Pour chacun des trois réplicats biologiques, deux hybridations ont été réalisées en intervertissant les fluorophores entre les échantillons pour un total de 6 hybridations (dye swap). Cela permet de s'assurer que les différences observées ne sont pas liées à la fixation d'un fluorophore particulier mais bien une différence d'expression du gène entre les deux souches.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GeneSpring GX v9.0 (Agilent). Seuls les transcrits détectés dans au moins 5 des 6 hybridations ont été considérés pour les analyses. Les gènes plus de 3-fois différentiellement transcrits entre les deux souches et avec des p-valeurs  $<0,01$  ont été considérés pour l'analyse fonctionnelle. Les p-valeurs ont été corrigées selon la méthode de Benjamini et Hochberg (1995), adaptée aux tests multiples. Les gènes détectés par la puce à ADN ont été classés dans 13 catégories basées sur leurs fonctions biologiques. Lorsqu'aucune fonction n'était attribuée, une recherche BLASTP sur la base de données Genbank a été réalisée mais les résultats n'ont pas été utilisés pour l'analyse fonctionnelle.

Pour valider les niveaux d'expression obtenus avec les puces à ADN, quinze gènes ont également été testés à l'aide d'une **RT-qPCR** (Reverse Transcription and real-time quantitative PCR) en utilisant comme fluorophore le SYBR green. Le SYBR green se fixe de manière non spécifique à l'ADN double brin, absorbe à une longueur d'onde de 497 nm pour réémettre à 520 nm. On peut ainsi suivre à chaque cycle PCR la quantité d'ADN présent dans l'échantillon, permettant une détection du signal dès la sortie du bruit de fond contrairement aux PCR « classiques » dont l'analyse n'est possible qu'à la fin des 35-40 cycles (Figure 59). Ainsi, pour un gène donné, la différence de signal entre les échantillons (nombre de cycles nécessaire à la détection du signal : « Cycle threshold » ou Ct) permet de quantifier précisément la différence de quantité initiale de l'ARN messager correspondant (expression du gène) (Figure 59).



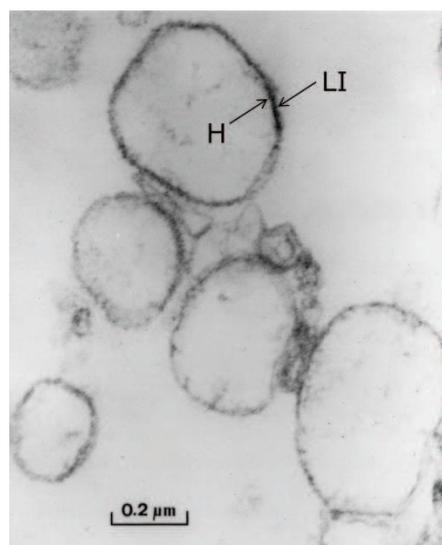
**Figure 59.** Quantité d'ADN double brin en fonction du nombre de cycles PCR pour la souche résistante (rouge) et la souche sensible (vert). Pour chaque souche, quatre réplicats techniques (quatre tracés de la même couleur) ont été réalisés. La ligne en violet marque la limite du bruit de fond. Dans le cas présent, le gène est sous-exprimé chez la souche résistante.

Pour chaque gène et pour chaque réplicat de chacune des deux souches, les **Ct** sont calculés à l'aide du logiciel iQ5 (Biorad). Pour calculer les différences d'expression entre les deux souches, il est nécessaire de normaliser les valeurs de Ct par rapport à des gènes domestiques dont l'expression ne varie pas entre les deux souches testées. Ainsi, deux gènes codants pour les protéines ribosomales RPL8 et RPS7 ont également été testés en RT-qPCR. Les différences d'expression de chaque gène candidat entre les deux souches sont calculées selon la **méthode des  $\Delta\Delta Ct$**  (Pfaffl, 2001), qui prend en compte la différence de Ct pour un gène entre les deux souches pondérée par les différences de Ct calculées pour les deux gènes domestiques.

La validation en RT-qPCR est réalisée en utilisant les mêmes ARN que ceux utilisés en microarrays. Les ARN sont rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide d'une transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen). Les amorces pour la qPCR ont été choisies à l'aide du logiciel Beacon Designer v.5.10 (Premier Biosoft International) à partir des séquences des transcrits obtenues à partir de la base de données Vectorbase (Article V, Tableau S7). Leur spécificité a été validée par une recherche BLAST sur le génome d'*Ae. aegypti* et en réalisant une melt curve après les cycles de PCR, permettant de vérifier que la température de fusion du produit PCR obtenu correspond à celle attendue.

(c) *Protocole d'analyse par protéomique*

Les intestins d'insectes ont la particularité de former spontanément des vésicules, permettant de conserver l'intégrité des protéines membranaires et d'en faciliter leur analyse. Ces structures sont appelées des **BBMV** (Brush Border Membrane Vesicles) (Figure 60).



**Figure 60.** Vésicules de membranes intestinales (BBMV) réalisées à partir d'intestins de moustiques *Ae. aegypti*. Les faces de l'intestin exposées vers l'hémolymphe (H) et vers la lumière intestinale (LI) sont indiquées par des flèches. Adapté de (Abdul-Rauf et Ellar, 1999).

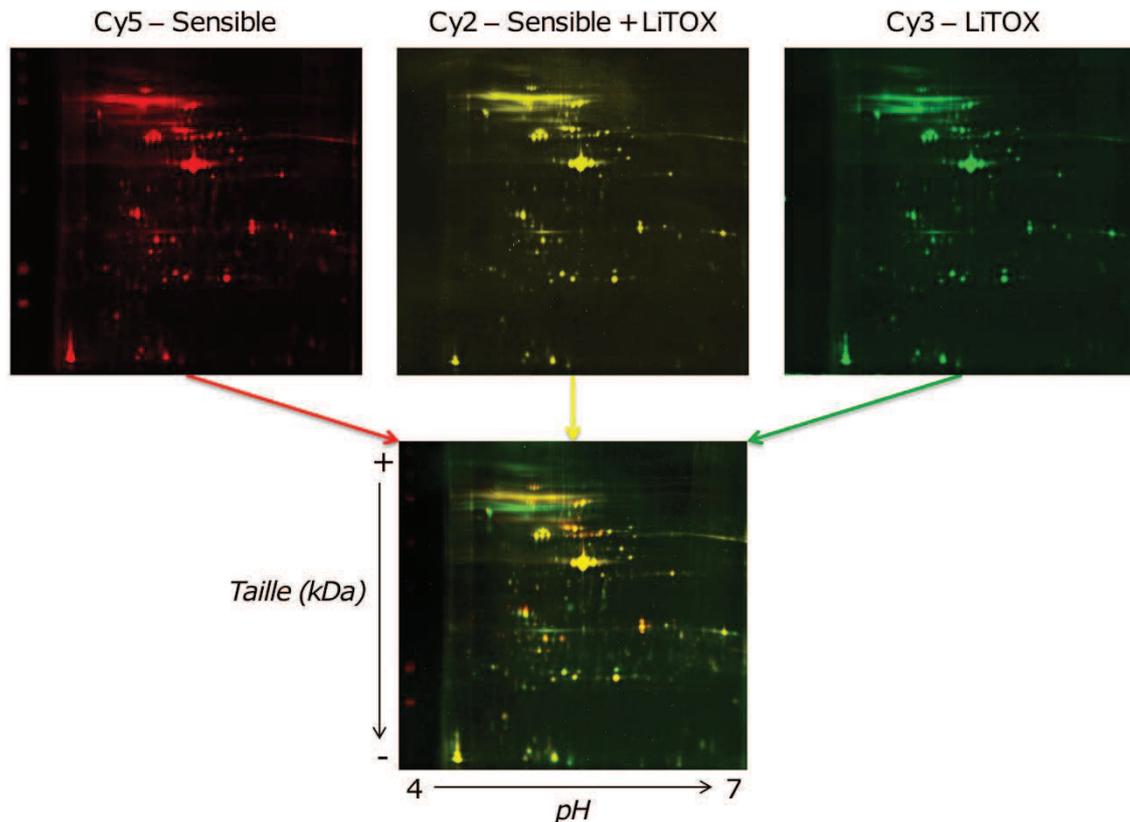
Les intestins de chaque souche ont été extraits puis disposés dans du tampon MET (300 mM Mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM TrisHCl, pH 7,5) avec le cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete® (Roche) et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. 500 µg d'intestins sont homogénéisés à l'aide d'un piston à 4°C et les BBMV sont préparés selon la méthode de précipitation au magnésium décrite par Abdul-Rauf et Ellar (1999). La concentration en protéines est calculée à l'aide d'un test de Bradford en utilisant une gamme de BSA comme standard (Bradford, 1976). La qualité des BBMV est estimée en calculant l'enrichissement en enzymes caractéristiques des membranes intestinales : les phosphatases alcalines (ALP) et les aminopeptidases (APN). Les activités enzymatiques des ALP et APN ont été calculées en utilisant le 4-nitrophenyl phosphate disodium et le L-leucine-p-nitroanilide comme substrats respectivement (Terra et Ferreira, 1994; Hernandez-Martinez *et al.*, 2010). L'enrichissement est calculé en divisant leurs activités dans les BBMV par leurs activités dans l'homogénat d'intestins initial (Tableau 8).

**Tableau 8.** Enrichissement en aminopeptidases et en phosphatases alcalines dans les préparations de BBMV par rapport aux homogénats d'intestin initiaux. Les enrichissements sont indiqués pour chacun des deux réplicats biologiques pour chaque souche.

Souche	Réplicat biologique	Enrichissement en APN	Enrichissement en ALP
Sensible	Premier	4,4 fois	6,1 fois
	Second	5,3 fois	1,6 fois
LiTOX	Premier	5,0 fois	7,1 fois
	Second	4,8 fois	3,2 fois

150 µg de protéines de BBMV de chaque souche ont été purifiées à l'aide du kit 2D-clean-up (Amersham Bioscience) et ont été utilisées pour réaliser un gel d'électrophorèse en 2-dimensions permettant de séparer les protéines en fonction leur taille (en kDa) et de leur point isoélectrique<sup>18</sup>. Pour mesurer l'abondance relative entre les deux souches de chacune des protéines présentes dans les BBMV, nous utilisons la technique **DIGE** (Differential In Gel Electrophoresis) (Unlu *et al.*, 1997; Jurat-Fuentes et Adang, 2007). Cette technique permet de faire migrer simultanément des protéines issues des deux souches préalablement marquées avec les fluorophores Cy3 ou Cy5. Un troisième fluorophore (Cy2) est utilisé sur un pool de BBMV des deux souches en proportions équivalentes afin de normaliser les expressions entre les différents gels réalisés (Figure 61). De même que pour les puces à ADN, les BBMV des deux souches sont marquées alternativement avec les fluorophores Cy3 et Cy5 (dye swap) pour éviter une potentielle influence des fluorophores sur les différences observées.

<sup>18</sup> Le point isoélectrique (pI) d'une protéine est le pH pour lequel sa charge globale est nulle.



**Figure 61.** Gels 2D des protéines BBMV issues de la souche LiTOX marquée au fluorophore Cy3, sensible à Cy5 et le pool à Cy2, révélés séparément ou en combinaison. Les échantillons sont mis à migrer sur des bandes de gels de 18cm au pH de 4 à 7.

Le marquage a été réalisé grâce au kit de CyDye minimal labeling (GE Healthcare). La première dimension de migration des protéines a été réalisée dans un système Multiphor-II flatbed (GE Healthcare) et la seconde dimension dans un système d'électrophorèse vertical Ettan DALTsix (GE Healthcare). Le protocole ainsi que les produits utilisés sont détaillés en Annexe III.

Les gels ont été numérisés à l'aide d'un Typhoon 9400 imager (GE Healthcare) et les images analysées à l'aide du logiciel Decyder v7.0 (GE Healthcare). Seuls les spots de protéines présentant des différences d'expression supérieures à 1,5-fois entre les deux souches ont été considérés pour les analyses ultérieures. 29 spots ont été excisés du premier réplicat biologique et 35 du deuxième, dont 8 communs entre les deux réplicats pour valider l'efficacité de l'identification réalisée par Maldi ToF/ToF<sup>19</sup>. L'identification des protéines excisées est réalisée en comparant les profils MS/MS obtenus avec des bases de données locales d'*Ae. aegypti*, ou d'autres diptères quand aucune identification n'était trouvée chez ce moustique.

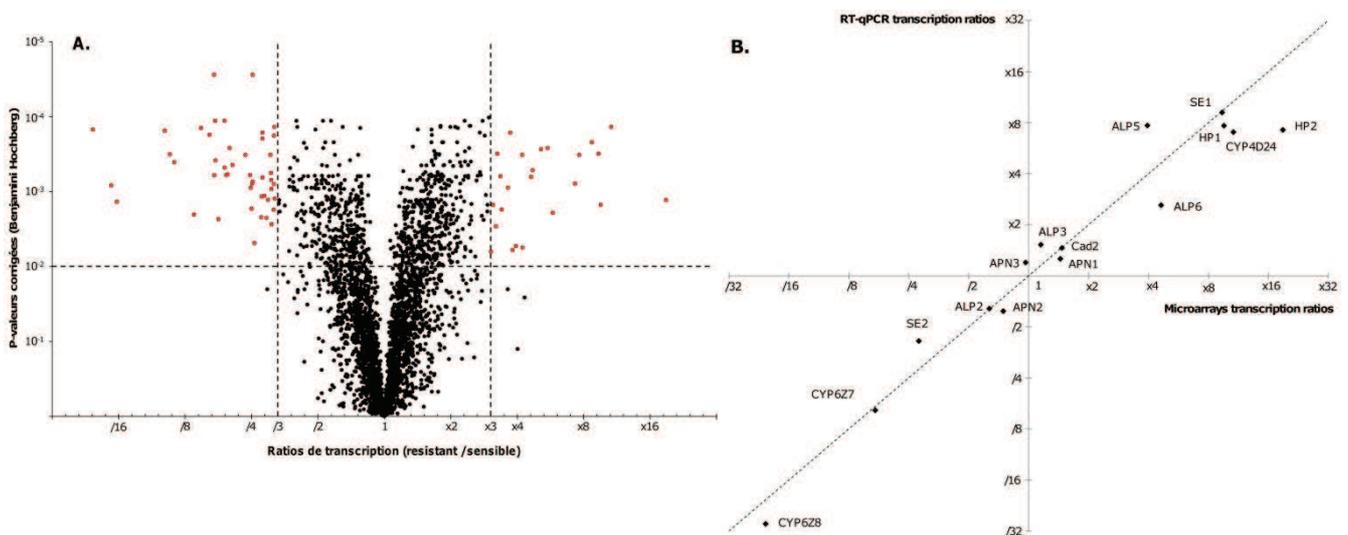
<sup>19</sup> Un instrument de type MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur de temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry).

## (2) Résultats des analyses globales

## (a) Analyse par transcriptomique

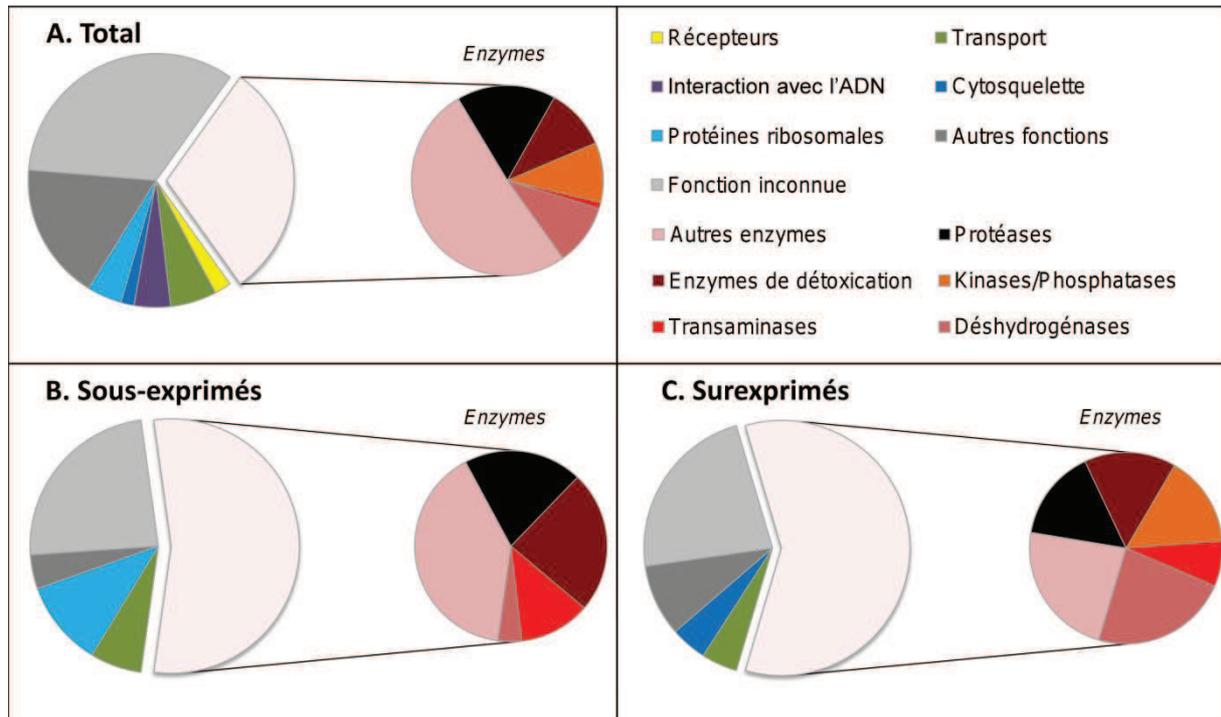
3512 transcrits issus d'intestins larvaires ont été détectés dans au moins 5 hybridations sur les 6 réalisées (Article V, Tableau S1). Ce relativement faible nombre de transcrits détectés (environ 25%) est probablement dû au faible niveau d'expression de certains gènes dans l'intestin, entraînant leur non-détection par la technique de microarrays. Cependant, les gènes conférant une résistance au *Bti* étant probablement suffisamment exprimés au niveau de l'intestin, se focaliser sur ce tissu plutôt que sur les larves entières permet de **réduire considérablement la liste de gènes candidats**, en n'étudiant que les gènes susceptibles d'être directement impliqués dans la résistance et non ceux indirectement affectés par la dérive génétique (liée au processus de sélection) ou par des mécanismes compensatoires (liés au coût de la résistance) (Paris *et al.*, 2011a).

46 et 24 gènes sont respectivement significativement sous- et sur-transcrit chez la souche LiTOX par rapport à la souche sensible ( $\geq 3$ -fois et P-valeurs corrigée  $< 0,01$ ) (Article V, Tableau S2). La distribution des rapports de transcription est bien équilibrée entre les gènes sur- et sous-exprimés avec des valeurs allant de -20,9 fois à 18,9 fois (Figure 62A). La validation des profils de transcription de quinze gènes par RT-qPCR a montré une bonne correspondance entre les deux techniques, témoignant de la fiabilité des données issues des analyses par microarray (Figure 62B).



**Figure 62. A.** Volcano plot des p-valeurs corrigées (Benjamini Hochberg) en fonction des rapports de transcriptions obtenus en microarray. Les seuils de significativité sont indiqués par des lignes en pointillés. Les transcrits significativement différentiellement transcrits entre les deux souches sont indiqués en rouge. **B.** Rapports de transcription obtenus en RT-qPCR en fonction de ceux obtenus en microarray pour les quinze gènes étudiés. La nomenclature ainsi que les numéros d'accèsion des gènes validés est indiquée dans le tableau S7 de l'article V.

Les gènes différentiellement transcrits ont été analysés en fonction de leur fonction biologique en les classant dans 13 catégories différentes (Figure 63).



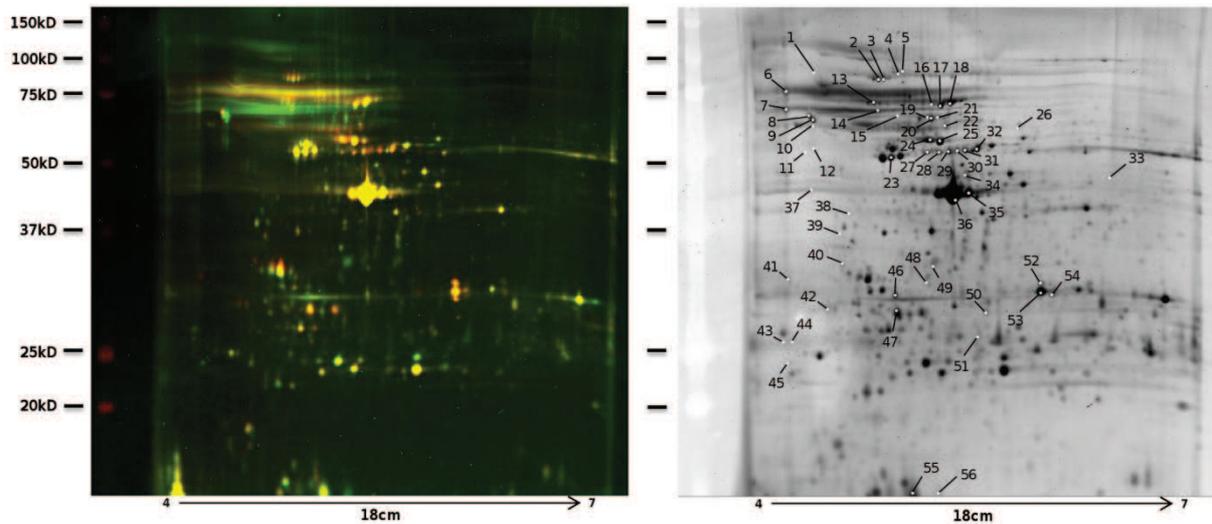
**Figure 63.** Analyse fonctionnelle de l'ensemble des gènes détectés (A) et des gènes sous- (B) et surexprimés (C) chez la souche LiTOX comparé à la souche sensible. Les gènes sont classés en 13 différentes catégories. La catégorie « récepteurs » rassemble des récepteurs protéiques et non des récepteurs spécifiques des toxines du *Bti*.

Les gènes aux fonctions inconnues représentent 34% de la totalité des gènes détectés alors que les gènes assignés à aucune catégorie (autres fonctions) en représentent 17% (Figure 63A). Les enzymes sont nettement sur-représentées parmi les gènes sous- et sur-transcrits (respectivement 55% et 60%) par rapport à l'ensemble des gènes détectés (30%). Les protéases sont représentées de manière équivalente entre les gènes sous- et sur-transcrits alors que l'on observe plus de gènes codant pour des enzymes de détoxification sous- (7 gènes) que sur-transcrits (Figure 63B,C). Les transaminases, seulement représentées par 11 gènes dans le génome d'*Ae. aegypti*, sont sur-représentées parmi l'ensemble des gènes différentiellement transcrits alors que les déshydrogénases sont uniquement sur-représentées parmi les gènes sur-transcrits chez la souche LiTOX (23% comparé à 10% pour la totalité des gènes détectés).

#### (b) Analyse globale par protéomique

Aucun effet des fluorophores n'a été décelé entre les répliquats techniques (Article V, Figure S4). La localisation des spots est reproductible entre les répliquats biologiques, même si l'intensité du signal est plus forte sur le second gel, permettant de détecter des spots supplémentaires différentiellement abondants entre les deux souches (Article V, Figure S4).

Au total, 56 spots ont été analysés (Figure 64), permettant d'identifier 35 protéines différentes (Article V, Tableau S5).



**Figure 64.** Gel 2D-DIGE (gauche) et le gel 2D correspondant coloré au *deep purple* (droite), utilisé pour l'excision des spots, réalisés à partir de BBMV de la souche LiTOX et de la souche sensible. En DIGE, les spots apparaissant en jaune traduisent une abondance équivalente de la protéine correspondante chez les deux souches, ceux en rouge sont uniquement présents dans les BBMV de la souche sensible marquée avec le fluorophore Cy5 et ceux en vert chez la souche LiTOX marquée avec Cy3. L'axe des abscisses montre les valeurs des points isoélectriques des protéines (allant de 4 à 7) et l'axe des ordonnées la masse moléculaire en kilodaltons (kDa). Les 56 spots excisés à partir du premier et du deuxième gel, correspondants aux deux réplicats biologiques, sont notés sur le gel de droite.

L'analyse en spectrométrie de masse a donné les mêmes identifications entre les deux réplicats biologiques pour les spots 2, 8, 20, 21 et 24 qui avaient de fort Mascot scores (de 110 à 249) alors que les spots 14, 42 et 49, avec des Mascot scores inférieurs à 100, ont été assignés à des protéines différentes (Article V, Tableau S5). De ce fait, aucune des protéines avec de faibles Mascot scores n'ont été considérées pour les analyses ultérieures. La liste des protéines avec les plus forts Mascot scores est donnée dans le Tableau 9. Différents spots ont été identifiés comme étant la même protéine pour 10 différentes protéines, avec un maximum de six spots différents pour la protéine AAEL005798 (V-ATP synthase sous-unité bêta). La présence de plusieurs spots pour une même protéine reflète très probablement la présence de modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation, etc.) qui induisent de sensibles modifications de taille et/ou de charge, provoquant un décalage dans la migration de la protéine.

### (c) Recherche de domaines GPI

Comme nous l'avons vu, certaines enzymes telles que les phosphatases alcalines ou les aminopeptidases N peuvent servir de récepteur et s'ancrent dans la membrane intestinale à l'aide de motifs GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol). Pour détecter leur

présence dans les gènes et protéines différemment exprimés, nous avons utilisé quatre logiciels de détection de domaines GPI : big-PI Predictor v.3.0 ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html)) (Eisenhaber *et al.*, 2000), PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>) (Pierleoni *et al.*, 2008), FragAnchor (<http://navet.ics.hawaii.edu/~fraganchor/NNHMM/NNHMM.html>) (Poisson *et al.*, 2007) et GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) (Fankhauser et Maser, 2005).

**Tableau 9.** Identification des 31 spots excisés ayant les Mascot scores les plus élevés. Les protéines sont classées en fonction de leur fonction biologique avec les mêmes 13 classes que pour les données transcriptomiques. Quand plusieurs spots différents désignent la même protéine, des lettres sont disposées après leur numéro d'accèsion pour les différencier.

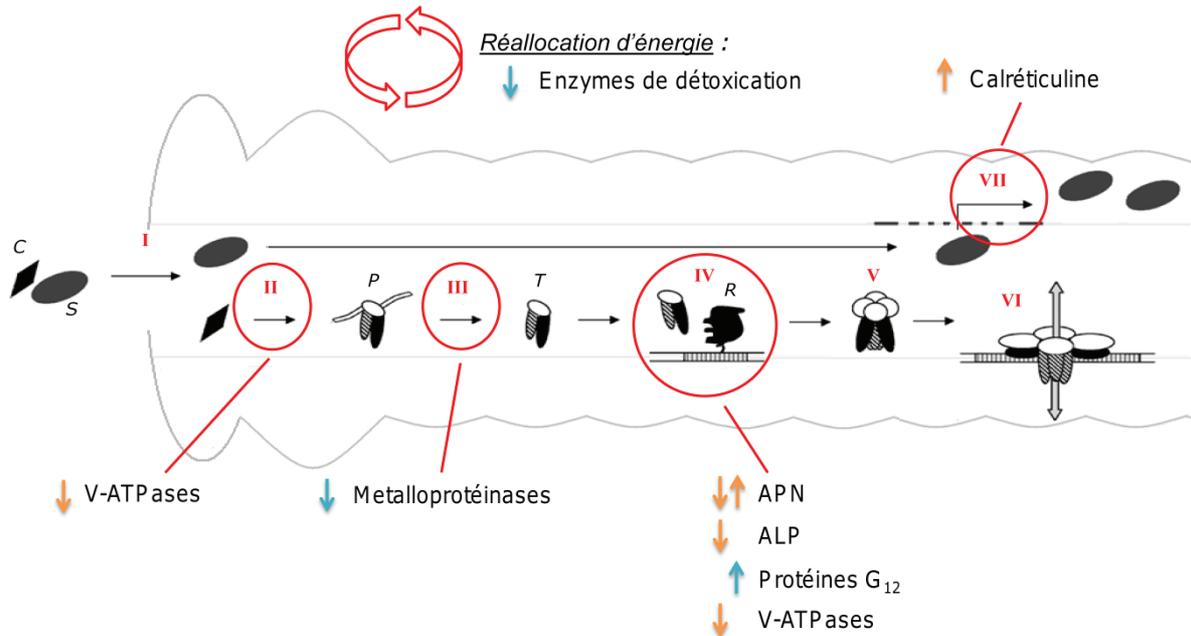
Spot N°	Expression (fois)	Numéro d'accèsion (Vectorbase)	Mascot score	Description	pI estimé	Masse estimée (kDa)	% couverture de séquence	Espèce	
<i>Protéases</i>									
2	-	1,88	AAEL015386_a	249	dipeptidyl-peptidase	4,91	84,9	42	<i>Ae, aegypti</i>
3	-	2,77	AAEL015386_b	149	dipeptidyl-peptidase	4,91	84,9	22	<i>Ae, aegypti</i>
4	+	1,81	AAEL012774_a	237	protéase m1 zinc metalloprotéase	4,81	102,5	41	<i>Ae, aegypti</i>
5	+	2,34	AAEL012774_b	162	protéase m1 zinc metalloprotéase	4,81	86,7	42	<i>Ae, aegypti</i>
20	+	1,81	AAEL012776_a	135	protéase m1 zinc metalloprotéase	5,19	103,3	30	<i>Ae, aegypti</i>
21	-	2,74	AAEL012776_b	146	protéase m1 zinc metalloprotéase	5,19	103,3	27	<i>Ae, aegypti</i>
19	-	3,81	AAEL012776_c	136	protéase m1 zinc metalloprotéase	5,19	103,3	22	<i>Ae, aegypti</i>
<i>Enzymes de détoxication</i>									
45	+	3,01	CPIJ019700	119	cytochrome P450	7,6	58,4	41	<i>C, quinquefasciatus</i>
<i>Kinases/Phosphatases</i>									
22	-	1,58	AAEL003313	62	phosphatase alcaline	5,46	61,0	23	<i>Ae, aegypti</i>
24	-	1,92	AAEL003298_a	186	phosphatase alcaline	5,28	58,8	39	<i>Ae, aegypti</i>
25	-	1,16	AAEL003298_b	194	phosphatase alcaline	5,23	58,3	39	<i>Ae, aegypti</i>
<i>Autres enzymes</i>									
6	+	1,78	AAEL010532	146	alpha-amylase	4,82	68,9	37	<i>Ae, aegypti</i>
13	-	1,27	AAEL004580	129	beta-galactosidase	4,87	74,1	34	<i>Ae, aegypti</i>
11	-	2,06	AAEL002827_a	61	ATP synthase sous-unité beta	5,03	53,9	32	<i>Ae, aegypti</i>
23	-	2,29	AAEL002827_b	152	ATP synthase sous-unité beta	5,03	53,9	55	<i>Ae, aegypti</i>
16	-	2,06	AAEL008787_a	162	V-ATP synthase sous-unité alpha	5,26	68,5	31	<i>Ae, aegypti</i>
17	-	2,19	AAEL008787_b	231	V-ATP synthase sous-unité alpha	5,26	68,5	42	<i>Ae, aegypti</i>
18	-	1,82	AAEL008787_c	132	V-ATP synthase sous-unité alpha	5,26	68,5	30	<i>Ae, aegypti</i>
27	-	1,51	AAEL005798_a	200	V-ATP synthase sous-unité beta	5,31	54,8	49	<i>Ae, aegypti</i>
28	-	1,69	AAEL005798_b	177	V-ATP synthase sous-unité beta	5,31	54,8	44	<i>Ae, aegypti</i>
29	-	1,72	AAEL005798_c	187	V-ATP synthase sous-unité beta	5,31	55,4	53	<i>Ae, aegypti</i>
30	-	2,06	AAEL005798_d	229	V-ATP synthase sous-unité beta	5,38	55,5	52	<i>Ae, aegypti</i>
31	-	2,39	AAEL005798_e	197	V-ATP synthase sous-unité beta	5,38	55,4	48	<i>Ae, aegypti</i>
32	-	1,89	AAEL005798_f	181	V-ATP synthase sous-unité beta	5,38	55,4	56	<i>Ae, aegypti</i>
52	-	2,14	AAEL012035_a	93	V-ATP synthase sous-unité E	5,91	25,7	35	<i>Ae, aegypti</i>
53	-	2,21	AAEL012035_b	88	V-ATP synthase sous-unité E	5,91	25,7	38	<i>Ae, aegypti</i>
<i>Autres fonctions</i>									
8	+	10,74	AAEL001005_a	195	calréticuline	4,42	47,0	43	<i>Ae, aegypti</i>
8	-	2,56	AAEL001005_a	226	calréticuline	4,42	47,0	49	<i>Ae, aegypti</i>
9	+	3,14	AAEL001005_b	210	calréticuline	4,42	47,0	49	<i>Ae, aegypti</i>
10	+	2,75	AAEL001005_c	158	calréticuline	4,42	47,0	48	<i>Ae, aegypti</i>
12	+	3,01	AAEL001005_d	93	calréticuline	4,42	46,7	35	<i>Ae, aegypti</i>

(d) *Combinaison des approches transcriptomique et protéomique*

La comparaison des transcrits et des protéines intestinales entre les souches sensibles et LiTOX a révélé des sets chevauchants mais distincts de gènes/protéines différentiellement exprimés. Cette différence entre les résultats obtenus avec les deux techniques est probablement liée à des processus biologiques mais également à des limitations techniques inhérentes aux deux méthodes. Concernant l'approche par protéomique, les BBMVs utilisés sont connus pour être riches en protéines membranaires mais généralement dépourvues de protéines solubles, intracellulaires ou excrétées dans la lumière intestinale (Bayyareddy *et al.*, 2009; Popova-Butler et Dean, 2009). A l'inverse, les ARN messagers extraits à partir des intestins de larves sont représentatifs de l'ensemble des transcrits présents dans les cellules intestinales. Le filtrage relativement stringent des données obtenues par les microarrays (>3-fois, p-valeur <0,01), éliminant de nombreux gènes, peut également expliquer cette différence. Nos résultats sont concordants avec plusieurs études qui ont déjà démontré que les données de transcriptomique coïncident rarement avec les données de protéomique, notamment à cause des modifications post-traductionnelles des protéines (Gygi *et al.*, 1999; De Wit *et al.*, 2010; Foss *et al.*, 2011). De telles modifications peuvent ainsi générer une grande diversité de protéines alors que l'expression des gènes correspondants reste inchangée. Combiner des approches de transcriptomique et de protéomique permet donc d'étudier l'altération de l'expression des gènes mais également les modifications post-traductionnelles subies par les protéines correspondantes afin d'obtenir une vision plus complète des mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance au *Bti*.

(3) **Gènes et protéines différentiellement exprimés chez la souche LiTOX**

Dans cette section, je vais décrire les résultats principaux obtenus en transcriptomique et/ou en protéomique sur un gène, une protéine ou une catégorie de gènes/protéines particulière. Pour chacun, je décrirai leurs niveaux d'expression ainsi que leur implication potentielle dans la résistance de la souche LiTOX. Etant donné le caractère descriptif des approches globales, **toutes ces interprétations sont forcément spéculatives et les hypothèses correspondantes nécessitent d'être validées par des approches fonctionnelles**. Pour chacun, je proposerai des analyses complémentaires qui permettront de valider/infirmier l'implication de chaque gène/protéine dans la résistance. Afin de faciliter la discussion des résultats, l'ensemble des mécanismes de résistance potentiels ainsi que les gènes/protéines potentiellement impliqués sont indiqués sur la Figure 65.



**Figure 65.** Mode d'action des toxines Cry du *Bti* ainsi que l'implication potentielle des principaux gènes et protéines significativement différentiellement exprimés avec une des deux approches entre les deux souches. Les cristaux (C) et spores (S) sont ingérés (I) puis le cristal se solubilise (II) dans le pH hautement alcalin du tube digestif. Les protoxines (P) sont activées par les enzymes digestives (III) puis les toxines (T) se fixent à des récepteurs membranaires (R) (IV) avant de s'oligomériser (V) et de s'insérer dans la membrane intestinale (VI). La perforation de l'intestin permet aux spores de passer dans l'hémolymphe pour germer et proliférer (VII). Les altérations d'expression mesurées en protéomique sont indiquées par des flèches orange et en transcriptomique par des flèches bleues.

(a) *Expression différentielle des metalloprotéinases*

Les données de transcriptomique ont montré que quatre gènes codants pour des **métalloprotéases** étaient sous-transcrits de -3,16 à -5,29 fois chez la souche LiTOX comparé à la souche sensible (Article V, Tableau S2). La présence de domaines conservés de metalloprotéases solubles de type astacine ainsi que l'absence de domaines GPI prédits (Article V, Tableau S6) suggèrent que ces metalloprotéases sont des enzymes extracellulaires sécrétées, ce qui peut expliquer leur absence dans les BBMVs analysés en protéomique.

Certaines metalloenzymes présentes dans la lumière intestinale étant impliquées dans des étapes précoces de l'activation des toxines Cry (Figure 65 – III), une diminution de leur abondance peut entraîner une diminution de l'activation des protoxines et induire une résistance. La comparaison des activités protéolytiques entre la souche LiTOX et la souche sensible pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. De plus, des bioessais avec des toxines activées et non-activées sur chaque souche permettraient de vérifier si une altération de l'étape d'activation participe à la résistance chez la souche LiTOX. Ces approches seront développées dans la partie 2.

(b) Implication des récepteurs membranaires

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs membranaires sont souvent impliqués dans des cas de fortes résistances aux toxines Cry de *Bacillus thuringiensis* (Griffitts et Aroian, 2005). J'ai également réalisé des RT-qPCR sur cinq N-aminopeptidases (APN1 à 5), deux cadhérines (Cad1 et Cad2) et trois phosphatases alcalines (ALP1 à 3) déjà décrites comme capables de se fixer à la toxine Cry4Ba (Bayyareddy *et al.*, 2009) ou Cry11Aa (Fernandez *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009a; Chen *et al.*, 2009b; Likitvivanavong *et al.*, 2011b) (Tableau 10).

**Tableau 10.** Niveaux d'expression de récepteurs potentiels des toxines Cry du *Bti* mesurés par puce à ADN, RT-qPCR et/ou 2D-DIGE. Le niveau d'expression de la LiTOX par rapport à la souche sensible est indiqué. ND, Non détecté dans au moins 5 des 6 hybridations en puces à ADN ; NI, Non identifié comme différentiellement exprimé entre les deux souches ; UD, Non détectable en DIGE dû à leur haut poids moléculaire et leur faible abondance dans les BBMV.

Gène	Accession number	Microarrays	RT-qPCR	2D-DIGE	Se fixe à...	Référence
Phosphatase alcaline (ALP1)	AAEL000931	ND	+ 11,40	NI	Cry11Aa	(Likitvivanavong <i>et al.</i> , 2011b)
Phosphatase alcaline (ALP2)	AAEL003298	- 1.57	- 1,56	- 1,92; -1,16	Cry4Ba	(Bayyareddy <i>et al.</i> , 2009)
Phosphatase alcaline (ALP3)	AAEL003313	+ 1.15	+ 1,52	- 1,58	Cry4Ba	(Bayyareddy <i>et al.</i> , 2009)
Phosphatase alcaline (ALP4)	AAEL009077	ND	+ 1,15	NI	Cry11Aa	(Fernandez <i>et al.</i> , 2006)
Phosphatase alcaline (ALP5)	AAEL015070	+ 3.95	+ 7,69	NI	Cry4Ba	(Bayyareddy <i>et al.</i> , 2009)
Cadhérine (Cad1)	AAEL007478	ND	- 1,11	UD	Cry11Aa	(Chen <i>et al.</i> , 2009a)
Cadhérine (Cad2)	AAEL007488	- 1.47	- 1,46	UD	Cry11Aa	(Chen <i>et al.</i> , 2009a)
N-Aminopeptidase (APN1)	AAEL012774	+ 1.44	+ 1,26	+ 1,80; + 2,34	Cry11Aa	(Chen <i>et al.</i> , 2009b)
N-Aminopeptidase (APN2)	AAEL012776	- 1.34	- 1,62	+ 1,81; - 2,74; - 3,81	Cry4Ba	(Bayyareddy <i>et al.</i> , 2009)
N-Aminopeptidase (APN3)	AAEL012778	- 1.04	+ 1,20	NI	Cry11Aa	(Chen <i>et al.</i> , 2009b)

La **cadhérine** décrite comme un récepteur potentiel à Cry11Aa chez *Ae. aegypti* est sous-transcrite -1,47 fois par les approches de microarray et RT-qPCR. Cependant, aucune cadhérine n'a été détectée par la technique DIGE. Leur absence n'est pas surprenante en protéomique, leur taille importante (>170 kDa) et leur faible abondance dans les BBMV limitant leur détectabilité sur les gels (McNall et Adang, 2003).

Parmi les gènes aux fonctions inconnues détectés en microarrays, les deux gènes les plus surexprimés (AAEL013584, +19-fois et AAEL010435, +9,6-fois) présentent une forte homologie pour des **protéines G<sub>12</sub>** d'*Ae. aegypti* (77% d'identité de séquence protéique ; Article V, Tableau S2). Ces protéines régulent de nombreuses fonctions dans les cellules telles que les échanges Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, la synthèse d'ADN ou la prolifération des cellules (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Riobo et Manning, 2005). Les protéines G<sub>α12</sub> peuvent également interagir avec le domaine cytoplasmique des cadhérines et entraîner un relargage de β-catenines, induisant une perte importante de la fonction de jonction cellulaire des cadhérines (Meigs *et al.*, 2002). Ainsi, la surexpression de ces protéines G<sub>12</sub> pourrait entraîner une baisse du nombre de cadhérines fonctionnelles à la surface de la cellule, diminuant la possibilité de fixation des toxines Cry. Cette hypothèse très spéculative doit cependant être validée par des approches fonctionnelles, notamment sur des cultures de cellules intestinales de moustiques, pour mieux comprendre les mécanismes fins de régulation de l'activité des cadhérines et leur impact sur la fixation des toxines Cry à la membrane.

Les **phosphatases alcalines** détectées comme sur-transcrites chez la souche LiTOX en microarray et RT-qPCR sont soit non-détectées comme différentiellement exprimées (AAEL000931, AAEL009077 and AAEL015070) soit sous-exprimées chez la souche LiTOX en protéomique. Ces résultats suggèrent que des modifications post-transcriptionnelles et/ou post-traductionnelles induisent des modifications de l'abondance des protéines dans les membranes épithéliales. Ainsi, trois spots ont été détectés comme sous-exprimés en DIGE (AAEL003313 et deux spots de AAEL003298) (Tableau 9). Ces deux ALP ont déjà été décrites comme capables de se fixer à la toxine Cry4Ba (Bayyareddy *et al.*, 2009). La diminution de leur abondance est cohérente avec le phénotype de résistance, la sous-expression d'ALP ayant déjà été décrite comme responsable de la résistance aux toxines Cry chez trois espèces de Lépidoptères (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011).

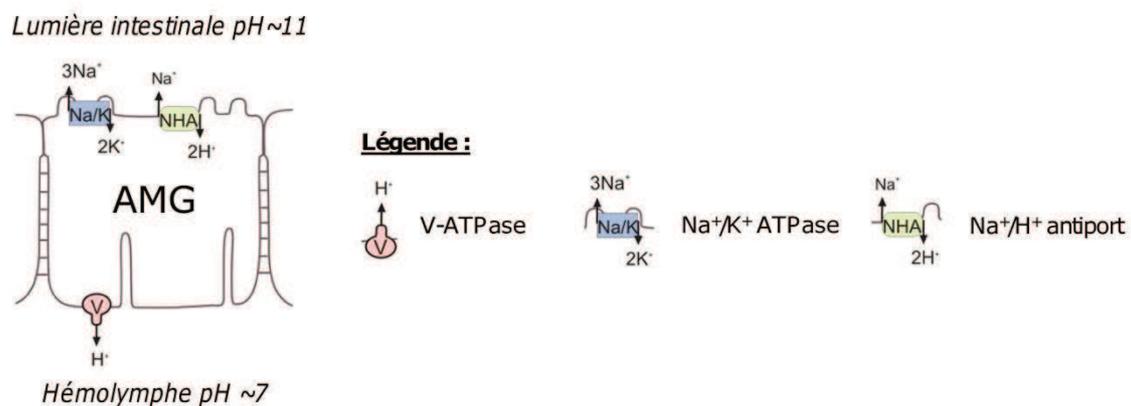
L'approche par transcriptomique a détecté 13 **aminopeptidases N** différentes (annotées 'protéases m1 zinc metalloprotéases') avec des rapports d'expression allant de -1,82 à +1,96, mais aucun n'est significatif (Article V, Tableau S1). L'analyse par protéomique a identifié deux APN différentiellement exprimées chez la souche LiTOX (Tableau 9) : deux spots présentent une sur-expression de l'APN AAEL012774 et deux des trois spots identifiés comme étant l'APN AAEL012776 montrent une sous-expression. Ces résultats sont congruents avec les données transcriptomiques (Tableau 10). Ces deux APN ont été décrites comme des récepteurs potentiels à Cry11Aa chez *Ae. aegypti* (Chen *et al.*, 2009b). Leurs profils d'expression étant opposés, il est difficile de conclure sur leur implication potentielle dans la résistance.

En général, la résistance aux toxines Cry de *Bt* implique une modification de la structure des récepteurs membranaires plutôt qu'une altération de leur expression (Ferré *et al.*, 1995; Griffiths et Aroian, 2005). Cependant, des cas récents montrent qu'une sous-expression de ces récepteurs peut entraîner des phénotypes de résistance aux toxines Cry (Herrero *et al.*, 2005; Jurat-Fuentes *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour mesurer la capacité de fixation des récepteurs membranaires différentiellement exprimés entre les deux souches pour estimer leur implication dans la résistance. Cette approche sera développée dans la partie 2.

(c) *Les V-ATPases : une double implication ?*

Treize spots correspondant à un total de quatre **V-ATPases** différentes (sous-unités alpha, beta et epsilon) ont tous été détectés comme sous-exprimés chez la souche LiTOX, avec des rapports d'abondance allant de -1,51 à -2,39 fois (Tableau 9). Cette tendance est confirmée par les données de transcriptomique montrant trois gènes codants pour des V-ATPases sous-transcrits chez la souche LiTOX (AAEL008787, -1,19 fois ; AAEL005798, -1,37 fois et AAEL012035, -1,19 fois) même si leurs p-valeurs ne sont pas significatives (Article V, Tableau S1). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'implication potentielle des V-ATPases dans la résistance chez la souche LiTOX :

1. Les V-ATPases sont très fortement impliquées dans l'alcalinisation de l'intestin moyen antérieur (lieu de solubilisation des cristaux de *Bti*) en transportant les protons à travers la membrane, de l'intérieur de la cellule vers l'hémolymphe, permettant de créer un gradient de pH et un potentiel transmembranaire (Boudko *et al.*, 2001; Beyenbach et Wieczorek, 2006; Onken et Moffett, 2009) (Figure 66).

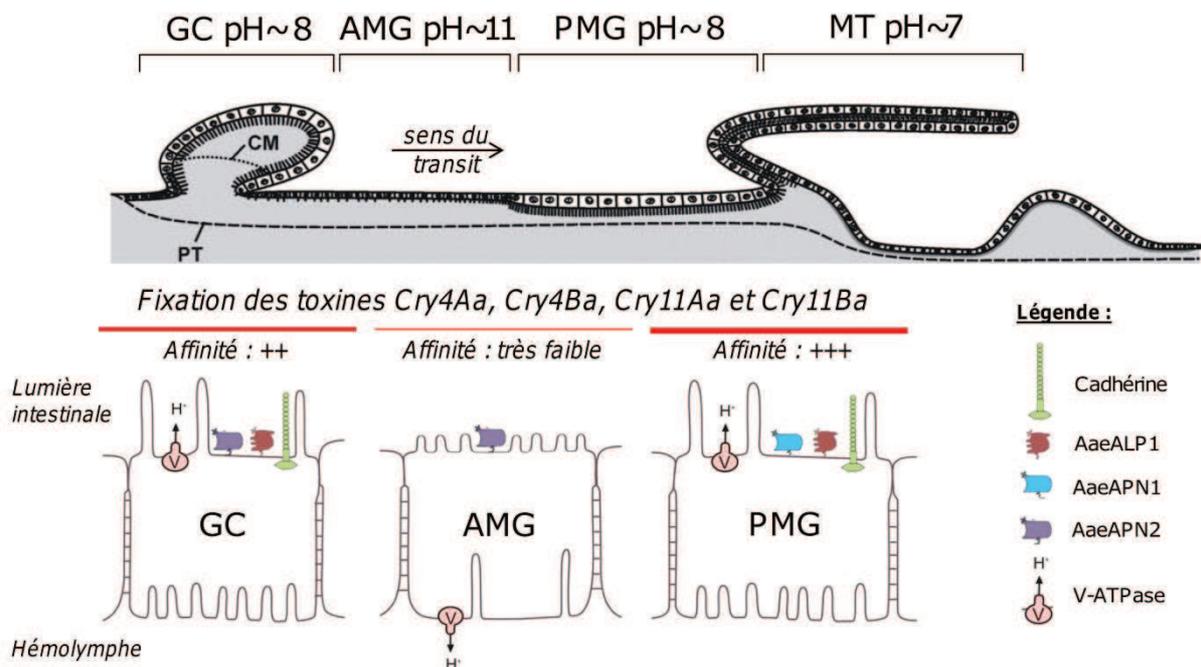


**Figure 66.** Transporteurs membranaires d'une cellule épithéliale de l'intestin moyen antérieur (AMG) impliqués dans l'alcalinisation de la lumière intestinale. Adapté de (Boudko *et al.*, 2001; Linser *et al.*, 2009).

Onken *et al.* (2008) ont inhibé les protéines impliquées dans le processus d'alcalinisation de la lumière intestinale chez des larves d'*Ae. aegypti* et ont montré que

seule l'inhibition des V-ATPases induisait une forte acidification du pH de la lumière intestinale. Comme le pH affecte la solubilisation du cristal de *Bti* (Lacey, 2007), la conformation des toxines (Venugopal *et al.*, 1992; Feng et Bechtel, 1994), les activités des enzymes digestives (Karumbaiah *et al.*, 2007) et la formation de pores (Tran *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2005), **l'altération du pH intestinal pourrait avoir une action globale permettant de réduire la sensibilité des larves aux toxines du *Bti*** (Figure 65 – II). L'utilisation d'ARN interférant, permettant d'inhiber spécifiquement l'expression de certains gènes, permettrait de valider/infirmier cette hypothèse. De plus, il serait judicieux de comparer le pH intestinal de chaque segment d'intestin de larves des deux souches pour vérifier si le pH des larves LiTOX est plus acide. Plusieurs méthodes ont déjà été développées pour réaliser ces mesures (Skibbe *et al.*, 1996; Boudko *et al.*, 2001; Erban et Hubert, 2010) mais, étant laborieuses et nécessitant un matériel et un savoir-faire spécifiques, elles sont actuellement en cours d'évaluation dans le cadre d'une collaboration avec un autre laboratoire de recherche.

2. Selon la région de l'intestin considérée, les V-ATPases se trouvent fixées soit dans la membrane basale de la cellule (intestin moyen antérieur) soit dans la membrane apicale (cæca, intestin moyen postérieur). Les V-ATPases se colocalisent avec des récepteurs avérés des toxines Cry dans les cæca et l'intestin moyen postérieur, régions de l'appareil digestif connues pour fixer avec une forte affinité les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cry11Ba (Figure 67).



**Figure 67.** Localisation des V-ATPases ainsi que des récepteurs membranaires des toxines Cry décrits chez *Ae. aegypti* dans les cellules épithéliales de différentes régions de l'appareil digestif de la larve. GC, cæca gastriques ; AMG, intestin moyen antérieur (anterior midgut) ; PMG, intestin moyen

inférieur (posterior midgut); MT, tubes de Malpighi ; CM, membrane cœcale ; PT, matrice péritrophique. Les zones de fixation des toxines Cry du *Bti* et de Cry11Ba ainsi que leur affinité sont indiquées. Source des illustrations : (Linser *et al.*, 2009). Source des pictogrammes : (Bravo *et al.*, 2007). Source des informations relatives aux V-ATPases : (Linser *et al.*, 2009; Harvey *et al.*, 2010), aux récepteurs membranaires : (Chen *et al.*, 2009a; Chen *et al.*, 2009b; Likitvivanavong *et al.*, 2011b) et à la fixation des toxines aux différentes régions de l'appareil digestif : (Ravoahangimalala *et al.*, 1993; Ravoahangimalala et Charles, 1995; Yamagiwa *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2004).

De plus, les sous-unités B à E des V-ATPases ont été décrites comme capables de se fixer à la toxine Cry4Ba chez *Ae. aegypti* (Bayyareddy *et al.*, 2009) et les sous-unités A et B à la toxine Cry1Ac chez les lépidoptères *Heliothis virescens* (Krishnamoorthy *et al.*, 2007) and *Helicoverpa armigera* (Chen *et al.*, 2010).

Sachant que les V-ATPases ont déjà été décrites comme des récepteurs potentiels et en considérant leur position au niveau de l'intestin, il est possible que **la diminution de leur expression provoque une diminution de la fixation des toxines Cry à la membrane**, induisant un phénotype de résistance (Figure 65 – IV). Cette hypothèse nécessite d'être validée, notamment par l'utilisation d'ARN interférants mais également en mesurant la capacité de fixation des toxines Cry du *Bti* par les V-ATPases détectées sous-exprimées en DIGE.

#### (d) Calréticulines

Une unique **calréticuline** a été identifiée à partir de l'analyse DIGE. Détectée comme un gros spot irrégulier surexprimé +10,74 fois chez la souche LiTOX dans les premiers gels, le second réplicat biologique a permis d'identifier clairement 4 spots différents respectivement -2,56, +2,75, +3,01 et +3,14 fois différentiellement exprimés chez la souche LiTOX (Tableau 9 ; Article V, Tableau S5). Le gène codant pour cette même calréticuline n'est pas détecté comme différentiellement transcrit en microarrays (Article V, Tableau S1). Les calréticulines membranaires sont impliquées dans de nombreuses fonctions (Coppolino et Dedhar, 1998) et peuvent notamment intervenir au niveau de la réponse immunitaire suite à des infections virales et parasitaires (Rodriguez *et al.*, 2007; Limjindaporn *et al.*, 2009). Une calréticuline très proche de celle détectée en DIGE (85% d'identité de séquence protéique) a été décrite comme un récepteur aux oochinètes de *Plasmodium vivax* dans l'intestin moyen de larves du moustique *Anopheles albimanus* (Rodriguez *et al.*, 2007). Les calréticulines pourraient ainsi jouer un rôle dans la reconnaissance du *Bti* ou d'autres microorganismes présents dans la litière végétale qui infecteraient l'insecte et stimuleraient sa réponse immunitaire (Figure 65 – VII).

(e) *Enzymes de détoxification*

Parmi les cinq transcrits de **monoxygénases à cytochromes P450** détectés en microarrays, *CYP4D24* est surexprimé +10,67 fois chez la souche LiTOX tandis que les autres (*CYP6N9*, *CYP6Z7*, *CYP6Z8* et *CYP9M9*) sont sous-exprimés respectivement -5,02, -5,89, -20,9 et -9,87 fois (Article V, Tableau S2). Les enzymes de détoxification sont souvent impliquées dans la dégradation de petites molécules telles que les insecticides chimiques et les composés allélochimiques de plantes (Despres *et al.*, 2007; Feyereisen, 2011). Il est cependant peu probable que ces enzymes soit capables de dégrader de grosses protéines telles que les toxines du *Bti*. La synthèse des enzymes de détoxification représente un coût énergétique important pour l'insecte (Zeng *et al.*, 2009). De plus, plusieurs gènes sous-transcrits chez la souche LiTOX ont été décrits comme surexprimés chez des souches d'*Ae. aegypti* résistantes ou exposées à des insecticides chimiques (Poupardin *et al.*, 2008). Ainsi, même si la surexpression de *CYP4D24* peut être liée à une réponse aux composés phénoliques végétaux contenus dans la litière toxique (David *et al.*, 2006), la sous-expression des quatre gènes codants pour des enzymes de détoxification pourrait refléter un mécanisme compensatoire de réallocation d'énergie chez la souche LiTOX.

(4) **Conclusions et perspectives**

Cette approche combinant transcriptomique et protéomique sur un tissu larvaire spécifique, lieu d'action du *Bti*, a permis d'étudier l'expression des gènes mais également l'abondance relative des protéines en accédant notamment à leurs modifications post-traductionnelles. Grâce à cette approche, nous avons détecté des **altérations de l'expression constitutive de gènes et protéines à plusieurs étapes du mode d'action du *Bti***.

Une étude similaire pourrait être réalisée pour mesurer la réponse inductible chez des **larves exposées à des doses subléthales de *Bti***. Des approches transcriptomiques et protéomiques ont déjà été réalisées sur des larves de Lépidoptères pré-exposées à Cry1Ab, Cry1Ac ou à un cocktail de toxines Cry (Meunier *et al.*, 2006; van Munster *et al.*, 2007; Valaitis, 2008; Yuan *et al.*, 2011). Ces approches ont fait ressortir des modifications importantes de l'expression d'enzymes de détoxification mais également de V-ATPases, de récepteurs membranaires ainsi que de protéases. Une approche par microarray réalisée sur des larves d'*Ae. aegypti* pré-exposées à des doses subléthales de toxine Cry11Aa semble montrer des modifications de l'abondance de phosphatases alcalines et d'aminopeptidases N (travaux non publiés, cités dans Likitvivanavong *et al.* (2011b)). Aucune étude n'a été réalisée en pré-exposant des larves aux toxines Cry4Aa et/ou Cry4Ba ni même avec le *Bti*

complet. En exposant des larves de la souche LiTOX et de la souche sensible à des doses subléthales de *Bti*, il serait peut-être possible de comparer la réponse constitutive et la réponse induite et ainsi de mieux caractériser les mécanismes de résistance développés par la souche LiTOX.

Ces approches globales permettent d'avoir une vision d'ensemble des mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance. Cependant, elles ne permettent qu'une description superficielle de ces mécanismes, n'apportant aucune preuve fonctionnelle de leur implication. De plus, selon l'échelle considérée (larve entière ou tissu spécifique) et la méthode utilisée, les résultats peuvent paraître contradictoires dû à des limitations techniques et/ou biologiques, nuisant à la compréhension globale de la résistance. Ainsi, il apparaît maintenant nécessaire de valider le rôle de chaque mécanisme majeur détecté par ces approches globales à l'aide d'approches fonctionnelles. La plupart des approches globales ont fait ressortir de nombreuses protéases ainsi que des récepteurs membranaires différenciellement exprimés. Une caractérisation complète des activités enzymatiques ainsi qu'une mesure de la capacité de fixation des toxines du *Bti* par les récepteurs membranaires ont été réalisées.

## **2. Analyses fonctionnelles des mécanismes de résistance potentiels identifiés**

### ***a) Rôle des protéases dans la résistance***

Comme nous l'avons vu précédemment (page 90), la modification de l'expression et/ou de l'activité d'enzymes digestives impliquées dans l'activation des toxines Cry est un des mécanismes majeurs développés par les insectes pour résister aux toxines Cry de *Bt*. De plus, ce mécanisme de résistance est très souvent généraliste et n'induit que des résistances modérées, ce qui est le cas pour la souche LiTOX.

#### **(1) Bioessais comparatifs avec des toxines activées**

##### *(a) Etat de l'art*

Pour déterminer si une modification au niveau des enzymes digestives est partiellement ou totalement responsable de la résistance au *Bt*, une première étape consiste à réaliser des bioessais avec des toxines activées et non-activées. De cette manière, on court-circuite l'étape d'activation, supprimant le phénotype de résistance si cette étape est impliquée. Cette approche a déjà été réalisée pour comparer des souches sensibles et résistantes de Lépidoptères (Mohan et Gujar, 2003). Pour les Lépidoptères, des feuilles sont

coupées en forme de cercle et imprégnées soit de protoxines soit de toxines activées qui seront mangées par la larve (Tabashnik *et al.*, 1990; Mohan et Gujar, 2003). La problématique des moustiques est sensiblement différente pour deux raisons. Tout d'abord, les larves de moustiques étant aquatiques, elles vivent directement dans le milieu contenant l'insecticide au lieu de ne le trouver que dans la nourriture comme pour les Lépidoptères. Ensuite, les larves de moustiques ne se nourrissent que de particules suffisamment grosses (Clements, 1992). Ainsi, les toxines solubilisées sont diluées dans le milieu et ne sont donc plus recherchées par les larves qui ne les ingéreront que très peu, diminuant de manière importante leur toxicité.

Pour pallier cela, il est nécessaire de mettre les protoxines et toxines solubles sous une forme particulière, permettant aux larves de les déceler comme de la nourriture et de les ingérer. Plusieurs méthodes ont déjà été développées :

Une fois solubilisées, les toxines peuvent être **précipitées en milieu acide** (pH 4,5) par l'ajout d'acide citrique (12% w/v) (Chilcott et Ellar, 1988). Après centrifugation, les bioessais sont réalisés en disposant les larves dans un tampon de citrate de sodium (2 mM) à pH 4,5 afin que le précipité ne se resolubilise pas, même partiellement.

Une deuxième approche propose d'utiliser des **billes de latex** de 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur lesquelles sont adsorbées les toxines solubles (Schnell *et al.*, 1984). Les larves ingèrent ainsi les billes contenant les toxines solubles, permettant de rétablir leur toxicité voire même de devenir plus toxiques que les toxines sous forme de cristal.

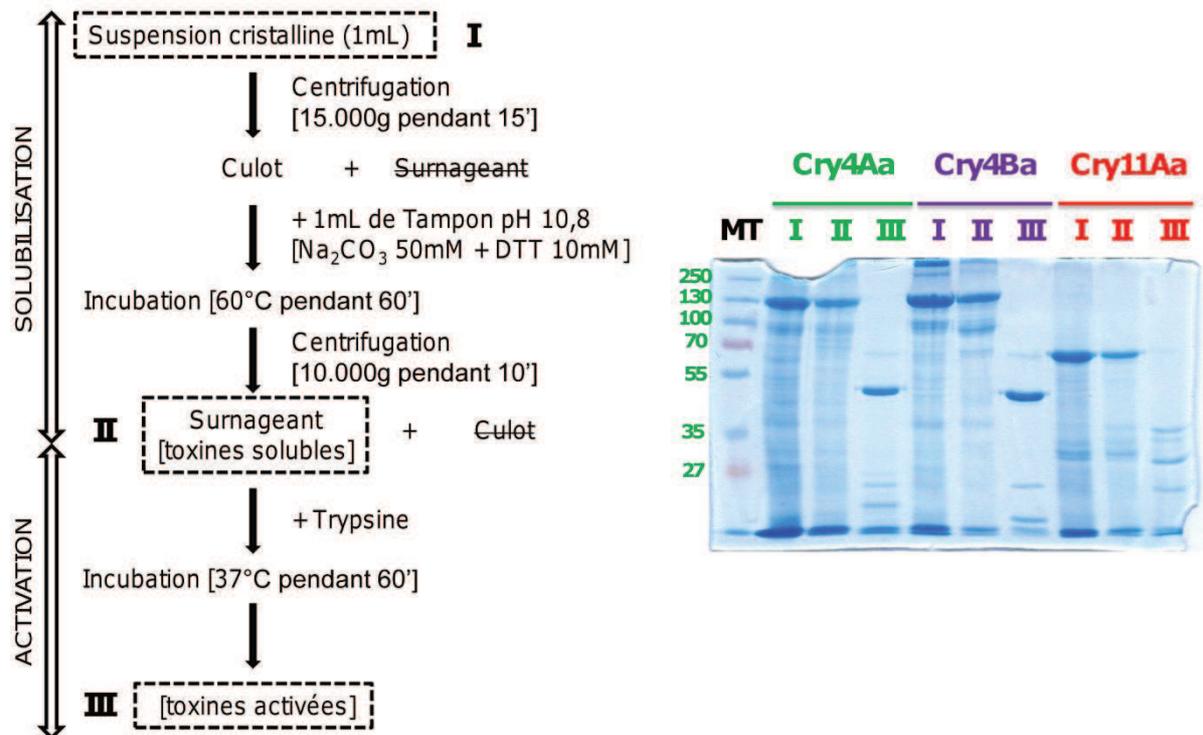
Une dernière approche utilise les propriétés du **FIA** (Freund Incomplete Adjuvant) qui permet de réaliser une émulsion, capturant les toxines solubles dans des microgouttelettes lipidiques de 2,5 à 12,5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Cheung et Hammock, 1985).

Toutes ces techniques permettent de rétablir la toxicité des toxines solubles à un niveau équivalent voire supérieur aux toxines sous leur forme cristalline. Cependant, chacune de ces approches introduit un paramètre supplémentaire (*e.g.* pH acide, billes de latex, gouttelettes lipidiques) qui, même s'il n'induit aucune mortalité directe sur les larves, pourrait influencer les différences observées entre les souches sensibles et résistantes. De plus, ces méthodes sont relativement laborieuses et peuvent s'avérer très coûteuses (*e.g.* celle utilisant le FIA). J'ai ainsi cherché à développer une nouvelle méthode de bioessais qui permettrait de comparer la toxicité des protoxines solubilisées aux toxines solubilisées activées sans ajouter de produit ni réaliser l'expérimentation en pH acide mais simplement en **miniaturisant le bioessai**. Cela permet aux larves de se retrouver dans un volume

restreint, les obligeant à ingérer le produit, diminuant ainsi la quantité de produit nécessaire pour réaliser le bioessai.

(b) Mise en place du protocole

Les protoxines sont solubilisées puis activées selon le protocole décrit dans la Figure 68.

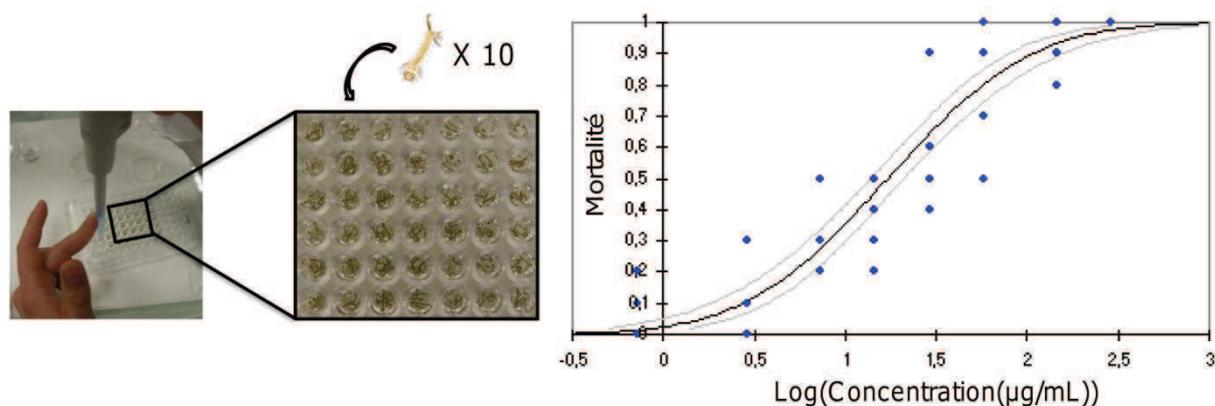


**Figure 68.** Protocole de solubilisation et d'activation des protoxines du *Bti* (gauche) et gel SDS-PAGE des protoxines sous forme cristalline (I) et solubles (II) et des toxines activées solubles (III) de Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa (droite).

Les protoxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa font des tailles d'environ 130, 130 et 70kDa respectivement (Figure 68), ce qui est cohérent avec les valeurs issues de la littérature (Angsuthanasombat *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Lacey, 2007). Une fois activées, les toxines Cry4Aa et Cry4Ba font une taille d'environ 47kDa alors que l'activation de la toxine Cry11Aa génère deux bandes d'environ 32 et 36kDa (Figure 68) (Yamagiwa *et al.*, 2002; Lacey, 2007). Dans les bioessais, nous utilisons ainsi les protoxines sous forme cristalline, sous forme soluble et les toxines solubilisées activées. Les deux premières conditions permettent de valider la méthode en vérifiant que la solubilisation induit peu ou pas de diminution de la toxicité des protoxines.

Dix larves de stade 3 sont déposées dans un puits de microplaque (96 puits) contenant 200 µL d'eau du robinet (Figure 69). 54 puits sont laissés sans insecticide (témoins négatifs), montrant une faible mortalité larvaire après 24h (3,33%) comparable à

celle obtenue avec des bioessais classiques. Cependant, une exposition de 48h entraînant une mortalité importante des larves témoins (20,37%), les comptages ont été réalisés uniquement après 24h d'exposition.



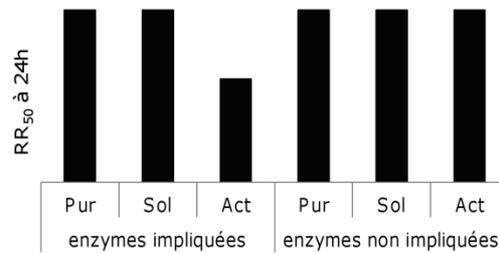
**Figure 69.** Mise en place des larves dans les puits de plaques de 96 puits à l'aide d'une pipette au cône tronqué (gauche) et courbe sigmoïdale obtenues pour des larves sensibles exposées 24h à la protoxine Cry11Aa solubilisée, représentatif des profils obtenus pour toutes les toxines et toutes les conditions. Les valeurs de mortalité obtenues sont indiquées par des points bleus, le modèle probit par une courbe noire et les intervalles de confiance à 95% par des lignes grises.

Pour chaque condition et chaque souche, 8 doses réalisées chacune en quadruplas ont été testées. La courbe de mortalité en fonction du logarithme de la concentration en toxine montre une courbe sigmoïdale similaire à celles obtenues avec des bioessais en gobelets (Figure 69). La technique semble donc opérationnelle pour comparer les larves des souches LiTOX et sensible.

Comme nous l'avons décrit précédemment (page 98), la souche LiTOX présente deux cohortes (phénotypes « normaux » et « tardifs ») présentant des niveaux de résistance différents pour les toxines du *Bti*, suggérant des mécanismes de résistance différents. Nous avons ainsi voulu tester les deux cohortes de la souche LiTOX (génération 25) à l'aide de cette méthode de bioessais.

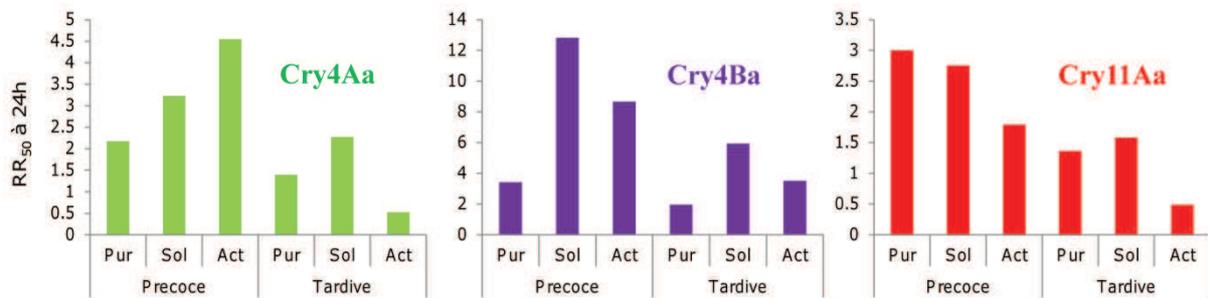
### (c) Résultats et discussion

Ainsi, deux cas de figure sont attendus : si la résistance est liée, au moins partiellement, à une altération de l'activation des protoxines, on observera une diminution du niveau de résistance de la souche LiTOX comparé à la souche sensible alors qu'aucune variation n'est attendue si la résistance n'implique aucune enzyme digestive (Figure 70).



**Figure 70.** Résultats attendus dans le cas de l'implication des enzymes digestives dans la résistance (gauche) ou non (droite). Pur, protoxines cristallines ; Sol, protoxines solubilisées ; Act, toxines solubilisées et activées.

Les rapports de résistance ( $RR_{50}$ ) ont été calculés en divisant les  $LC_{50}$  obtenues avec chacune des cohortes de LiTOX par les  $LC_{50}$  obtenues avec la souche sensible après 24h d'exposition (Figure 71).



**Figure 71.** Rapports de résistance calculés à 24h pour la toxine Cry4Aa (gauche, vert), Cry4Ba (centre, violet) et Cry11Aa (droite, rouge) en divisant les  $LC_{50}$  des larves de LiTOX de la cohorte normale (précoce) ou tardive par les  $LC_{50}$  des larves sensibles. Pur, protoxines cristallines ; Sol, protoxines solubilisées ; Act, toxines solubilisées et activées.

Seul le profil obtenu avec la toxine Cry11Aa est cohérent avec une résistance liée partiellement à une altération de l'étape d'activation de la protoxine. Cependant, on remarque que les  $RR_{50}$  obtenus sont nettement plus faibles que ceux obtenus à l'aide de la méthode classique de bioessais. Cela remet en cause la fiabilité des données obtenues par ce type de bioessais. L'application de ce protocole semble avoir modifié l'expression du phénotype de résistance. Les larves se trouvant dans un volume restreint, elles se trouvent obligées d'ingérer le produit, ce qui peut réduire la résistance si une part est liée à une **modification comportementale**.

Ce protocole n'ayant pas apporté de données claires, il apparaît maintenant intéressant de tester les trois approches décrites précédemment. Cependant, si la résistance est partiellement liée à une modification comportementale, les techniques d'émulsion et de billes de latex vont induire une modification, non pas liée aux enzymes digestives mais plutôt à une augmentation de l'appétence. De même, réaliser un bioessai en pH acide, connaissant l'importance du pH pour de nombreuses fonctions physiologiques de la larve, peut induire de nombreux bouleversements et une altération du phénotype de résistance non uniquement

liée au court-circuitage de l'étape d'activation. Ainsi, il semble nécessaire de **réaliser au moins deux des trois techniques** précédemment citées pour pouvoir comparer les résultats obtenus afin de s'assurer qu'aucun des traitements n'entraîne de faux-positifs liés à la technique. La réalisation de ces techniques demandant un temps de mise au point conséquent, elle n'ont pu être réalisées dans le cadre de cette thèse.

## (2) Caractérisation des enzymes de la lumière intestinale et rôle dans la résistance

Afin de caractériser l'implication des enzymes solubles sécrétées dans la lumière intestinale du tube digestif, nous avons réalisé plusieurs expériences sur des larves de la souche LiTOX et de la souche sensible. Les activités protéolytiques des enzymes du tube digestif des deux souches ainsi que leur capacité d'activation des protoxines du *Bti* ont été mesurées. Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés avec l'aide de Renaud Stalinski lors de son stage de Master II BEE (Biodiversité, Ecologie, Environnement) sous mon encadrement et celui de Laurence Després. Ils ont été valorisés par un article en préparation pour le *Journal of Invertebrate Pathology* (Article VII).

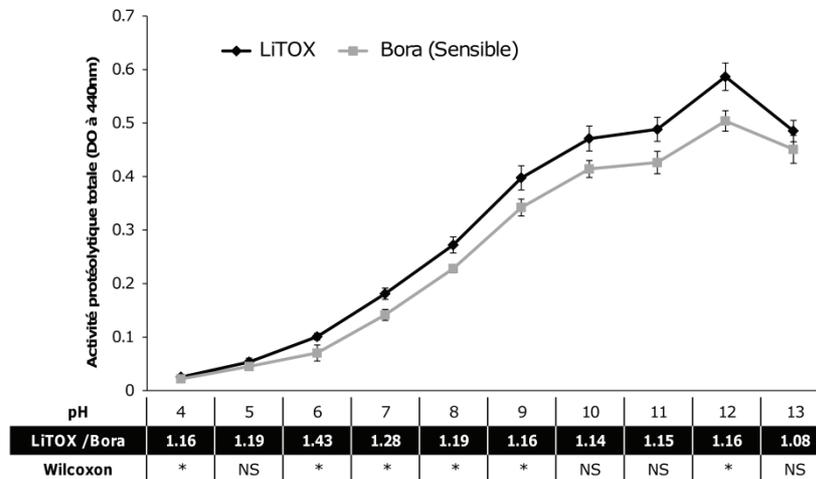
### (a) Extraction des enzymes de la lumière intestinale

Pour chaque souche, trois réplicats biologiques, consistant en trois mises en eau d'œufs pondus à différentes dates, ont été réalisés. Les intestins moyens de 20 larves ont été extraits sur glace puis déposés ensemble dans 50 $\mu$ L d'eau distillée, homogénéisés 30 secondes à l'aide d'un vortex puis centrifugés à 12.000g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants correspondants à des larves issues du même réplicat biologique ont été poolés. La concentration en protéines est calculée à l'aide d'un test de Bradford en utilisant une gamme de BSA comme standard (Bradford, 1976). Les extraits enzymatiques ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### (b) Mesure de l'activité protéolytique totale

L'activité totale des protéases présentes dans les extraits enzymatiques intestinaux a été mesurée pour chaque pH entre 4 et 13 en utilisant comme substrat l'azocaséine (Sigma Aldrich), tel que décrit dans (Hosseininaveh *et al.*, 2007). Ce substrat est constitué d'une protéine (caséine) liée à un chromophore dont l'hydrolyse par des protéases génère de petits peptides solubles dans l'acide trichloroacétique (TCA). Toutes les activités enzymatiques ont été réalisées dans un tampon TU (40 mM acide acétique, 40 mM acide phosphorique et 40 mM acide borique) ajusté à chaque pH à l'aide de soude (NaOH). Pour chaque souche et chaque pH, la même quantité de protéines totales est utilisée et la réaction est réalisée en

triplicats. Le protocole suivi est détaillé en Annexe IV. Pour chaque pH, les activités protéolytiques sont comparées entre les deux souches à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 2.8.1 (R, 2007).



**Figure 72.** Activité azocaséolytique totale d'extraits enzymatiques de la souche LiTOX et de la souche sensible. Pour chaque pH de 4 à 13, les rapports de densité optique mesurée à 440 nm de LiTOX divisé par ceux de la souche sensible (Bora) et les tests statistiques (test de Mann-Whitney) sont indiqués. Les densités optiques de la souche LiTOX sont représentées par des losanges noirs et celles de la souche sensible par des carrés gris. NS, différences non significatives ; \*, p-valeur < 0,05. Erreur : erreur standard.

**L'activité protéolytique totale est significativement 26% plus importante** pour 6 des 10 pH testés chez la souche LiTOX, avec un maximum de 43% d'augmentation de l'activité à pH 6 (Figure 72).

### (c) Mesures d'activités protéolytiques spécifiques

Pour déterminer quelles enzymes sont responsables de cette augmentation d'activité protéolytique globale, deux approches ont été réalisées : soit en mesurant l'activité protéolytique à l'aide d'azocaséine tel que décrit précédemment en utilisant des inhibiteurs spécifiques de certaines classes d'enzymes, soit en utilisant des substrats spécifiques. Nous nous sommes focalisés sur plusieurs classes d'enzymes, notamment les trypsines et chymotrypsines, responsable de la majorité de l'activité protéolytique totale, étant impliquées dans l'activation des protoxines et dans de nombreux cas de résistance aux toxines Cry chez différents insectes (Huang *et al.*, 1999; Candas *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Karumbaiah *et al.*, 2007). Nous nous sommes également intéressé aux leucine-aminopeptidases, un gène ayant été détecté par l'approche DArT chez la souche LiTOX douze générations auparavant (page 101) (Bonin *et al.*, 2009), ainsi qu'aux carboxypeptidases A et B, des gènes codants pour des metalloprotéases solubles ayant été trouvés sous-exprimés chez la souche LiTOX (page 118) (Tetreau *et al.*, 2012a).

(i) *Mesure d'activités protéolytiques spécifiques par l'utilisation d'inhibiteurs*

L'effet de quatre inhibiteurs différents sur l'activité protéolytique totale a été testé (Tableau 11). Les concentrations utilisées représentent la quantité d'inhibiteur la plus faible permettant d'obtenir une inhibition maximale (déterminées après le test de plusieurs concentrations différentes).

**Tableau 11.** Inhibiteurs utilisés pour caractériser la part de chaque classe d'enzyme dans l'activité protéolytique totale. Les classes d'enzymes inhibées ainsi que la concentration finale utilisée sont indiquées. PMSF, phénylméthylsulfonyl fluoride ; TLCK, tosyl-L-lysine chloromethyl ketone ; TPCK, tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone ; EDTA, acide éthylène diamine tétracétique.

Inhibiteur utilisé	PMSF	TLCK	TPCK	EDTA
Protéases inhibées	Protéases à sérine	Trypsines	Chymotrypsines	Métalloprotéases
Concentration (mM)	30	1,5	1,5	1

Les extraits enzymatiques sont pré-incubés pendant 15 minutes avec un des quatre inhibiteurs à température ambiante avant de mesurer l'activité protéolytique avec de l'azocaséine à pH 9 tel que décrit en Annexe IV. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité protéolytique totale mesurée à pH 9 sans inhibiteur (Tableau 12). Pour chaque inhibiteur, les activités sont comparées entre les deux souches à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 2.8.1 (R, 2007).

**Tableau 12.** Activité protéolytique totale et effet des inhibiteurs de protéases. NS, différences non significatives ; \*, p-valeur < 0,05. Erreur : erreur standard.

Souche	Activité protéolytique totale (DO à 440 nm)	Pourcentage d'inhibition de l'activité totale (%)			
		PMSF	TLCK	TPCK	EDTA
Sensible	0,328 ± 0,009	92,98 ± 0,57	46,82 ± 1,02	23,42 ± 2,24	12,18 ± 1,74
LiTOX	0,356 ± 0,010	92,31 ± 0,23	42,01 ± 2,29	20,87 ± 1,64	-1,74 ± 4,55
Wilcoxon	*	NS	NS	NS	*

Les protéases à sérine inhibées par le PMSF sont responsables de plus de 90% de l'activité protéolytique totale (Tableau 12). Parmi elles, les trypsines et chymotrypsines, inhibées par le TLCK et le TPCK, sont responsables respectivement de plus de 40% et 20% de l'activité protéolytique totale. Aucune différence significative n'est observée pour ces trois catégories d'enzymes entre les deux souches. Cependant, les métalloprotéases représentent plus de 12% de l'activité totale chez la souche sensible alors qu'aucune inhibition n'a été mesurée chez la souche LiTOX (Tableau 12). La littérature étant encore contradictoire sur la capacité de l'EDTA à inhiber certaines métalloprotéases telles que les leucine-aminopeptidases (Matsui *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2008) et les carboxypeptidases (Igc *et al.*, 2003; Alonso-del-Rivero *et al.*, 2009), l'utilisation d'inhibiteurs non-chélateurs,

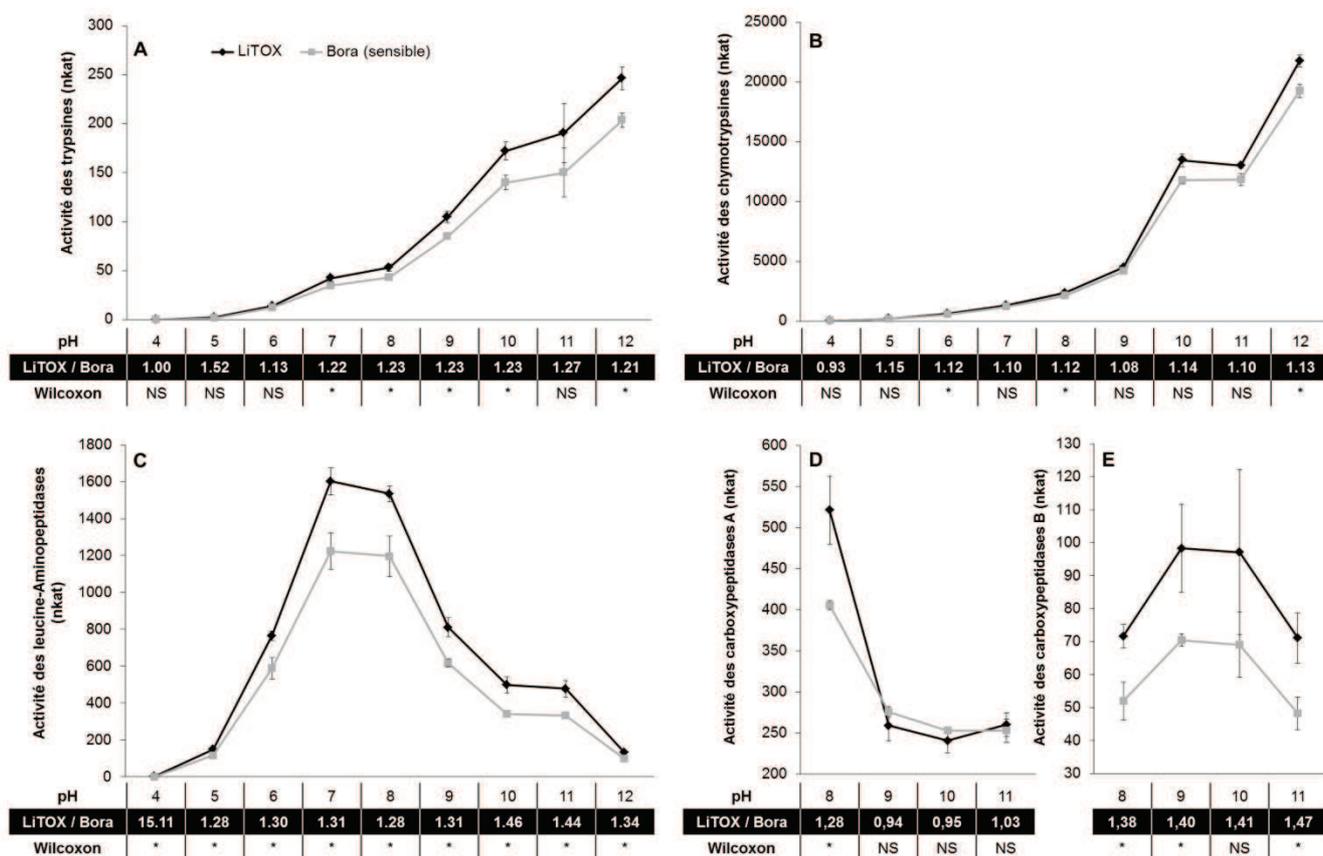
telle que la bestatine pour les aminopeptidases (Matsui *et al.*, 2006), semble nécessaire pour affiner les résultats obtenus avec l'EDTA. Cependant, comme la famille des métalloprotéases rassemble les enzymes non pas sur la base d'homologie de séquence ou de substrat mais sur leur capacité à utiliser des ions métalliques comme cofacteurs, il existe autant de substrats spécifiques que de métalloprotéases décrites. Cela rend l'approche par substrat spécifique coûteuse et laborieuse, raison pour laquelle elle n'a pas été envisagée pour l'ensemble des métalloprotéases lors de cette étude.

*(ii) Mesure d'activités protéolytiques spécifiques par l'utilisation de différents substrats*

Les activités des trypsines, chymotrypsines et leucine-aminopeptidases sont mesurées pour des pH de 4 à 12 en utilisant respectivement comme substrats le BApNA (N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide; Sigma Aldrich), le SAApNA (N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide; Sigma Aldrich) et la leucine p-nitroanilide (Sigma Aldrich) à une concentration finale de 10 mM. L'hydrolyse de ces substrats par les enzymes intestinales libère la p-nitroanilide, qui produit une réaction jaune intense dont l'absorbance est mesurée à 400 nm. Le protocole suivi est détaillé en Annexe IV

Les activités des carboxypeptidases A et B sont mesurées pour des pH de 8 à 11 en utilisant respectivement comme substrats le FAPP (N-(3-[2-furyl]acryloyl)-phenylalaline-phenylalaline; Sigma Aldrich) et le FAAK (N-(3-[2-furyl]acryloyl)-alanine-lysine; Sigma Aldrich) à une concentration finale de 10 mM. On mesure dans ce cas la dégradation du substrat qui émet à 330 nm. Le protocole suivi est détaillé en Annexe IV.

La cinétique de l'hydrolyse des substrats est mesurée sur un intervalle de 10 min toutes les 5 secondes. La pente de la partie linéaire de la courbe est calculée pour obtenir l'activité enzymatique exprimée en nmol de produit formé par minute par mg de protéine totale (nanokatal, nkat). Pour chaque pH et chaque substrat, les activités protéolytiques sont comparées entre les deux souches à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 2.8.1 (R, 2007).



**Figure 73.** Activité des trypsines (A), chymotrypsines (B), leucine-aminopeptidases (C) et des carboxypeptidases A (D) et B (E). Les activités sont exprimées en nanokatal (nmol de produit formé par minute par mg de protéine totale) pour chaque pH. Les activités enzymatiques de la souche LiTOX sont représentées par des losanges noirs et celles de la souche sensible par des carrés gris. NS, différences non significatives ; \*, p-valeur < 0,05. Erreur : erreur standard.

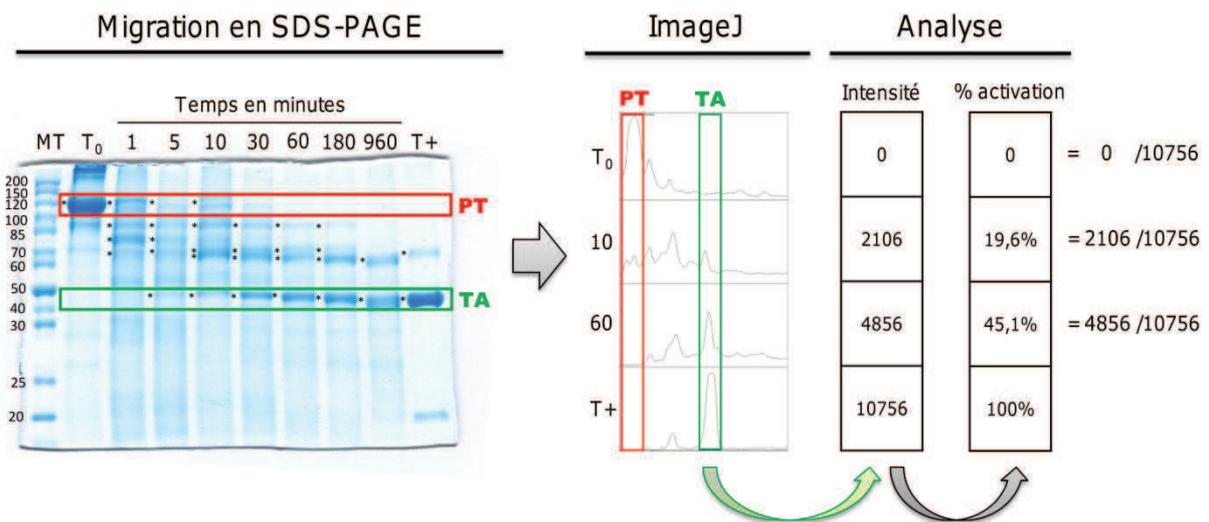
On observe une augmentation significative de l'activité des trypsines pour les pH alcalins (23%, pH de 7 à 12) alors que l'activité des chymotrypsines n'est que modérément (12%) mais significativement plus importante pour les pH 6, 8 et 12 chez la souche LiTOX (Figure 73A,B), avec un maximum d'activité mesurée à pH 12 pour les deux enzymes. L'activité des leucine-aminopeptidases est significativement plus importante (34%) pour les 9 pH testés, avec un maximum d'activité mesuré à pH 7 (Figure 73C). Les carboxypeptidases A sont significativement plus actives (28%) chez la souche LiTOX à pH 8 (Figure 73D) ainsi que pour les carboxypeptidases B (42%) à pH 8, 9 et 11 (Figure 73E). L'augmentation de l'activité des trypsines, chymotrypsines, leucine-aminopeptidases et carboxypeptidases (Figure 73) est concordante avec l'augmentation de l'activité protéolytique totale mesurée précédemment (Figure 72, page 131).

La souche LiTOX a été sélectionnée avec de la litière végétale contenant du *Bti* persistant. La **présence de nourriture naturelle des larves** de moustiques est connue pour fortement moduler l'expression et l'activité des protéases, notamment à cause de l'influence d'inhibiteurs de protéases des plantes naturellement présents dans les litières (Erlandson et

*al.*, 2010; Hivrale *et al.*, 2011). De plus, les larves sélectionnées sont exposées aux composants des feuilles, notamment des acides tanniques connus pour inhiber les activités protéolytiques (Xu et Qin, 1994). Pour survivre et conserver leurs capacités digestives, il est possible que les activités protéolytiques aient augmenté chez les larves résistantes (Brioschi *et al.*, 2007). Ainsi, la présence de litière végétale peut avoir aidé les larves à développer une résistance au *Bti* due à une augmentation des activités protéolytiques.

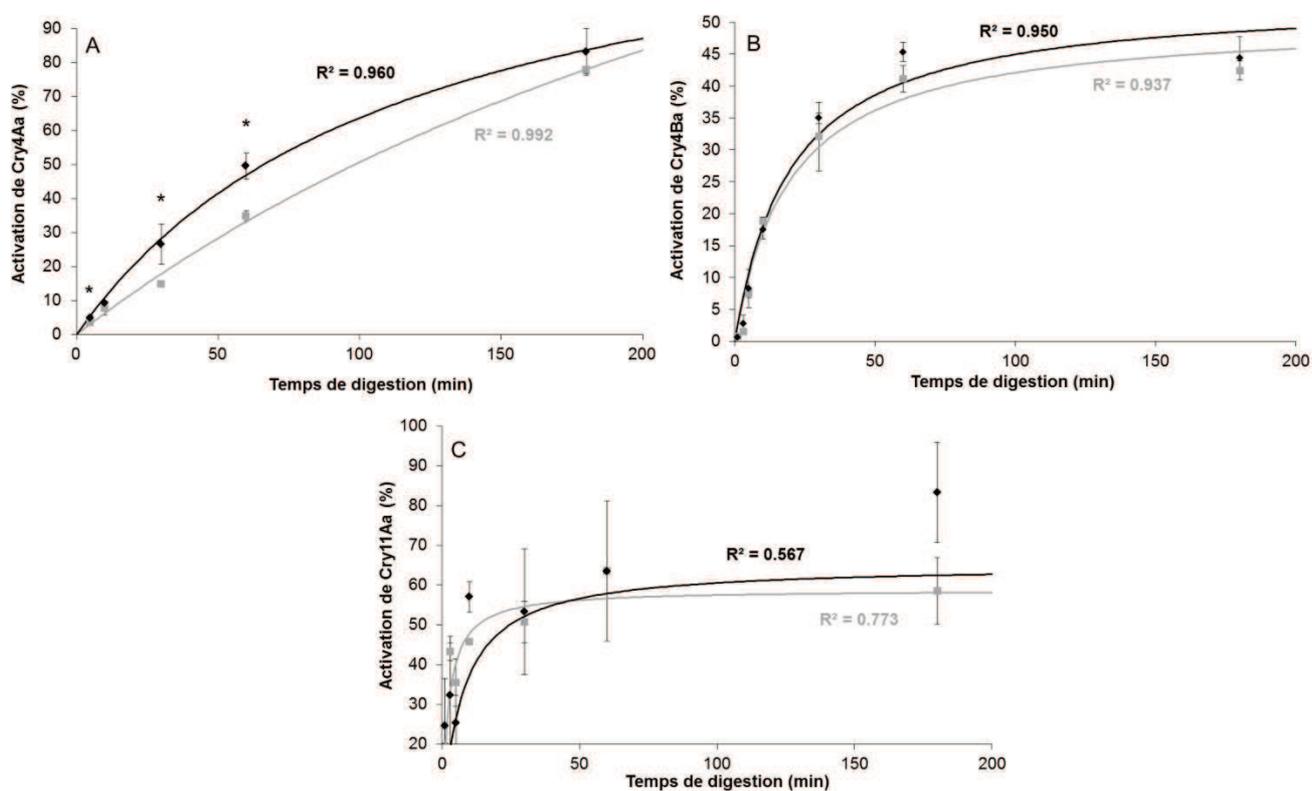
Dans cette approche, nous avons étudié l'implication des modifications constitutives des protéases dans la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX en comparant les activités protéolytiques des enzymes de la lumière intestinale de larves non-exposées au *Bti* des deux souches. Cependant, **une partie des mécanismes de résistance au *Bti* peut être inducible**, c'est-à-dire que les larves de la souche LiTOX peuvent exprimer des enzymes intestinales différentes après exposition au *Bti*. Par exemple, chez des larves de *Spodoptera frugiperda* exposées à des doses sublétales de Cry1Ca1, un gène codant pour une trypsine est inhibé, altérant l'activation des protoxines de Cry1Ca1 entraînant un phénotype de résistance (Rodriguez-Cabrera *et al.*, 2010). Ainsi, une résistance induite pourrait être une alternative permettant à la souche LiTOX de réduire les coûts liés à la résistance au *Bti*.

(d) *Activation des protoxines Cry par les protéases de la lumière intestinale*



**Figure 74.** Protocole d'analyse de la capacité d'activation de la protoxine Cry4Ba du *Bti* par les protéases intestinales. Les protoxines sont incubées 1, 5, 10, 30, 60, 180 et 960 min avec les extraits enzymatiques. Des témoins sans enzyme (T<sub>0</sub>) et un témoin positif activé avec de la trypsine bovine (T+) sont également réalisés. On observe ainsi une rapide disparition de la protoxine et une apparition progressive des toxines activées. Les différentes bandes de dégradations observées sont indiquées à par une étoile (\*). La protoxine (PT), les différentes bandes d'activation intermédiaires et la toxine activée (TA) sont séparées en SDS-PAGE. Les profils de migrations de chaque temps de digestion sont analysés à l'aide du logiciel ImageJ (ici T<sub>0</sub>, 10, 60 min et T+) et l'intensité des pics correspondants à la toxine activée est mesurée. Le pourcentage d'activation est calculé en divisant l'intensité des bandes par l'intensité de la bande du témoin positif.

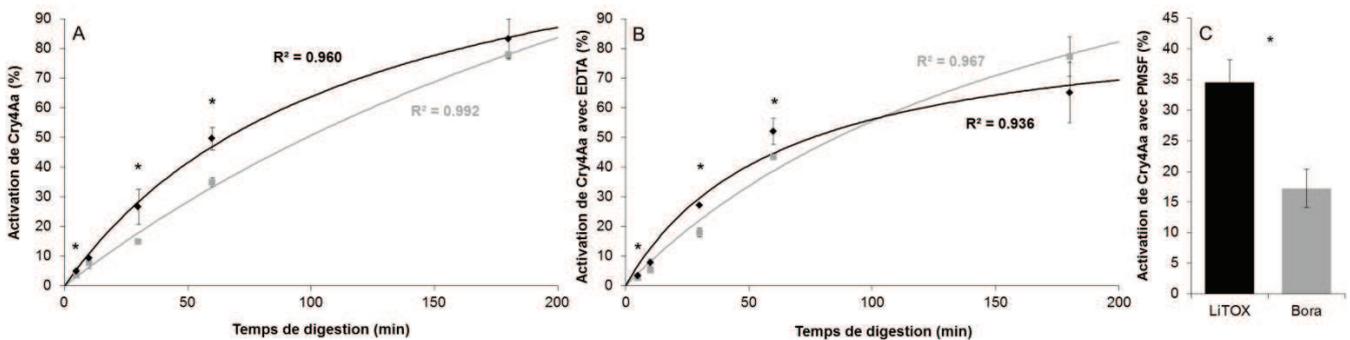
Les protoxines ont été produites en Nutrient Agar puis solubilisées et purifiées tel que décrit précédemment (pages 52 et 58). Les protoxines sont récupérées dans le tampon TU à pH 9 et sont quantifiées à l'aide d'un test de Bradford en utilisant une gamme de BSA comme standard (Bradford, 1976). Les protoxines sont incubées à 37°C pendant 1, 5, 10, 30, 60, 180 et 960 minutes avec 0,5 µg de protéines totales extraites de la lumière intestinale des larves. Un témoin positif consistant en une digestion 3h à 37°C des protoxines avec de la trypsine bovine (Sigma Aldrich) est également réalisé. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout d'une mixture contenant du bleu de dépôt et du DTT ainsi que par un chauffage de l'échantillon à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite mis à migrer dans un gel d'acrylamide à 10% pendant 1h30 à 140V (Figure 74). Les gels sont colorés avec du bleu de Coomassie puis numérisés. L'intensité des bandes d'activation est analysée avec le logiciel ImageJ (Girish et Vijayalakshmi, 2004). Le pourcentage d'activation est calculé en divisant l'intensité des bandes d'activation obtenue à chaque temps de digestion par l'intensité de la bande d'activation du témoin positif (Figure 74). Pour chaque temps de chaque toxine, les différences entre les deux souches sont comparées à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 2.8.1 (R, 2007).



**Figure 75.** Pourcentage d'activation des protoxines de Cry4Aa (A), Cry4Ba (B) et Cry11Aa (C) par les extraits enzymatiques en fonction du temps. La souche LiTOX est représentée par des losanges noirs et la souche sensible par des carrés gris. A chaque temps de digestion, les différences significatives ( $p$ -valeur < 0,05) entre les deux souches sont indiquées par une étoile (\*). Erreur : erreur standard.

Aucune différence dans la vitesse d'activation des protoxines en toxines n'a été détectée pour Cry4Ba et Cry11Aa (Figure 75B,C) alors que la protoxine Cry4Aa est significativement 15% plus activée à 5, 60 et 180 min de digestion chez la souche LiTOX par rapport à la souche sensible (Figure 75A).

Pour déterminer quelle famille d'enzyme participe à cette augmentation d'activation, les mêmes expérimentations sont réalisées en exposant les extraits enzymatiques avec du PMSF ou de l'EDTA pendant 15 min à température ambiante aux concentrations décrites précédemment (Tableau 11). Pour l'inhibition à l'EDTA, les analyses sont réalisées comme décrit précédemment. L'inhibition au PMSF entraînant une diminution drastique du pourcentage d'activation, seul le temps de digestion de 360 min a permis d'obtenir la bande d'activation de 47kDa et est donc considéré pour l'analyse.



**Figure 76.** Pourcentage d'activation de la protoxine Cry4Aa sans inhibiteur (A) ou avec de l'EDTA (B) en fonction du temps. La souche LiTOX est représentée par des losanges noirs et la souche sensible par des carrés gris. L'inhibition de l'activation par le PMSF après 360 min de digestion est également présentée (C). A chaque temps de digestion, les différences significatives ( $p$ -valeur  $< 0,05$ ) entre les deux souches sont indiquées par une étoile (\*). Erreur : erreur standard.

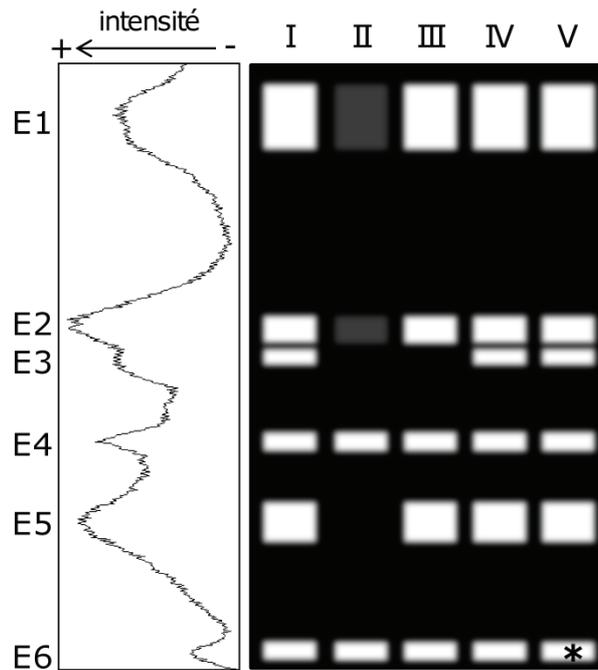
Malgré l'inhibition à l'EDTA, on observe toujours une augmentation significative, mais plus faible que sans inhibiteur (8%), de la vitesse d'activation à 5, 60 et 180 minutes de digestion chez la souche LiTOX par rapport à la souche sensible (Figure 76B). Après 360 minutes de digestion avec le PMSF, on observe une augmentation significative de 17% de l'activation de Cry4Aa chez la souche LiTOX (Figure 76C). Ces résultats suggèrent que les protéases non-inhibées par l'EDTA (*i.e.* majoritairement les protéases à sérine) sont seulement en partie responsables de l'augmentation de l'activation de la protoxine Cry4Aa chez la souche LiTOX et que les protéases non-inhibées par le PMSF (*i.e.* notamment les métalloprotéases) sont majoritairement impliquées.

Il a déjà été démontré que la précision du clivage des toxines Cry était essentielle pour leur toxicité, le non-clivage de 28 acides aminés des protoxines Cry1Ac ayant entraîné une résistance de 72 fois chez *H. armigera* (Rajagopal *et al.*, 2009). De même, une dégradation plus importante des toxines Cry1Ab induit une résistance chez *H. virescens*

(Forcada *et al.*, 1999). Dans notre cas, il est possible que l'activation plus rapide de Cry4Aa chez la souche LiTOX ait entraîné une dégradation plus importante de la toxine. Cependant, la résolution des gels n'a pas permis de déterminer si une faible modification de la constitution en acides aminés des toxines Cry4Aa est responsable de la résistance. Des analyses plus résolutive, notamment par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance), sont nécessaires pour pouvoir détecter des altérations potentielles des toxines Cry4Aa par les enzymes de la lumière intestinale de larves de la souche LiTOX.

*(e) Caractérisation des protéases présentes dans les extraits enzymatiques*

Pour déterminer le nombre de protéases présentes dans les extraits enzymatiques, des **zymogrammes** ont été réalisés. La nature des protéases détectées a été déterminée en exposant les extraits enzymatiques 15 minutes à température ambiante aux mêmes inhibiteurs que précédemment (Tableau 11, page 132). Chacun des trois réplicats biologiques d'extraits enzymatiques de chaque souche traité ou non traité aux inhibiteurs ont co-migré sur un gel SDS-PAGE natif pendant 6h30 à 90V et à 4°C, permettant de conserver la structure tridimensionnelle des protéines. Les gels sont ensuite rincés à l'eau distillée puis laissés toute la nuit à 4°C dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH 8) contenant 2% de caséine afin de permettre à ce substrat des protéases de pénétrer dans le gel. Le lendemain, le gel est placé à 25°C pendant 1h30 pour permettre la digestion de la caséine par les enzymes puis le gel est coloré au bleu de Coomassie. Le gel présente alors une forte coloration bleue liée à la présence de caséine non dégradée sauf au niveau des bandes contenant une ou plusieurs enzymes qui auront digéré la caséine et qui apparaîtront blanches. Le gel est numérisé et la présence ainsi que l'intensité des bandes sont estimées à l'aide du logiciel ImageJ v.1.41o (Girish et Vijayalakshmi, 2004). Afin de faciliter la discussion et la visibilité des résultats, une représentation schématique des patrons de distribution des bandes obtenues est présentée (Figure 77). Les photographies des zymogrammes ainsi que les profils obtenus à l'aide du logiciel ImageJ sont disponibles en figures S1 et S2 de l'article VII respectivement.



**Figure 77.** Représentation schématique synthétique des patrons de distribution des bandes obtenues par des zymogrammes réalisés sur les extraits enzymatiques des deux souches. Les profils sans inhibiteurs (I) ou avec du PMSF (II), du TLCK (III), du TPCK (IV) et de l'EDTA (V) sont indiqués. Les bandes sont annotées de la vitesse de migration la plus faible à la plus rapide, de E1 vers E6. Une étoile indique la bande observée chez les trois réplicats biologiques de la souche sensible mais absente des trois réplicats de la souche résistante. Le graphique de gauche représente l'intensité des bandes le long du gel mesuré pour le premier réplicat biologique de la souche LiTOX à l'aide du logiciel ImageJ. La présence des bandes dans les zymogrammes est indiquée ici par des bandes blanches alors qu'une inhibition partielle est indiquée par une bande grise.

Les zymogrammes ont permis de séparer **six bandes différentes présentant des activités protéolytiques** parmi les extraits enzymatiques des souches LiTOX et sensible (E1 à E6, Figure 77). Les bandes E1 et E2 ne sont que partiellement inhibées par le PMSF (environ 50% et 80% respectivement) indiquant soit qu'elles sont composées d'au moins deux classes d'enzymes différentes et seulement partiellement de protéases à sérine, soit que l'inhibition par le PMSF n'est pas maximale. La même expérimentation doit être réalisée avec des concentrations plus importantes de PMSF pour confirmer ces observations. La bande E3 est inhibée par le PMSF et le TPCK ce qui indique que cette bande est constituée de protéases à sérine de type trypsine. Aucun des inhibiteurs utilisés n'a induit de diminution ou de disparition de la bande E4, indiquant que la ou les enzymes qui la constituent ne sont ni des protéases à sérine, ni des métalloprotéases inhibables par l'EDTA. La bande E5 est complètement inhibée par le PMSF et est donc essentiellement constituée de protéases à sérine. L'inhibition de cette bande à l'aide des autres inhibiteurs est trop variable pour conclure sur la nature exacte des enzymes qui la composent. Enfin, la bande E6 est complètement inhibée par l'EDTA chez la souche LiTOX alors qu'elle ne l'est que partiellement (environ 20%) chez la souche sensible. Cela suggère que cette bande E6 est constituée d'au moins deux classes d'enzymes, dont l'une appartient aux métalloprotéases

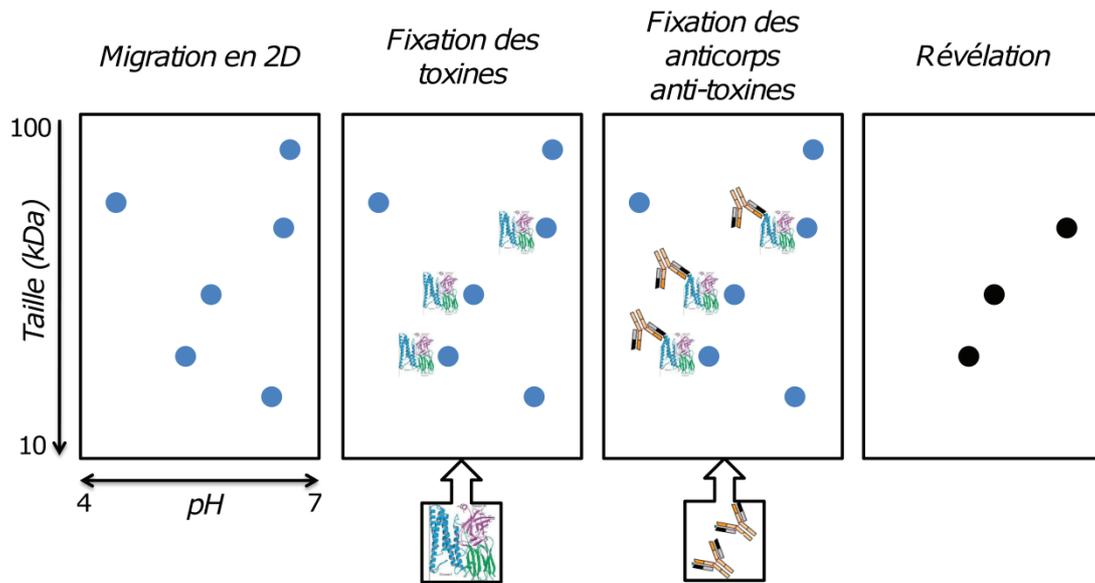
et n'est pas retrouvée dans les profils des trois réplicats biologiques de la souche LiTOX. Ces enzymes non inhibées par l'EDTA, sous-représentées chez la souche LiTOX, sont peut-être en partie responsable de la résistance au *Bti*. Un isolement et une caractérisation de ces enzymes sont nécessaires pour évaluer leur rôle dans le phénotype de résistance.

*(f) Conclusion sur l'implication des protéases dans la résistance au Bti*

Dans cette partie, nous avons montré que l'augmentation des activités des protéases à sérine et des métalloprotéases a un impact direct sur la vitesse d'activation de la protoxine Cry4Aa mais pas Cry4Ba ni Cry11Aa. Cela indique que la modification des activités protéolytiques chez la souche LiTOX n'affecte que l'activation de Cry4Aa, toxine pour laquelle la souche LiTOX montre le niveau de résistance le plus élevé (68-fois ; Figure 51, page 97). Ainsi, nos résultats montrent que la **résistance par modification des protéases peut être un mécanisme toxine-spécifique** contrairement à l'hypothèse couramment admise d'une résistance généraliste. Ces résultats indiquent également que la résistance par protéases ne permet pas d'expliquer la totalité de la résistance, notamment à Cry4Ba et Cry11Aa. La souche LiTOX a donc très probablement développé d'autres mécanismes de résistance, tels qu'une modulation de l'expression ou des modifications des récepteurs aux toxines Cry (Bonin *et al.*, 2009; Paris et Despres, 2012; Tetreau *et al.*, 2012a).

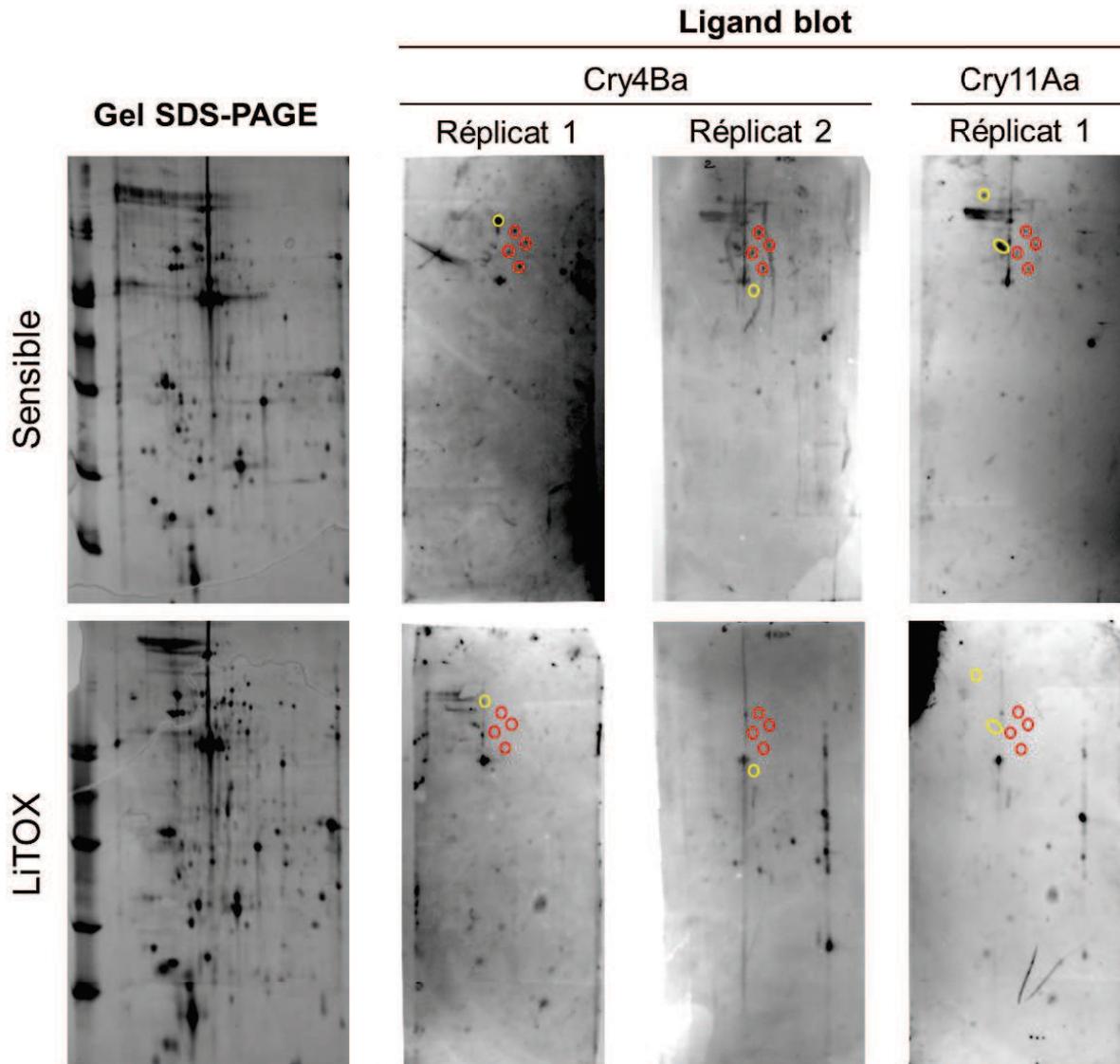
***b) Implication des récepteurs membranaires dans la résistance***

Pour déterminer si l'altération de récepteurs membranaires est à l'origine d'une partie de la résistance au *Bti* observée chez la souche LiTOX, la technique de « **ligand blot** » a été utilisée. La technique a été appliquée sur les premiers réplicats biologiques des BBMV des souches LiTOX et sensible précédemment utilisés pour les analyses DIGE (page 109).



**Figure 78.** Principe de la technique de « ligand blot ». Les protéines des BBMV migrent en fonction de leur taille et de leur point isoélectrique (pI) (étape 1). Les points bleus représentent les protéines ayant migré dans le gel. Les toxines Cry se fixent à leurs récepteurs (étape 2) puis sont détectées par des anticorps anti-Cry (étape 3) qui seront révélés à l'aide d'un anticorps de détection, d'un réactif ECL et d'un film photographique (étape 4). Les points noirs représentent les protéines révélées par la technique de ligand blot.

Dans un premier temps, les protéines sont séparées en fonction de leur pH et de leur taille par migration sur un gel 2D, tel que décrit précédemment (Figure 78, étape 1). Pour cette approche, nous avons utilisé des bandes de gels de 7cm pour la migration en fonction du point isoélectrique (pI) (au lieu de 18cm pour la technique DIGE), permettant de faire migrer trois répliquats techniques des mêmes BBMV sur le même gel pendant la seconde migration (en fonction de la taille). Ainsi, l'un sera utilisé pour colorer le gel et révéler l'intégralité des protéines présentes dans les BBMV par des ions argent tandis que les deux restants pourront être analysés en ligand blot pour chaque souche. La migration de tous les gels est réalisée simultanément dans la même cuve d'un système d'électrophorèse vertical Ettan DALTsix (GE Healthcare). Les gels sont mis en présence de toxines Cry qui vont se fixer aux récepteurs membranaires spécifiques (Figure 78, étape 2). Des anticorps spécifiques de la toxine Cry utilisée vont ensuite se fixer aux toxines Cry précédemment fixées sur certaines protéines (Figure 78, étape 3). Enfin, un anticorps de détection, couplé à une peroxydase (HRP), va se lier aux anticorps et dégrader le luminol présent dans le réactif chimioluminescence ECL (Thermo Fisher) pour produire de la lumière qui impressionnera un film photographique. Ainsi, à chaque protéine à laquelle sera fixée une toxine Cry, un spot apparaîtra sur le film photographique tandis que les autres spots ne seront pas révélés (Figure 78, étape 4).



**Figure 79.** Image du gel de protéine SDS-PAGE coloré aux ions argent et ligand blots de deux réplicats techniques réalisés avec la toxine Cry4Ba et du réplicat technique 1 réalisé avec la toxine Cry11Aa. Les échantillons sont déposés dans des bandes de gels de 7cm de diamètre au pH de 4 à 7. Pour les ligand blot, les cercles rouges indiquent des spots présents dans l'ensemble des trois blots de la souche sensibles et absents chez la souche résistante. Les spots cerclés de jaunes n'apparaissent que chez un réplicat et/ou pour une seule toxine chez la souche sensible et sont absents chez la souche résistante (non reproductibles).

Les patrons de distribution des spots sont identiques pour les deux souches (Figure 79, gel SDS-PAGE). Une **série de quatre spots** fixent de manière reproductible la toxine Cry4Ba chez la souche sensible mais ne la fixent plus chez la souche résistante, alors même que les spots sont présents chez les deux souches puisqu'ils sont révélés par la coloration aux ions argents des gels SDS-PAGE (Figure 79). Ces 4 spots présentent le même profil de fixation pour la toxine Cry11Aa. Ces résultats préliminaires montrent clairement que plusieurs protéines semblent avoir perdu leur capacité à fixer les toxines Cry4Ba et Cry11Aa chez la souche LiTOX. Ce résultat confirme les précédents travaux ayant décrit des récepteurs communs pour les deux toxines (Fernandez-Luna *et al.*, 2010a; Likitvivatanavong

*et al.*, 2011b). Vu leur localisation groupée sur le gel, ces protéines doivent potentiellement appartenir à la même catégorie fonctionnelle. Cependant, **ces travaux restent préliminaires** et doivent être réalisés sur un deuxième réplicat biologique pour que les observations soient validées. De plus, la résistance de la souche LiTOX étant la plus élevée aux toxines Cry4Aa, les mêmes expérimentations sont nécessaires avec cette toxine pour voir si de nouveaux spots sont détectés et si les mêmes 4 spots semblent également impliqués. Ces travaux d'approfondissement sont actuellement en cours de réalisation par l'équipe de Michael Adang (Université de Géorgie, Etats-Unis). L'identification sera réalisée par spectrométrie de masse (Maldi TOF/TOF) tel que décrit pour la technique DIGE (page 111) et confirmée en réalisant des Western Blot à l'aide d'anticorps spécifiques de certaines catégories de protéines (*e.g.* phosphatases alcalines, aminopeptidases). L'implication de l'altération de récepteurs membranaires dans la résistance sera également vérifiée en réalisant des **test de fixation des toxines aux BBMV** (« binding assays ») de larves résistantes et sensibles à l'aide de toxines radio-marquées (Oliveira *et al.*, 2004; Moreira Beltrao et Neves Lobo Silva-Filha, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

Une fois les récepteurs identifiés, les **gènes correspondants seront séquencés** au Laboratoire d'Ecologie Alpine afin de déceler d'éventuelles mutations non-synonymes dans la séquence permettant d'expliquer la non-fixation des toxines à la protéine. En parallèle sera réalisée une **modélisation de la structure tridimensionnelle** des deux versions de chaque protéine pour mieux comprendre l'implication des potentielles mutations détectées sur leur capacité de fixation des toxines Cry. Deux approches de validation de leur implication peuvent alors être envisagées.

Les séquences des deux versions des récepteurs peuvent être **clonées et exprimées *in vitro*** dans des cellules d'insectes en culture (Dechklar *et al.*, 2011; Thammasittirong *et al.*, 2011). Cette approche permet de caractériser précisément les capacités de fixation des toxines par ces récepteurs dans un système biologique, et non sur une membrane synthétique (cas des ligand blot).

L'**inhibition par ARN interférant** de ces protéines chez des larves sensibles d'*Ae. aegypti* suivi de bioessais aux toxines testées séparément et avec du *Bti* commercial permettra de valider leur implication comme récepteur dans le mode d'action des toxines du *Bti* et l'impact de leur disparition dans le développement d'un phénotype de résistance. Plusieurs techniques d'ARN interférant ont déjà été développées et appliquées pour éteindre avec succès les gènes potentiellement impliqués dans la résistance au *Bt* chez les Lépidoptères mais également chez le moustique et étudier leur implication (Rajagopal *et al.*, 2002; Sivakumar *et al.*, 2007; Cancino-Rodezno *et al.*, 2010; Terenius *et al.*, 2011). Certaines de

ces techniques ont également été mises au point au laboratoire et peuvent être appliquées à notre problématique (Rodolphe Poupardin, communication personnelle).

Ces travaux peuvent permettre d'apporter la preuve qu'une résistance au *Bti* par mutation de récepteurs est possible chez les moustiques, malgré la présence de la toxine Cyt1Aa, et qu'elle peut être généraliste, c'est-à-dire affectant plusieurs toxines simultanément. De plus, la résistance par mutation de cible induit généralement des résistances très élevées ; or, ces travaux semblent montrer que la mutation de récepteurs peut induire des résistances modérées et différentes selon les toxines. Plusieurs explications peuvent être avancées : soit ces protéines ne sont **pas des récepteurs principaux** des toxines Cry, induisant ainsi une baisse modérée de la fixation des toxines à la membrane intestinale, soit la présence de la **toxine Cyt1Aa** empêche les larves de développer des résistances plus fortes, malgré la présence de récepteurs défaillants. Les travaux en cours permettront de répondre à ces questions et d'apporter des connaissances nouvelles et indispensables pour mieux comprendre le mode d'action du *Bti* ainsi que les mécanismes de résistances potentiels développés par les moustiques.

En conclusion :

**Les études préliminaires montrent une différence de fixation des toxines Cry4Ba et Cry11Aa à au moins quatre protéines différentes entre la souche LiTOX et la souche sensible. Des expérimentations sont en cours pour leur caractérisation et la validation de leur implication dans la résistance.**

#### **IV. Vers une meilleure compréhension des mécanismes de résistance au *Bti* chez le moustique**

##### **A. Apport de l'étude de la souche LiTOX**

Dans ce chapitre, j'ai exposé la majorité des travaux ayant permis de mieux caractériser la résistance développée par la souche LiTOX, sélectionnée avec de la litière végétale contenant du *Bti* persistant. Après 30 générations de sélection, cette souche présente un niveau de résistance modéré au *Bti* (3,5 fois) mais plus élevé aux toxines testées séparément, notamment pour la toxine Cry4Aa avec un rapport de résistance de 68 fois.

Les approches globales ont permis de faire ressortir une **résistance multigénique**, avec des mécanismes potentiellement impliqués à toutes les étapes du mode d'action du *Bti*, de l'ingestion jusqu'à l'infection. Le caractère multigénique de la résistance au *Bti* était

attendu, connaissant la variété des toxines présentes dans son cristal et la complexité de son mécanisme d'action.

L'analyse des activités enzymatiques ainsi que de leur impact sur la vitesse d'activation des toxines du *Bti* a montré que l'augmentation des activités des protéases à sérine et des métalloprotéases peut avoir un impact direct sur l'augmentation de la vitesse d'activation de la protoxine Cry4Aa mais pas des protoxines Cry4Ba et Cry11Aa. Ces résultats montrent que la **résistance par altération des enzymes digestives**, usuellement caractérisée de généraliste, **pourrait aussi entraîner des résistances spécifiques** à certaines toxines Cry, telles que Cry4Aa. Des modifications ont également été détectées au niveau des protéases contenues dans les extraits enzymatiques de la lumière intestinale des larves de la souche LiTOX. Cependant, il est difficile de déterminer quels sont les facteurs réellement impliqués dans la résistance et quels sont ceux développés pour compenser un coût important de la résistance. Une caractérisation plus approfondie de ces protéases est nécessaire pour infirmer/confirmer nos résultats. Ces résultats confirment néanmoins le caractère multigénique de la résistance, **l'altération des activités enzymatiques n'expliquant qu'une partie de la résistance**.

Enfin, les études préliminaires réalisées sur les protéines intestinales de larves de la souche LiTOX comparée à la souche sensible ont permis de faire ressortir au moins quatre protéines fixant différenciellement les toxines Cry4Ba et Cry11Aa entre les deux souches. Le mécanisme de résistance par mutation de la cible doit être validé par d'autres approches complémentaires. Ces résultats suggèrent néanmoins que la **résistance par mutation de récepteurs peut entraîner des résistances croisées entre toxines phylogénétiquement éloignées**.

La résistance au *Bt* par altération des enzymes et/ou par mutation de récepteurs est connue pour entraîner de nombreux **coûts** sur la valeur sélective des insectes résistants (Oppert *et al.*, 2000; Carriere *et al.*, 2006; Gassmann *et al.*, 2009). La souche LiTOX ne déroge pas à la règle. L'étude de 15 différents paramètres physiologiques et développementaux a permis de faire ressortir une **survie moindre des œufs** de la souche LiTOX ainsi qu'un **temps de développement plus important** des larves couplé à un temps d'émergence plus long des mâles et des femelles adultes (Paris *et al.*, 2011a).

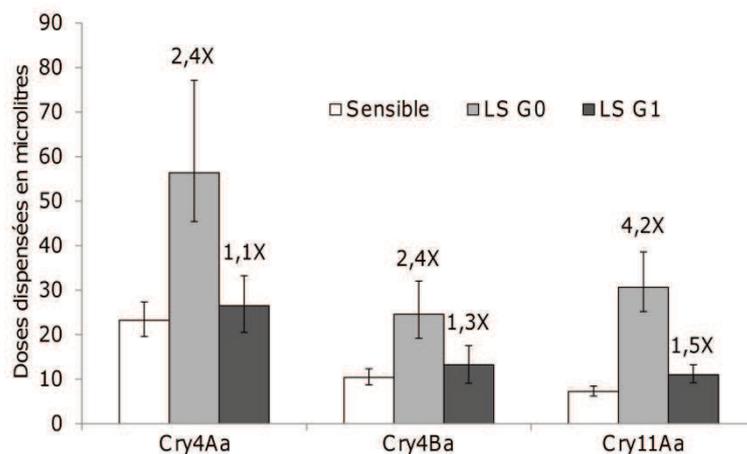
L'ensemble de ces résultats fait ressortir une **résistance au *Bti* complexe, combinant des mécanismes de résistance spécifiques et généralistes, n'induisant que des niveaux de résistance modérés malgré un nombre relativement important de générations de sélection et induisant de nombreux coûts sur la valeur sélective des individus résistants**. Tous ces paramètres sont encourageants pour l'avenir du *Bti* en tant

qu'insecticide. Les questionnaires, tels que les EIDs en France, doivent prendre en compte les résultats de ces travaux pour gérer les populations en profitant du temps de latence et des coûts importants de la résistance pour empêcher son apparition et son implantation en milieu naturel.

## B. Décortiquer la résistance au *Bti*

En sélectionnant des individus avec la litière toxique contenant du *Bti* avec des proportions de toxines Cry et Cyt modifiées, il est difficile de maîtriser les différentes pressions de sélection exercées sur les larves. De plus, on ne sait pas quelles sont les influences respectives des différentes toxines sur le phénotype de résistance observé. Afin de décortiquer la résistance induite par chacune des toxines *Bti*, **des souches de moustiques *Ae. aegypti* ont été sélectionnées aux toxines Cry du *Bti* séparément.**

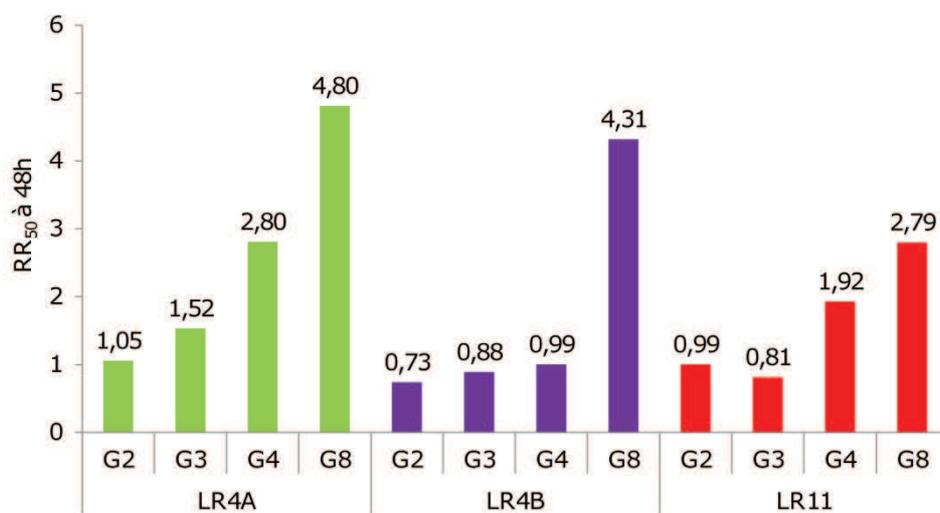
Pour cela, nous avons mélangé 750 adultes de la souche LiTOX (30%) avec 1250 individus de la souche sensible (70%) afin de créer une souche composite, nommée **LS**. Cette souche possède ainsi les allèles de résistance de la souche LiTOX en faibles proportions et possède également une forte diversité génétique globale issue de la souche sensible, permettant une adaptation à toute une gamme de pressions de sélection différentes. Cette souche a été stabilisée pendant une génération sans sélection afin de favoriser les croisements entre les deux souches. Des bioessais ont ensuite été réalisés selon le protocole décrit précédemment (page 95) pour mesurer les niveaux de résistance aux deux générations successives (Figure 80).



**Figure 80.** LC<sub>50</sub> mesurées à 48h pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa de la souche sensible (blanc) et LS à la génération 0 (issue des croisements LiTOX-sensible) (gris clair) et à la génération 1 (gris foncé). Les rapports de résistances (RR<sub>50</sub>) sont indiqués au-dessus des histogrammes correspondants. Erreurs : intervalles de confiance à 95% calculés à l'aide de l'analyse Probit.

Les larves issues du croisement entre la souche sensible et la souche LiTOX présentent encore une résistance significative mais faible aux trois toxines testées mais cette résistance disparaît dès la génération suivante (Figure 80).

Les larves de la génération 1 de la souche LS ont été sélectionnées à Cry4Aa (**souche LR4A**), Cry4Ba (**souche LR4B**), ou Cry11Aa (**souche LR11**). Les protoxines utilisées pour les sélections sont sous la forme d'une suspension de cristaux et de spores, produites en Nutrient Agar. Ces souches ont actuellement été sélectionnées pendant **13 générations successives**. Les niveaux de résistance aux générations 2, 3, 4, et 8 sont présentés (Figure 81).



**Figure 81.** Rapports de résistance ( $RR_{50}$ ) des souches LR4A (vert) à la toxine Cry4Aa, LR4B (violet) à la toxine Cry4Ba et LR11 (rouge) à la toxine Cry11Aa par rapport à la souche sensible pour les générations de sélection n°2, 3, 4 et 8. Les valeurs de  $RR_{50}$  sont indiquées au-dessus des histogrammes correspondants.

Au fil des générations de sélection, la résistance a augmenté, jusqu'à atteindre des niveaux de 4,8, 4,31 et 2,79 fois à la génération 8 des souches LR4A, LR4B et LR11 à la toxine utilisée pour leur sélection respectivement (Figure 81). Par manque de temps, je n'ai malheureusement pas encore pu réaliser de bioessais sur les générations les plus récentes de ces trois souches. Cependant, la quantité de toxine utilisée pour sélectionner ces souches a nettement augmenté depuis quelques générations de sélection, indiquant une importante augmentation de la résistance. La sensibilité de chacune des trois souches sera également testée aux trois toxines Cry du *Bti* pour détecter de potentielles résistances croisées.

De telles sélections ont déjà été réalisées chez le moustique *Culex quinquefasciatus* (Georghiou et Wirth, 1997; Wirth *et al.*, 2010b). Cependant, les bases moléculaires de la résistance développée par ces souches n'ont jamais été étudiées. De plus, *C. quinquefasciatus* est une espèce à génération continue (œufs non stockables), entraînant

souvent un mélange des populations « mères » sélectionnées et « filles » non-sélectionnées. Ainsi, la sélection n'est réalisée que toutes les trois générations, entraînant une stabilisation et même une baisse des niveaux de résistance mesurés chez ces souches après plus de 30 générations de sélection (Brian Federici, communication personnelle). Les souches LR4A, LR4B et LR11 représentent donc une opportunité rare de pouvoir étudier précisément comment les moustiques peuvent résister à chacune des toxines du *Bti*. Les mécanismes de résistance développés par la souche LiTOX seront recherchés chez ces trois souches pour voir si la sélection aux toxines séparées a permis de re-sélectionner les mêmes mécanismes pour au moins une des trois toxines. De plus, nous chercherons les mécanismes de résistance propres à chaque toxine ainsi que les mécanismes partagés entre les toxines par des approches globales puis fonctionnelles. Une sélection au *Bti* est également envisagée sur le long terme pour s'affranchir de l'influence potentielle de la litière et valider/infirmer les mécanismes précédemment décrits chez la souche LiTOX. Une telle connaissance permettra de mieux comprendre les processus complexes qui permettent d'aboutir à une résistance multigénique issue d'une pression de sélection multiple.

L'ensemble de ces travaux permettra de mieux comprendre comment les moustiques peuvent développer des résistances au *Bti*. Une fois le(s) mécanisme(s) impliqué(s) caractérisé(s), nous pourrons développer des **outils diagnostics** pour détecter une résistance dans les stades précoces de son apparition en populations naturelles en ciblant les gènes/protéines connus pour induire la résistance. De tels outils existent déjà pour les insecticides chimiques (e.g. test ciblant la mutation *kdr*) et ont permis de suivre l'apparition de résistances dans de nombreuses études réalisées sur des populations naturelles de moustiques (Matambo *et al.*, 2007; Marcombe *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011). L'objectif est donc de développer des tests similaires pour le *Bti* qui permettront un suivi de l'apparition de résistance dans des populations naturelles de moustiques. Cependant, ces outils sont complémentaires et ne peuvent remplacer la recherche de résistance par bioessais, déjà réalisée en routine par les gestionnaires.

# Chapitre III :

## Recherche de résistance au *Bti* chez le moustique en populations naturelles

---

### I. Rechercher une résistance en populations naturelles

#### A. Les bioessais : une approche simple mais contraignante

Lorsque l'on cherche à mettre en évidence une résistance aux insecticides en milieu naturel, une approche évidente consiste à réaliser des **bioessais** sur des individus échantillonnés dans des populations naturelles (Sivasupramaniam *et al.*, 2007). Cette approche est souvent à la base d'études approfondies sur les mécanismes moléculaires responsables de la résistance (Marcombe *et al.*, 2009). Des bioessais ont été réalisés sur de nombreuses populations naturelles d'insectes de différentes espèces pour rechercher des résistances aux insecticides chimiques (Ocampo *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Springate et Colvin, 2012) mais également à certains insecticides biologiques tels que *Bacillus sphaericus* (Su et Mulla, 2004; Silva *et al.*, 2008; Akiner *et al.*, 2009) et des sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* (Tabashnik *et al.*, 1990; Gao *et al.*, 2010; Tabashnik et Carriere, 2010; Alcantara *et al.*, 2011; Gassmann *et al.*, 2011). La résistance au *Bti* a également été recherchée à plusieurs reprises dans des populations naturelles de moustiques (Liu *et al.*, 2004a; Liu *et al.*, 2004b; Vasquez *et al.*, 2009; Loke *et al.*, 2010; Kamgang *et al.*, 2011) mais seule une étude a conclu à une résistance chez une population de *Culex pipiens* à New York (Paul *et al.*, 2005). Cependant cette étude est très critiquable, notamment à cause du choix de la souche de référence.

#### B. Quid du choix de la référence ?

Lorsque l'on réalise un bioessai, il est nécessaire de posséder une population/souche de référence pour pouvoir calculer des rapports de résistance des populations/souches à tester. Généralement, les études utilisent comme référence des individus issus d'une **souche de laboratoire de la même espèce**, sensible à l'insecticide étudié. Cette approche n'est adaptée que si cette souche provient de populations géographiquement proches de celles à tester (même fond génétique) et si elles ont été échantillonnées récemment. Dans le cas contraire, les résultats obtenus peuvent ne refléter qu'une différence de tolérance naturelle entre les deux populations et non une réelle résistance sélectionnée sur le terrain.

C'est certainement le cas de l'étude de Paul *et al.* (2005) où la souche de référence est une souche sensible de laboratoire échantillonnée en Californie en 1950 (Georghiou *et al.*, 1966) et possédant probablement un **fond génétique très différent** des populations New-Yorkaises actuelles de *Culex pipiens*.

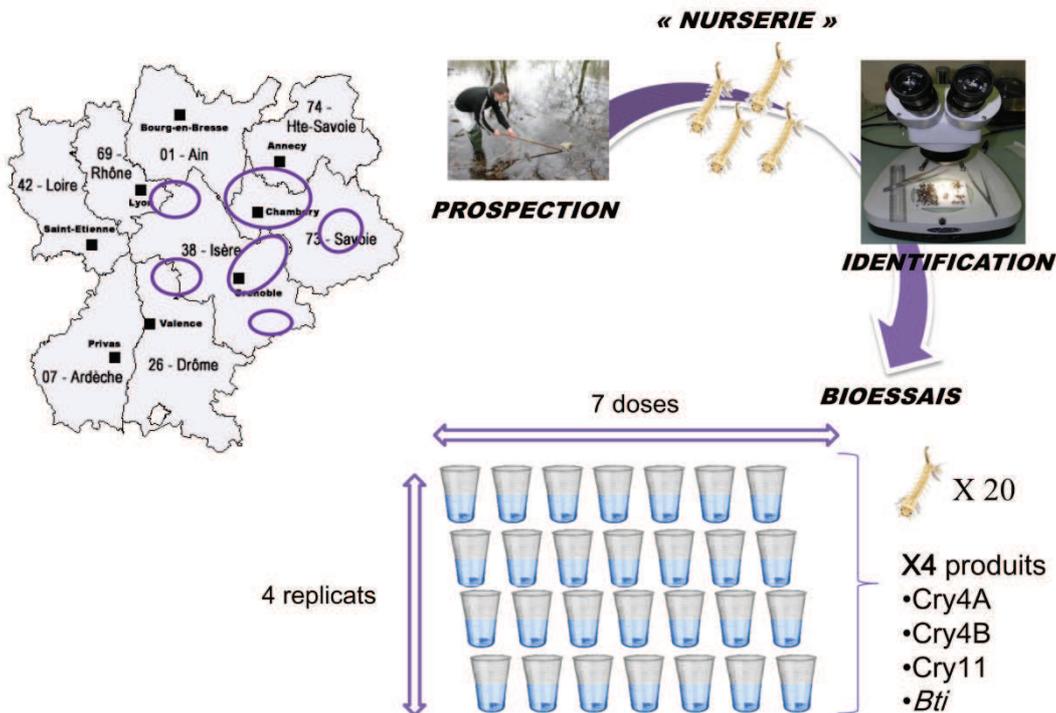
De plus, les résultats de bioessais à partir de populations naturelles sont souvent très variables, due à une forte hétérogénéité intra- et inter-populationnelle (âge, taille, sexe, etc.) et à l'influence de facteurs environnementaux conduisant à des variations phénotypiques entre populations. En effet, les larves prélevées directement dans l'environnement peuvent avoir été exposées à certains xénobiotiques tels que des polluants (Riaz *et al.*, 2009), à des polyphénols naturels (Gibson *et al.*, 1995; Isayama *et al.*, 2011) ou à certains paramètres, comme la température (Asano, 2004), qui peuvent influencer sur leur sensibilité. Pour pallier à ce problème, une solution consiste à collecter des individus sur le terrain (génération 0) puis à les laisser se reproduire et élever leur descendance au laboratoire en conditions contrôlées (**génération 1**) avant de procéder aux bioessais sur des individus homogènes entre populations. Cette stratégie permet de s'affranchir de l'influence du milieu et permet également de diminuer la variabilité des résultats. Cependant, ces deux dernières approches (souche de laboratoire et « génération 1 ») ne sont envisageables que pour certaines espèces modèles dont l'élevage est possible en laboratoire. Ce n'est malheureusement pas le cas pour de nombreuses espèces de moustiques dont la plupart sont eurygames, *i.e.* nécessitant beaucoup d'espace pour leur accouplement (Carron, 2007).

Dans ce contexte, une approche alternative consiste à comparer des populations traitées de manière récurrente avec un insecticide avec des **populations n'ayant jamais été en contact** avec cet insecticide (ou un insecticide de la même famille) et suffisamment éloignées géographiquement pour ne pas subir d'évènements migratoires d'individus provenant de zones traitées. L'inconvénient de cette approche est que l'on ne peut pas réellement parler de résistance, la sensibilité des populations non traitées n'étant pas avérée. Pour pouvoir vérifier que l'on observe une résistance et non une tolérance naturelle, il est nécessaire d'**effectuer un suivi sur plusieurs années**. Ainsi, si la pression insecticide est constante et que l'on est réellement en présence de résistance, celle-ci devrait augmenter en fonction du temps (Janmaat et Myers, 2003; Tabashnik et Carriere, 2010).

## II. Rechercher une résistance cryptique au *Bti*

### A. Synopsis de l'étude

Nous avons vu que la souche LiTOX présentait une faible résistance au *Bti* mais une résistance beaucoup plus importante aux toxines Cry testées séparément. De ce fait, la résistance aux toxines individuelles est détectable avant que la résistance au *Bti* ne soit suffisamment importante pour être détectée par des bioessais. Ainsi, les bioessais au *Bti* ne sont probablement pas assez sensibles pour détecter une résistance au *Bti* en train d'apparaître en populations naturelles. C'est pour cela que **nous avons testé des populations de moustiques à l'aide des toxines individuelles du *Bti*** pour détecter d'éventuelles résistances cryptiques au *Bti*. Des bioessais au *Bti* ont également été réalisés comme contrôle. Les bioessais ont été réalisés sur des populations échantillonnées dans la région Rhône-Alpes. En effet, le *Bti* étant utilisé régulièrement depuis plus de 20 ans dans la région, cette zone géographique semble propice pour étudier la résistance sur le terrain. L'ensemble de cette étude a été réalisée avec l'aide de Renaud Stalinski lors de son stage de Master I BEE (Figure 82).



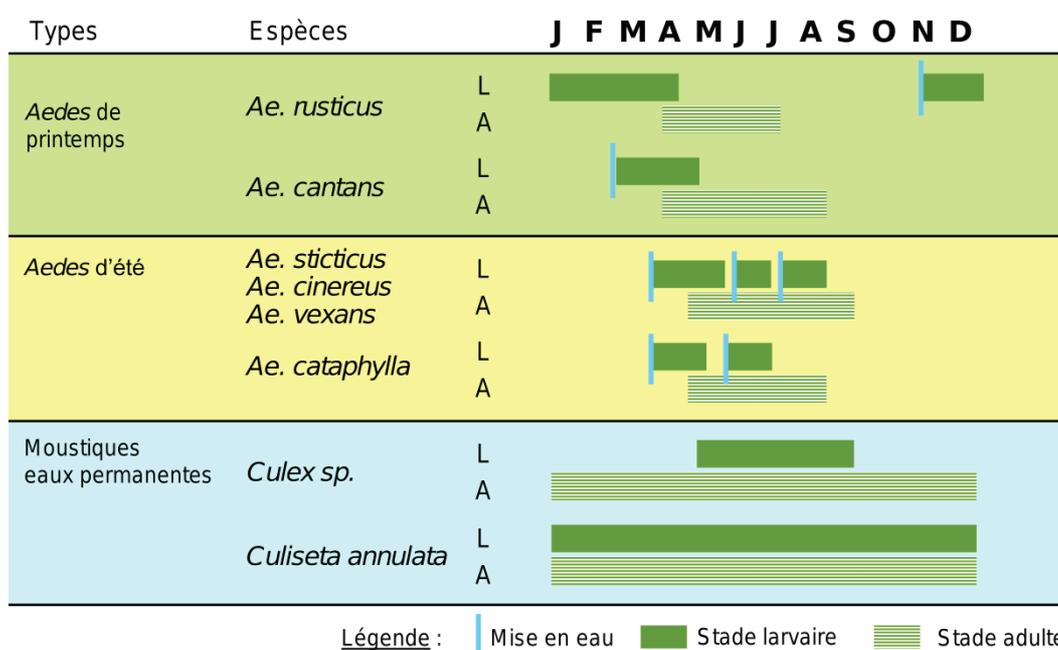
**Figure 82.** Protocole de recherche de la résistance au *Bti* en populations naturelles incluant une prospection des gîtes traités et non traités, l'échantillonnage des populations, une étape de croissance des larves jusqu'au stade 4 précoce, une identification à la loupe binoculaire puis des bioessais pour mesurer leur tolérance au *Bti* et aux différentes toxines Cry.

Dans un premier temps, les gîtes traités et non traités ont été recherchés puis échantillonnés. Les informations sur le gîte (accès, modalité de traitement, faune compagne,

paramètres physico-chimiques) sont relevées et reportées sur une fiche d'échantillonnage (Annexe V). Les larves échantillonnées n'étant pas calibrées, *i.e.* de stades larvaires très différents, il était nécessaire de les laisser grandir jusqu'à atteindre le stade 4 précoce afin de pouvoir comparer les populations entre elles, testées au même stade de développement. Chacune des larves utilisées a été identifiée à l'aide d'une loupe binoculaire et grâce à une clé de détermination présentée dans l'ouvrage *Mosquitoes and their control* de Becker *et al.* (2010).

## B. Espèces étudiées

Au total, 8 espèces ont été échantillonnées entre Mars et Juin 2010 : six espèces d'*Aedes* (*Ae. cantans*, *Ae. cataphylla*, *Ae. cinereus*, *Ae. rusticus*, *Ae. sticticus* et *Ae. vexans*), une espèce de *Culex* (*Culex pipiens*) et une espèce de *Culiseta* (*Culiseta annulata*) (Figure 83).



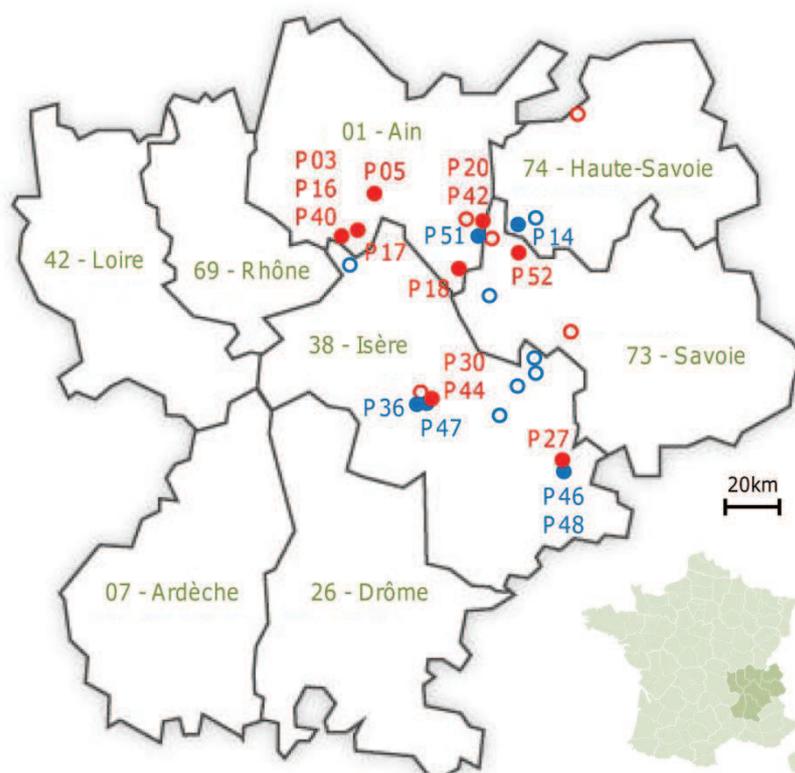
**Figure 83.** Espèces échantillonnées ainsi que leur date de mise en eau approximative (bleu, la date de mise en eau peut varier d'une année sur l'autre) et les périodes où on les retrouve aux stades larvaires (vert) et imaginaux (hachuré vert). Source : EID Rhône-Alpes, reproduit avec l'autorisation de Delphine Rey.

Les individus d'*Ae. rusticus* passent l'hiver au stade larvaire. Ils sont de taille plus importante que les individus des autres espèces (environ 10mm au stade 4 contre 6mm pour les autres espèces d'*Aedes*). Ce sont les premières larves à pouvoir être échantillonnées. Etant généralement la seule espèce présente dans le milieu, leur identification est rapide, facilitant la réalisation des bioessais. Lors de nos prélèvements, nous avons obtenu quelques larves d'*Ae. cantans* et d'*Ae. cataphylla* mais leur effectif était trop faible pour pouvoir les tester en bioessais.

Contrairement aux *Aedes* de printemps, les *Aedes* d'été peuvent avoir plusieurs générations par an, dû au nombre parfois important de mises en eau des gîtes à moustiques. Ainsi, lors d'une saison particulièrement pluvieuse, certaines espèces comme *Ae. sticticus* peuvent avoir jusqu'à sept générations par an. Enfin, nous avons également échantillonné des larves de *Culex pipiens* au niveau de gîtes en eau permanente, tels que des bassins de lagunage.

### C. Prospection et échantillonnage des larves

L'échantillonnage a été effectué en étroite collaboration avec les responsables scientifiques et les agents de démoustication de l'EID Rhône-Alpes afin de localiser les gîtes à moustiques récemment mis en eau pour pouvoir prélever les larves avant que les traitements insecticides ne soient effectués. Un total de 54 missions d'échantillonnage dans 32 gîtes différents (22 traités et 10 non traités) ont été réalisées (Figure 84).



**Figure 84.** Gîtes visités et échantillonnés dans la région Rhône-Alpes. Les gîtes visités mais non échantillonnés sont indiqués par des cercles bleus (non traités) ou rouges (traités). Les gîtes échantillonnés et utilisés dans les bioessais sont indiqués par des ronds pleins bleus (non traités) ou rouges (traités). Pour les gîtes échantillonnés, le nom de la population est indiqué. P03 & P16, Saint-Maurice de Gourdans (bois de l'Aberu) ; P05, Cormoz (Château-Gaillard) ; P14, Rumilly ; P17, Saint-Jean de Niois ; P18, Chantemerle (Archine) ; P20 & P42, Culoz ; P27, Sarennes (Basse) ; P30, Saint-Quentin sur Isère (fossé des moutons) ; P36, Tizin (pré Borel) ; P40, Saint-Maurice de Gourdans (marais) ; P44, Saint-Quentin sur Isère (digue) ; P46 & P48, Vernis (Libellule) ; P47, Saint-Quentin sur Isère (lagunage) ; P51, Lavours (terrière) et P52, Albens (moulin). Source du fond de carte : <http://www.architectes-conseils.fr/regions/region-rhone-alpes>.

Parmi les 22 gîtes traités, 12 avaient produit suffisamment de larves pour être échantillonnées. Réciproquement, seulement 5 gîtes non traités sur les 10 visités ont pu être utilisés. Les gestionnaires traitant la grande majorité des gîtes produisant des quantités importantes de moustiques, il est très difficile de trouver des gîtes non traités produisant suffisamment de larves pour les bioessais. Cela explique le faible nombre de gîtes non traités trouvés et échantillonnés. Ainsi, un total de **18 prélèvements dans 17 gîtes différents** ont été réalisés et ont été utilisés pour les bioessais (Figure 84).

## D. Mesure de la tolérance des populations au *Bti* et aux toxines Cry

### 1. Méthode employée

Une fois les larves échantillonnées, elles sont rapportées avec précaution au laboratoire puis transvasées dans des aquariums. Cette étape permet de séparer les larves des nombreux débris végétaux et des autres insectes non souhaités présents dans le prélèvement. Les larves triées sont ensuite transférées dans des bacs avec une nouvelle eau afin d'éliminer les effets liés aux xénobiotiques (composés naturels et/ou polluants) potentiellement présents dans l'eau des gîtes et qui pourraient influencer les résultats. Si les larves sont de stades 1 à 3, elles sont maintenue dans les bacs jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade souhaité (stade 4 précoce).

Deux approches différentes ont été envisagées pour mesurer la tolérance des larves de moustiques échantillonnées, dépendant de la quantité de larves disponibles dans le gîte :

**Lorsque la quantité de larves était importante**, les bioessais ont été réalisés comme décrit précédemment (page 95) en exposant des larves à une gamme de concentration croissante pour calculer les **LC<sub>50</sub>**. Les larves étant prélevées dans des gîtes naturels, de nombreux paramètres peuvent influencer sur leur tolérance et entraîner une forte variabilité des résultats. Pour cela, il est nécessaire de réaliser un nombre suffisant de réplicats (4) pour un nombre suffisamment important de doses testées (7). Cette approche présente l'inconvénient de nécessiter une quantité très importante de larves pour tester les trois toxines Cry et le *Bti* (>2000 larves). Lorsque la quantité de larves était assez importante mais pas suffisante pour tester toutes les toxines (entre 1000 et 2000 larves), nous n'avons testé qu'une à deux toxines Cry et le *Bti*.

**Lorsque la quantité de larves était limitée** (entre 500 et 1000 larves), nous avons opté pour une stratégie basée sur des **doses diagnostiques**. Cette approche est déjà largement utilisée pour les insecticides chimiques chez le moustique (Ranson *et al.*, 2009; Fonseca-Gonzalez *et al.*, 2010) et les doses diagnostiques à utiliser pour certains insecticides sont

spécifiées par l'OMS (OMS, 1998). Généralement, ces doses sont choisies pour entraîner une forte mortalité (70 à 80%) dans une population sensible à l'insecticide testé. Ainsi, si une résistance est présente, on observera une diminution significative de la mortalité. Dans notre contexte, ne connaissant pas la tolérance des moustiques sensibles, nous avons sélectionné **deux doses diagnostiques autour de la LC<sub>50</sub>**, c'est-à-dire induisant environ 40% et 70% de mortalité chez la souche sensible de laboratoire *Ae. aegypti* Bora-Bora.

Pour les deux approches, les gobelets ont été placés dans une enceinte à une température de 17°C et la mortalité des larves a été mesurée après 48h d'exposition aux toxines Cry ou au *Bti*. Pour chaque bioessai, la taille d'une vingtaine de larves a été mesurée afin de prendre en compte ce facteur lors de l'analyse comparative de la tolérance. Des contrôles (larves non exposées au *Bti* ni aux toxines du *Bti*) ont également été réalisés pour chaque bioessai dans les mêmes conditions.

Pour chaque population de chaque espèce, **les individus ayant toléré les doses les plus importantes de *Bti* ou de toxines séparées de *Bti* ont été récupérés et conservés à -20°C dans de l'éthanol à 95%**. De plus, un pool de 20 individus pris arbitrairement dans la population a également été récupéré et conservé. Lorsque l'outil diagnostique ciblant le(s) allèle(s) de résistance au *Bti* aura été caractérisé, nous disposerons alors de données de bioessais au *Bti* et aux toxines testées séparément et nous pourrons tester la présence des allèles de résistance directement sur ces individus tolérants issus de populations naturelles.

## 2. Résultats des bioessais et discussion

### a) Analyse globale

**Tableau 13.** Synthèse du nombre de gîtes où au moins une des 8 espèces étudiées a été trouvée ainsi que ceux pour lesquels les bioessais ont pu être réalisés. Les raisons pour lesquelles les bioessais n'ont pas pu être effectués sur les autres populations sont également indiquées.

Espèce	Trouvée	Bioessais réalisés		Populations non analysables		
		Calcul de LC <sub>50</sub>	Doses diagnostic	Effectif trop faible	Mortalité naturelle importante	Taux de nymphose trop élevé
<i>Ae. cantans</i>	11	0	0	9	2	0
<i>Ae. cataphylla</i>	5	0	0	5	0	0
<i>Ae. cinereus</i>	3	0	0	1	1	1
<i>Ae. rusticus</i>	15	3	0	12	0	0
<i>Ae. sticticus</i>	14	3	0	8	3	0
<i>Ae. vexans</i>	12	3	2	6	0	1
<i>Culex pipiens</i>	6	0	0	4	2	0
<i>Culiseta annulata</i>	5	0	1	4	0	0
Total	71	9	3	49	8	2

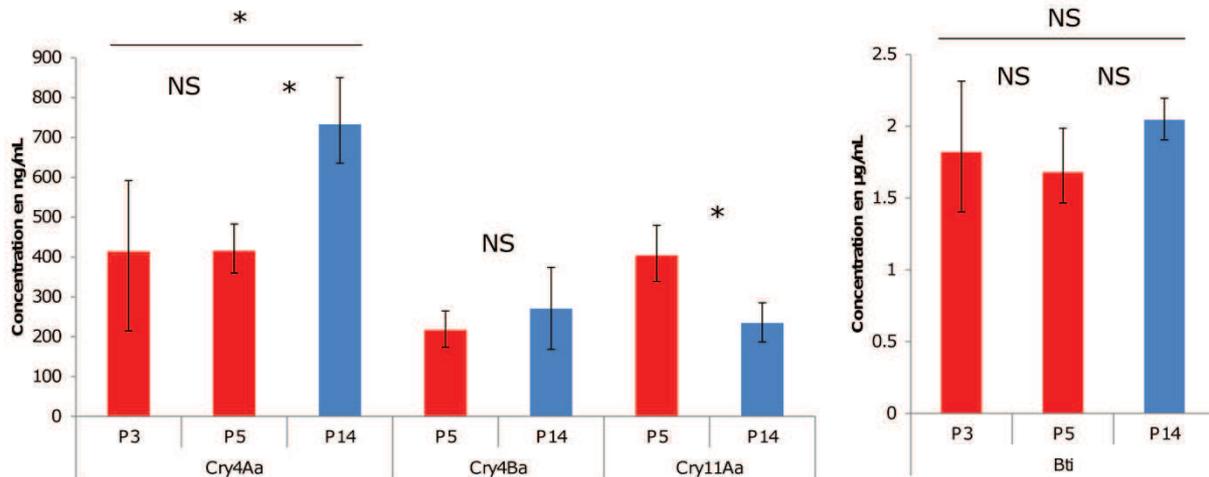
Sur les 71 populations naturelles de moustiques identifiées lors des missions d'échantillonnage, 59 (83%) n'étaient pas analysables (Tableau 13). Au total, aucune donnée sur la tolérance des populations d'*Ae. cantans*, *Ae. cataphylla*, *Ae. cinereus* et *Culex pipiens* n'a pu être obtenue dans cette étude. Dans plus de 69% des cas, les espèces ne sont représentées dans les gîtes que par un nombre restreint d'individus et cet effectif est généralement trop faible pour pouvoir réaliser des bioessais, même avec des doses diagnostiques (Tableau 13). Ces résultats illustrent bien le caractère laborieux du travail de terrain, dû à la **difficulté de trouver des gîtes produisant des larves dans des quantités suffisamment importantes**. Caractéristique de la région Rhône-Alpes, les gîtes à moustiques sont généralement très dispersés dans les sous-bois et de taille plutôt modérée, limitant la possibilité d'échantillonner des populations de larves calibrées en quantités importantes.

### b) Comparaisons intra- et inter-populations

Pour toutes les espèces testées, les LC<sub>50</sub> ont été calculées à l'aide du module 'dose' du logiciel XLSTAT v.2009.4.06 (Addinsoft), tel que décrit en Annexe II.

(1) Comparaison des populations d'*Aedes rusticus*

La tolérance aux toxines Cry et au *Bti* des trois populations échantillonnées d'*Ae. rusticus* (P3, P5 et P14) a été mesurée (Figure 85). Les distances approximatives à vol d'oiseau entre les populations sont de 70 km, 58 km et 85 km respectivement pour les distances P3-P5, P3-P14 et P5-P14.

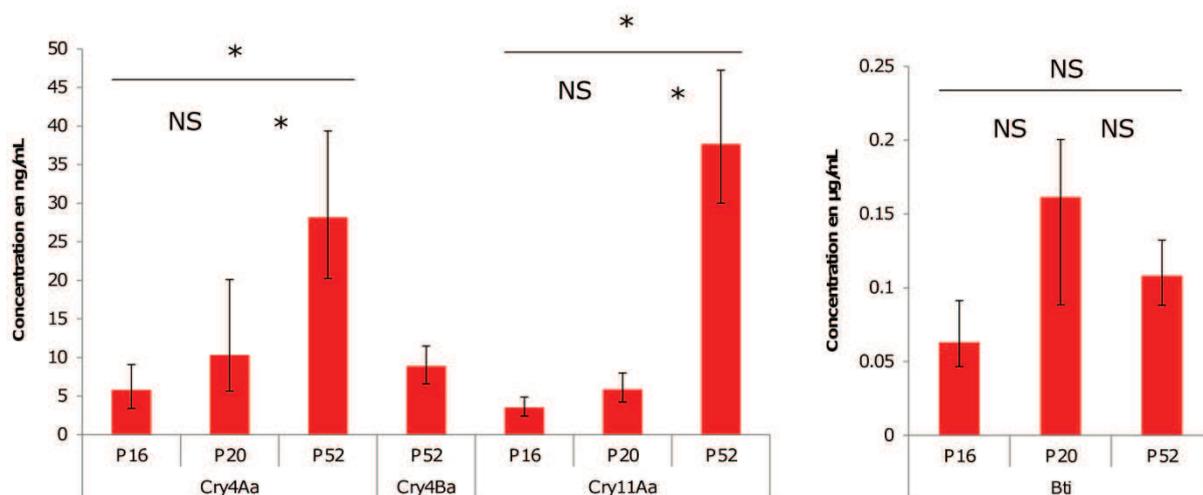


**Figure 85.** LC<sub>50</sub> calculées à 48h pour les populations naturelles P3, P5 et P14 d'*Aedes rusticus* exposées à des concentrations croissantes de toxine Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculées à l'aide de l'analyse probit sont non chevauchants. NS, non significatif, \*, significatif ( $p < 0,05$ ). Les populations non traitées au *Bti* sont indiquées en bleu et les populations traitées en rouge.

Alors que les trois populations présentent des sensibilités au *Bti* et à Cry4Ba similaires, la population non traitée P14 est significativement 1,77 fois plus tolérante à Cry4Aa que les populations traitées P3 et P5 (calculé sur la moyenne des deux populations) (Figure 85). La population P5 est significativement 1,72 fois plus tolérante à Cry11Aa que la population P14. Même significatifs, ces rapports de tolérance restent très faibles et ne semblent refléter que des variations de tolérance naturelles entre populations et non une réelle résistance sélectionnée par les traitements insecticides.

(2) Comparaison des populations d'*Aedes sticticus*

La tolérance aux toxines Cry et au *Bti* des trois populations échantillonnées d'*Ae. sticticus* (P16, P20 et P52, toutes 3 traitées) a été mesurée (Figure 86). Les distances approximatives à vol d'oiseau entre les populations sont de 45 km, 58 km et 14 km respectivement pour les distances P16-P20, P16-P52 et P20-P52.

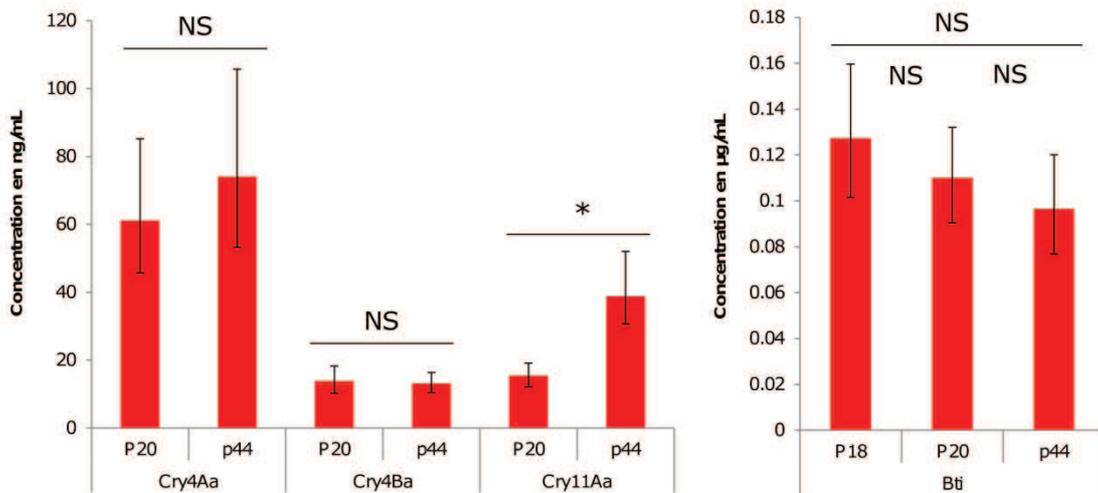


**Figure 86.** LC<sub>50</sub> calculées à 48h pour les populations naturelles P16, P20 et P52 d'*Aedes sticticus* exposées à des concentrations croissantes de toxine Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculées à l'aide de l'analyse probit sont non chevauchants. NS, non significatif, \*, significatif ( $p < 0,05$ ). Les populations, toutes traitées au *Bti*, sont indiquées en rouge.

Les trois populations testées présentent des sensibilités similaires au *Bti*. Seule la population P52 est 3,5 et 8 fois plus tolérante aux toxines Cry4Aa et Cry11Aa respectivement (calculé par rapport à la moyenne des LC<sub>50</sub> des populations P16 et P20) (Figure 86). Les populations d'*Ae. sticticus* présentent des **niveaux de tolérance identiques au *Bti*** alors que la tolérance de la population P52 est **plus forte à certaines toxines testées séparément**, pouvant indiquer qu'une résistance cryptique au *Bti* est en train d'être sélectionnée dans cette population. Ce gîte est formé par un fossé situé derrière un moulin abandonné et est localisé à proximité de gîtes traités et non traités. Le régime de traitement insecticide appliqué est identique pour les trois gîtes. Ainsi, aucune caractéristique évidente du gîte ne permet d'expliquer cette différence de tolérance. Pour vérifier ces observations, des bioessais doivent être réalisés sur plusieurs années pour voir si la tolérance se maintient et si elle progresse lorsque les populations sont soumises à une pression insecticide continue.

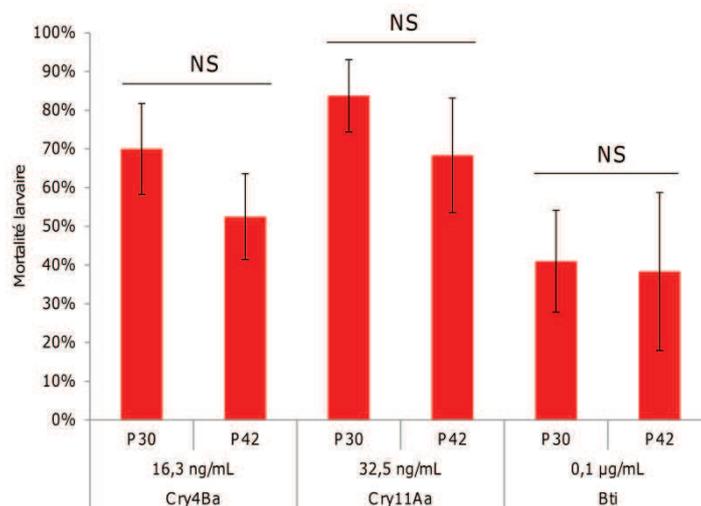
### (3) Comparaison des populations d'*Aedes vexans*

La tolérance aux toxines Cry et au *Bti* des trois populations échantillonnées d'*Ae. sticticus* (P18, P20 et P44, toutes 3 traitées) a été mesurée (Figure 87). Les distances approximatives à vol d'oiseau entre les populations sont de 21 km, 45 km et 66 km respectivement pour les distances P18-P20, P18-P44 et P20-P44.



**Figure 87.** LC<sub>50</sub> calculées à 48h pour les populations naturelles P18, P20 et P44 d'*Aedes vexans* exposées à des concentrations croissantes de toxine Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculées à l'aide de l'analyse probit sont non chevauchants. NS, non significatif, \*, significatif ( $p < 0,05$ ). Les populations, toutes traitées au *Bti*, sont indiquées en rouge.

Les trois populations testées présentent des sensibilités similaires au *Bti*. Seule la population P44 est 2,5 fois plus tolérante à la toxine Cry11Aa que la population P20 (Figure 87). Il est probable que nous soyons dans le même cas de figure que pour les populations d'*Ae. rusticus*, la population P44 présentant une tolérance naturelle plus importante à Cry11Aa, ne reflétant pas nécessairement une résistance sélectionnée par les traitements insecticides.



**Figure 88.** Mortalité calculée à 48h pour les populations naturelles P30 et P42 d'*Aedes vexans* exposées à des doses diagnostics de toxine Cry4Ba (16,3 ng/mL), Cry11Aa (32,5 ng/mL) et de *Bti* commercial Vectobac WG (0,1 µg/mL). Les différences ont été testées statistiquement à l'aide d'un test de Wilcoxon. NS, non significatif. Les populations, toutes traitées au *Bti*, sont indiquées en rouge. Distance approximative à vol d'oiseau entre P30 et P42 : 66 km.

Aucune différence significative de tolérance n'a été détectée entre les populations P30 et P42 testées à l'aide de doses diagnostiques de Cry4Ba, Cry11Aa et de *Bti* commercial (Figure 88).

#### (4) Comparaisons inter-espèces

**Tableau 14. A.** Moyenne des LC<sub>50</sub> calculées sur l'ensemble des populations d'*Ae. rusticus*, *Ae. sticticus* ou *Ae. vexans* exprimées en ng/mL pour les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa et en µg/mL pour le *Bti* Vectobac WG. La taille moyenne des larves, mesurée sur 15 individus par population, ainsi que l'écart type sont mesurés. **B.** Les rapports de tolérance pour chacune des toxines Cry et pour le *Bti* Vectobac WG ont été calculés pour les trois espèces testées. Les rapports de taille larvaire entre espèces ont également été calculés.

A.		LC <sub>50</sub>			
		Cry4Aa	Cry4Ba	Cry11Aa	<i>Bti</i>
Espèce	Taille (mm)				
<i>Ae. rusticus</i>	10,6 ± 0,8	262,7	60,9	106,9	2,03
<i>Ae. sticticus</i>	6,3 ± 0,9	14,8	8,9	15,7	0,11
<i>Ae. vexans</i>	6,2 ± 0,6	67,6	13,5	27,1	0,11

B.		Rapports de tolérance			
		Cry4Aa	Cry4Ba	Cry11Aa	<i>Bti</i>
Rapport esp1/esp2	Taille				
<i>Ae. rusticus</i> / <i>Ae. sticticus</i>	1,7x	17,8x	6,8x	6,8x	18,5x
<i>Ae. rusticus</i> / <i>Ae. vexans</i>	1,7x	3,9x	4,5x	3,9x	18,5x
<i>Ae. vexans</i> / <i>Ae. sticticus</i>	1,0x	4,6x	1,5x	1,7x	1,0x

*Ae. rusticus* est une espèce naturellement 3,9 à 18,5 fois plus tolérante que les deux autres espèces d'*Aedes* testées aux toxines Cry et au *Bti* commercial (Tableau 14). Cette différence est essentiellement liée à la différence de taille (+70%) des larves d'*Ae. rusticus* par rapport aux larves d'*Ae. vexans* et d'*Ae. sticticus* au même stade larvaire (stade 4), comme le montre une analyse de covariance prenant la taille de la larve comme covariable. Les espèces *Ae. vexans* et *Ae. sticticus* présentent globalement des tolérances similaires, excepté pour la toxine Cry4Aa pour l'espèce *Ae. vexans* qui est 4,6 fois plus tolérante qu'*Ae. sticticus*. Ces résultats confirment les observations des gestionnaires EID qui doivent utiliser des doses opérationnelles de *Bti* plus importantes pour contrôler aussi efficacement les populations d'*Ae. rusticus* que celles des autres *Aedes*.

#### E. Vers le développement d'un outil de détection de la résistance au *Bti*

Dans le cadre d'une étude sur des populations naturelles, nous avons montré que les **tests réalisés avec des toxines Cry montrent une sensibilité plus importante que les bioessais au *Bti***. Ainsi, la population d'*Ae. sticticus* P52 présente une tolérance accrue pour

Cry4Aa et Cry11Aa sans qu'aucune augmentation de la tolérance au *Bti* commercial ne soit détectée. Ces résultats sont encourageants pour poursuivre le développement de cet outil et élargir son application à d'autres espèces de la région Rhône-Alpes (*Ae. cantans*, etc.), méditerranée (*Ae. detritus*, *Ae. caspius*, etc.) mais également sur des espèces vectrices de maladies telles qu'*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex pipiens*, etc.

Dans ce contexte, la **méthode des doses diagnostiques de toxines Cry** semble plus adaptée que la détermination de LC<sub>50</sub>. Cette méthode nécessitant moins de larves, elle peut donc être appliquée à un plus grand nombre de gîtes, permettant ainsi d'augmenter le nombre de réplicats afin d'obtenir des valeurs de mortalité plus fiables. De plus, les suspensions de spores/cristaux utilisées dans ces tests peuvent être aliquotées et conservées à -20°C pendant plusieurs années pour permettre de tester dans des conditions standardisées de nombreuses populations et de suivre leur évolution au cours du temps. Les tests réalisés sur d'autres populations permettront d'affiner ces doses diagnostiques pour proposer aux gestionnaires un **outil plus sensible et moins laborieux que les bioessais au *Bti*** réalisés actuellement, permettant de détecter une résistance au *Bti* avant qu'elle n'ait un impact important sur l'efficacité des traitements insecticides.



# Discussion générale et perspectives

Les moustiques ; source de haine et de peur, à l'origine de nuisances et de maladies, fardeau économique et sanitaire pour les sociétés humaines. Nombreuses ont été les stratégies mises en œuvre pour lutter contre ces insectes, allant de l'éradication des zones humides jusqu'à l'utilisation d'insecticides chimiques. Efficaces mais peu spécifiques, l'importante rémanence de ces insecticides dans l'environnement et la vitesse de développement de phénomènes de résistance chez les insectes cibles ont conduit à la nécessité de développer de nouveaux insecticides, plus respectueux de l'environnement tout en étant suffisamment efficaces. Le *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) est considéré par certains comme une « magic bullet » dont l'activité résiduelle est faible, la spécificité importante et les résistances inexistantes. **Et pourtant, il persiste...** dans des litières végétales prélevées dans certains gîtes de la région Rhône-Alpes après plusieurs mois sans traitement et de plus en plus de cas de persistance du *Bti* sont rapportés dans la littérature. **Et pourtant, ils résistent...** les moustiques lorsqu'ils sont sélectionnés à cette litière toxique contenant du *Bti* persistant. Ainsi, le *Bti* peut être considéré comme un des meilleurs insecticides disponibles actuellement sur le marché pour lutter contre les moustiques mais il est loin d'être parfait, son mode d'action tout comme son devenir dans l'environnement restant encore largement méconnus.

L'objectif de ma thèse a été d'améliorer nos connaissances, tant sur le devenir du *Bti* et des différentes toxines qui le composent dans l'environnement que sur les mécanismes que peuvent développer les moustiques pour y résister. Pour y parvenir, il a été nécessaire de développer plusieurs outils, permettant de suivre le devenir du *Bti* dans l'environnement mais également de détecter des résistances cryptiques au *Bti* en ciblant les toxines qui le composent.

## I. Devenir du *Bti* dans l'environnement

### A. Un outil efficace mais encore imparfait

Alors que le principe de précaution est appliqué pour de nombreux produits phytosanitaires et que l'on impose de plus en plus souvent de posséder des tests pour suivre le devenir de ces substances dans les milieux d'épandage, aucun outil n'était disponible pour suivre le devenir du cristal de *Bti* dans l'environnement. Des outils existent bel et bien pour tracer la présence de spores (Vettori *et al.*, 2003; Guidi *et al.*, 2010) ou l'activité résiduelle du *Bti* (Sheeran et Fisher, 1992; Tousignant *et al.*, 1993; David *et al.*, 2000) mais aucun outil

fonctionnel n'avait été développé pour suivre les toxines du *Bti*, malgré une tentative infructueuse (De Respinis-Chappuis, 2002). L'outil que nous avons développé contient deux grandes étapes : 1. une étape d'**extraction** très reproductible, visant à récupérer un maximum de toxines en les solubilisant et en les décrochant chimiquement et mécaniquement de la litière et 2. une **détection** de chacune des toxines en ELISA à l'aide d'anticorps spécifiques.

Cet outil s'est montré tout à fait adapté pour suivre le devenir des différentes toxines du *Bti* dans des conditions de laboratoire et lorsque le *Bti* s'est remis en culture, comme dans le cas des litières toxiques. Cependant, sous sa forme actuelle, il a montré ses limites dans des conditions environnementales où les concentrations de *Bti* sont très faibles, même juste après un traitement. Ainsi, pour pouvoir caractériser le devenir du *Bti* dans l'environnement, il est nécessaire d'**optimiser la détection par ELISA**, notamment en développant nos propres anticorps et en augmentant la sensibilité du système par l'utilisation de complexes biotine-streptavidine par exemple (Raiko *et al.*, 2010; Addanki *et al.*, 2011). L'objectif est de commercialiser cet outil par l'intermédiaire de sociétés spécialisées afin de proposer un outil performant et fiable à la fois aux scientifiques souhaitant caractériser les conditions de persistance et de recyclage du *Bti* mais également aux gestionnaires voulant s'assurer de la faible persistance du produit épandu.

## B. Un comportement complexe pour un insecticide composite

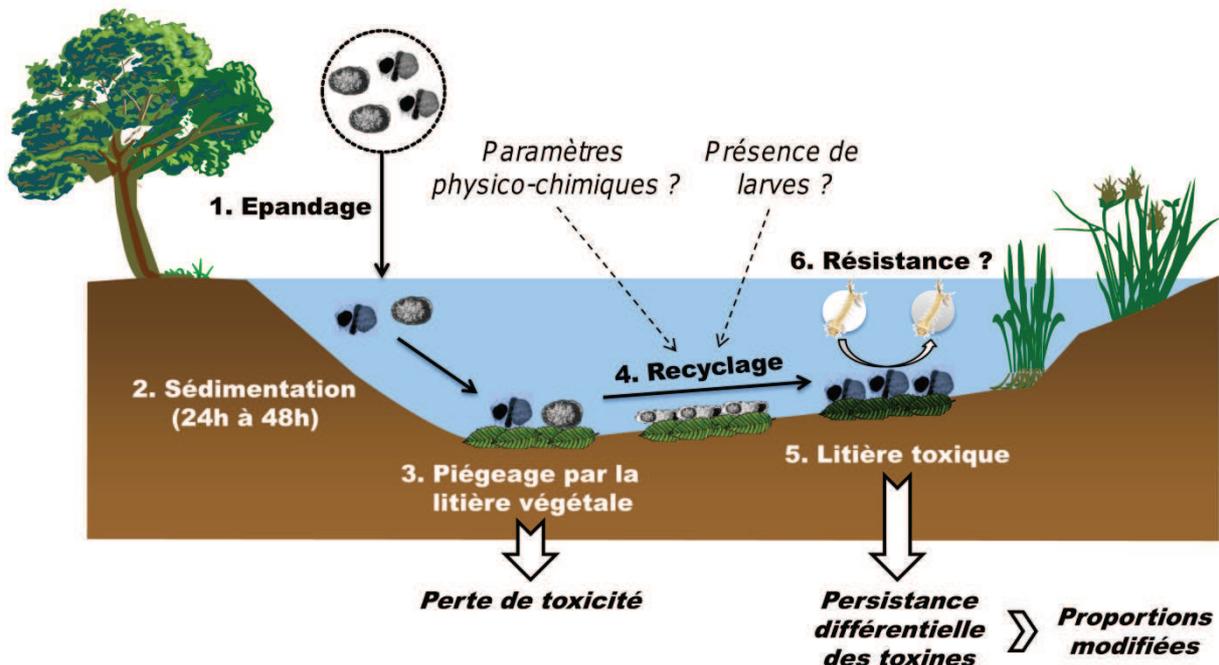
L'outil que nous avons développé lors de cette thèse a été appliqué à plusieurs conditions expérimentales visant à mieux caractériser le comportement du *Bti* :

- Des litières végétales non toxiques ont été contaminées avec les différentes toxines du *Bti* sous forme d'une suspension cristal/spore. L'application de l'outil ELISA a permis de mettre en évidence une **persistance différentielle des toxines du *Bti***, les toxines Cry4Aa et Cry4Ba persistant plus longtemps que les toxines Cry11Aa et Cyt1Aa.
- La litière toxique contenant du *Bti* persistant, prélevée dans des gîtes larvaires de la région Rhône-Alpes, a montré des quantités de toxines Cry4 supérieures à celles attendues après un épandage de *Bti*. Une **remise en culture des spores suivie d'une production de nouveaux cristaux de *Bti*** est l'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer une telle quantité de toxine. La forte diminution de la quantité de toxine Cry11Aa et Cyt1Aa est cohérente avec les persistances différentielles mesurées précédemment.

Lorsque l'on étudie le devenir du *Bti* dans l'environnement, il est ainsi indispensable de ne pas le considérer comme une entité simple mais plutôt comme une **structure complexe composée de plusieurs cristaux de toxines aux comportements très différents**. Les mêmes études doivent être réalisées en prenant en compte le *Bti* dans son intégralité afin de voir si la présence de toutes les toxines ainsi que la formulation peut influencer son devenir dans l'environnement.

Les bioessais réalisés avec des toxines préalablement mises en contact avec des litières végétales ont également montré que la présence de litière végétale pouvait **réduire l'activité synergique des toxines Cyt** sur les toxines Cry, induisant une **importante diminution la toxicité du *Bti*** pour les larves de moustique. Cependant, le contact de la litière ne semble pas modifier la toxicité des toxines Cry pour les larves de moustique. Ainsi, il semble que la baisse de synergie des toxines Cyt ait un effet cumulatif, affectant l'ensemble des toxines Cry du *Bti* et réduisant ainsi drastiquement sa toxicité. L'étude de l'interaction du *Bti* avec cette matrice végétale est indispensable afin de mieux caractériser les causes de ce piègeage et de mieux comprendre les paramètres altérant sa toxicité.

### C. Que se passe-t-il donc dans les gîtes larvaires ?



**Figure 89.** Scénario hypothétique de la formation des litières toxiques à partir de l'épandage du *Bti* dans un gîte à moustiques.

Le *Bti* est épandu dans les gîtes larvaires sous forme d'une suspension de spores et de cristaux (Figure 89-1). Le *Bti* va rapidement sédimenter le long de la colonne d'eau (Figure 89-2) et atteindre le fond des gîtes en 24h à 48h. Cette sédimentation entraîne une baisse importante de l'activité résiduelle du *Bti* pour de nombreuses espèces de moustiques,

même pour celles qui se nourrissent au fond des gîtes telles que les larves d'*Aedes* et de *Culex* (Boisvert et Lacoursière, 2004). La faible activité résiduelle du *Bti* peut également être liée à un piégeage des cristaux de *Bti* par les litières végétales qui tapissent le fond des gîtes (Figure 89-3). En effet, nous avons démontré que le *Bti* mis en contact avec la litière voit sa toxicité diminuer de manière importante. Les spores épandues sont ensuite susceptibles de se remettre en culture et les bactéries de proliférer, soumises à des conditions actuellement non encore totalement caractérisées (paramètres physico-chimiques particuliers ? Présence de cadavres de larves ?) (Figure 89-4). Lors de leur sporulation, elles vont produire de nouveaux cristaux toxiques. La litière va alors contenir des toxines dans des quantités bien supérieures à celles observées après un traitement au *Bti*. Les toxines vont ensuite persister différemment, les toxines Cyt1Aa et Cry11Aa étant les premières à disparaître, laissant les toxines Cry4Aa et Cry4Ba majoritaires (Figure 89-5). Cette litière toxique peut ainsi exposer des larves à des quantités de toxine Cyt1Aa beaucoup plus faibles, diminuant leur effet synergique sur les toxines Cry et facilitent le développement d'une résistance (Figure 89-6).

Afin de caractériser les paramètres qui ont permis au *Bti* de proliférer dans l'environnement, des **mésocosmes** ont été réalisés en conditions contrôlées. L'influence de plusieurs paramètres tels que la salinité, la présence de matière organique, la hauteur d'eau et la présence de cadavres de larves sur la persistance et la prolifération du *Bti* a été mesurée. Une fois la sensibilité du test ELISA améliorée, il sera appliqué sur des **échantillons environnementaux de litière et de sol** prélevés dans différents gîtes des régions Rhône-Alpes et méditerranée prélevés dans des gîtes traités et non traités, à plusieurs dates différentes. La prospection de gîtes à moustiques permettra de déterminer si le cas des litières toxiques était ponctuel et unique ou si cet événement de prolifération peut se reproduire dans certaines conditions particulières.

L'expérimentation de piégeage du *Bti* par la litière végétale doit être **réitérée avec d'autres composants des gîtes larvaires**, tels que du sol. Cela permettra de déterminer si les différents composants des gîtes peuvent influencer différemment le devenir et/ou la prolifération du *Bti* ou s'ils agissent de façon similaire, permettant d'expliquer la perte rapide de synergie mais également la persistance importante des toxines piégées dans les différents compartiments du gîte.

L'épandage de **produit dépourvu de spores** serait une alternative envisageable afin de limiter le risque de production non-contrôlée de cristaux de *Bti* par un recyclage des spores. Des souches de *Bti* modifiées dites « asporogènes », produisant ainsi des cristaux sans produire de spores, peuvent être utilisées (Becker *et al.*, 1991; Bhattacharya, 2000). En

Allemagne, des formulations de *Bti* irradié aux rayons gamma, détruisant la quasi-totalité des spores, sont d'ores et déjà utilisées (Becker, 2002). Cependant, l'efficacité de ce *Bti* irradié est plus faible (17% de diminution de l'activité insecticide) que le produit contenant des cristaux et des spores, probablement lié à une diminution de l'appétence de la suspension pour les larves de moustiques (Lacey et Smittle, 1985; Lacey, 2007) ou à l'élimination de l'impact de la prolifération des bactéries de *Bti* dans les tissus de l'hôte (Raymond *et al.*, 2010).

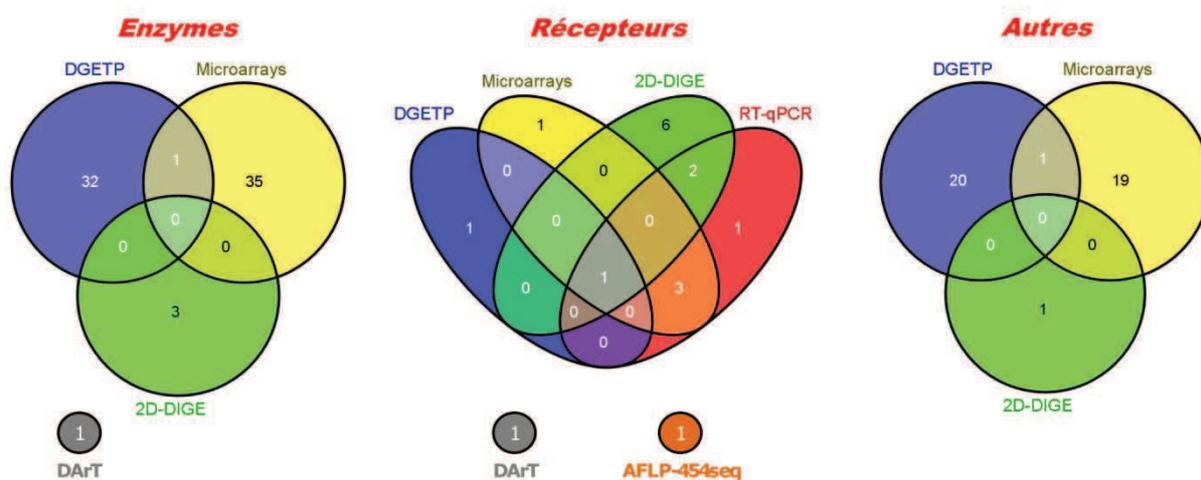
#### D. De la persistance à la résistance

Nous avons vu que les toxines Cry4Aa et Cry4Ba sont les toxines qui persistent le plus longtemps dans la litière végétale. Les toxines Cry4 sont également celles qui sont les plus abondantes dans la litière toxique. **Ces résultats sont cohérents** avec les rapports de résistance observés chez la souche LiTOX, fortement résistante à la toxine Cry4Aa contrairement à la toxine Cry11Aa. Cependant, la résistance à la toxine Cry4Ba est relativement faible et comparable à la toxine Cry11Aa. Cela suggère que les toxines Cry4Aa et Cry4Ba ne sont pas présentes en proportions équivalentes dans la litière toxique mais que la toxine Cry4Aa est majoritaire par rapport à la toxine Cry4Ba. En l'état actuel de développement de notre outil ELISA, nous ne pouvons discriminer entre les deux toxines Cry4. En synthétisant des anticorps à partir de peptides issus des deux toxines et dont les séquences d'acides aminés diffèrent suffisamment, nous espérons pouvoir **synthétiser des anticorps spécifiques de chacune des deux toxines** afin de pouvoir déterminer avec précision leurs proportions dans l'environnement. Ces résultats permettront également de mieux comprendre la pression de sélection à laquelle ont été exposés les moustiques de la souche LiTOX et à laquelle peuvent être exposés des moustiques en populations naturelles.

## II. Caractérisation de la résistance au *Bti*

### A. Que nous ont appris les approches globales ?

Pour étudier les mécanismes de résistance au *Bti* développés par la souche LiTOX, nous avons utilisé plusieurs approches globales permettant d'analyser simultanément un grand nombre de gènes, transcrits ou protéines sans *a priori* sur les catégories de gènes impliqués.



**Figure 90.** Diagrammes de Venn des gènes/protéines trouvés sous sélection ou différentiellement exprimés entre la souche sensible et la souche résistante selon les cinq approches globales réalisées (DArT, AFLP-454seq, DGETP, Microarrays, 2D-DIGE) et la RT-qPCR. La RT-qPCR désigne les analyses en gène candidat réalisées sur les intestins de larves. Les diagrammes de Venn ont été réalisés à l'aide du logiciel VENNY accessible gratuitement à <http://bioinfoq.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, 2007).

Les données obtenues avec les six différentes approches réalisées croisent peu, peut-être à cause des différentes générations auxquelles elles ont été réalisées (18<sup>ème</sup> pour DArT, AFLP-454seq et DGETP, 30<sup>ème</sup> pour Microarrays, DIGE et RT-qPCR) et des tissus utilisés pour les analyses (larves entières pour DArT, AFLP-454seq et DGETP et intestins de larves pour Microarrays, DIGE et RT-qPCR) (Figure 90).

Dans la catégorie des enzymes, le gène **AAEL008701** codant pour une **myoinositol oxygénase** est significativement sous-exprimé chez la souche LiTOX par rapport à la souche sensible à la fois dans les données DGETP (-6,2 fois ;  $p\text{-val} = 2,0 \cdot 10^{-07}$ ) et microarrays (-4,0 fois ;  $p\text{-val} = 7,9 \cdot 10^{-04}$ ). Cette enzyme est impliquée dans le cycle de l'inositol, molécule organique cyclique que l'on retrouve notamment dans la composition des domaines GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) servant d'ancres dans la membrane épithéliale intestinale pour certaines protéines telles que les phosphatases alcalines et les aminopeptidases N. Une sous-expression de cette enzyme peut avoir des conséquences sur le nombre d'ancres GPI et ainsi affecter tous les récepteurs GPI-ancrés des toxines du *Bti*. Ce gène fait partie des candidats et devra être validé ultérieurement.

De nombreuses protéases à sérines, trypsines et autres enzymes digestives ont été trouvées différentiellement exprimées par les approches DGETP et microarrays. Cependant, aucun des gènes détectés ne se retrouve différentiellement exprimé à la fois dans les deux approches. L'implication des enzymes digestives dans la résistance est suggérée par nos résultats d'enzymologie mais leur rôle exact reste globalement incompris et elles ne semblent participer que partiellement à la résistance au *Bti*, principalement pour la toxine Cry4Aa. Pour valider l'implication des enzymes digestives dans la résistance, les bioessais

aux toxines activées doivent être réalisés à nouveau avant de pouvoir aller plus loin dans la caractérisation de ces enzymes.

Dans la catégorie des récepteurs membranaires, le gène **AAEL003298** codant pour une **phosphatase alcaline** est sous-exprimé chez la souche LiTOX dans les données DGETP (-5.2 fois ; p-val =  $8,2 \cdot 10^{-12}$ ), microarrays (-1,6 fois ; p-val =  $2,2 \cdot 10^{-02}$ ), DIGE (-1,9 et -1,2 fois) et RT-qPCR (-1,6 fois). Cette phosphatase alcaline a déjà été décrite comme capable de se fixer à la toxine Cry4Ba (Bayyareddy *et al.*, 2009). Cela en fait un candidat de choix à valider ultérieurement. De même, les récepteurs potentiels détectés sous-exprimés dans au moins deux des trois approches réalisées sur les intestins de moustiques tels que les **phosphatases alcalines AAEL011175**, **AAEL003313** et **AAEL015070** ainsi que l'**aminopeptidase N AAEL012776** devront être validés. Pour valider l'implication de ces récepteurs GPI-ancrés dans la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX, un traitement des BBMV avec la PI-PLC (PhosphatidyInositol-PhosphoLipase C) sera réalisé. Les groupements GPI ainsi clivés, les phosphatases alcalines et les aminopeptidases seront relarguées, permettant de les étudier finement en western blot et en ligand blot. De plus, des limitations techniques ne nous ont pas permis de vérifier au niveau protéique la sous-expression de la **cadhérine AAEL007488** observée en microarrays (-1,5 fois ; p-val =  $2,8 \cdot 10^{-03}$ ) et en RT-qPCR (-1,5 fois). L'utilisation d'anticorps spécifiques des cadhérines sur les BBMV issus de la souche LiTOX et sensible sera envisagée en western blot pour les étudier plus spécifiquement.

Les expérimentations en ligand blot vont permettre d'accéder aux **modifications qualitatives** des récepteurs membranaires (e.g. une substitution non synonyme d'une base nucléotidique entraînant une modification de la séquence d'acides aminés au niveau des sites de fixation des toxines Cry), et non plus quantitatives comme avec les approches globales précédemment utilisées. Au vu de la localisation des spots fixant différemment les toxines Cry4Ba et Cry11Aa entre les deux souches lors des tests préliminaires, ces protéines semblent différentes de celles déjà identifiées et devront être ajoutées à la liste de gènes candidats à valider.

Parmi les autres gènes trouvés différemment exprimés, le gène **AAEL003239** codant pour une **protéine cuticulaire** est surexprimé en DGETP (+4,1 fois ; p-val =  $2,4 \cdot 10^{-109}$ ) et en microarrays (+5,1 fois ; p-val =  $1,9 \cdot 10^{-03}$ ). L'épaississement de la cuticule est un mécanisme de résistance connu contre les insecticides chimiques chez de nombreux insectes dont le moustique (Wood *et al.*, 2010). Le *Bti* agissant par ingestion, il est peu probable que l'épaississement de la cuticule externe joue un rôle dans la diminution de la pénétration du *Bti* et de ce fait dans la résistance. Cependant, ce gène a été trouvé

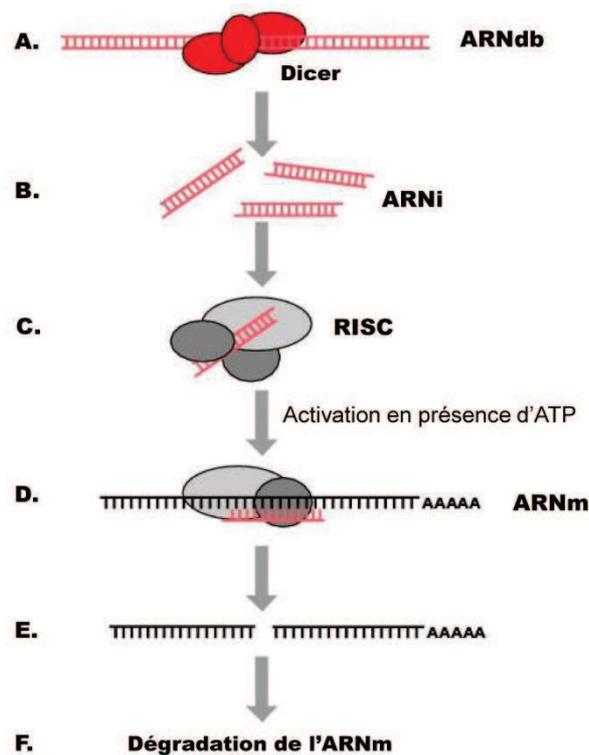
surexprimé au niveau de l'intestin ; en effet, la lumière de l'intestin des insectes est recouvert d'une membrane péritrophique en partie constituée de chitine, constituant principal de la cuticule, permettant de créer une barrière partiellement perméable limitant la pénétration d'agents pathogènes (Maddrell et Gardiner, 1980; Dow, 1986). Cette protéine est vraisemblablement un constituant de la membrane péritrophique et sa surexpression entraînerait l'épaississement et/ou l'imperméabilisation de cette membrane, rendant l'insertion des toxines du *Bti* dans la membrane épithéliale plus difficile. Pour vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de s'assurer que la protéine est bien présente au niveau de la membrane péritrophique, en utilisant par exemple des anticorps spécifiques, puis il faudra ensuite vérifier son implication dans le phénotype de résistance.

Enfin, la technique 2D-DIGE a fait ressortir quatre **V-ATPases (AAEL002827, AAEL008787, AAEL005798, AAEL012035)** toutes sous-représentées chez la souche LiTOX. Les V-ATPases pouvant intervenir à différentes étapes du mode d'action du *Bti* (*i.e.* alcalinisation et/ou récepteurs membranaires), leur implication réelle devra être validée avant de pouvoir étudier et valider leur rôle potentiel dans le phénotype de résistance.

## **B. Validations fonctionnelles : quelles approches envisager ?**

### **1. ARN interférence**

Cette technique est très largement utilisée pour valider l'implication de certaines protéines dans un phénotype particulier (Hannon, 2002). Hautement conservé entre les espèces, l'ARN interférence est un mécanisme naturel permettant aux cellules de réguler spécifiquement l'expression de certains gènes (Figure 91).



**Figure 91.** Mécanisme général de l'ARN interférence. L'ARN double brin (ARNdb) va être clivé par l'enzyme Dicer pour générer de petits ARN (A), d'une taille variant entre 19 et 21pb appelés ARNi (ou ARNsi) (B). Ces petits ARN sont reconnus par le complexe multiprotéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (C). En présence d'ATP, le complexe va reconnaître l'ARNm dont l'ARNi est spécifique (D) et le dégrader (E, F) permettant d'éteindre la protéine qu'il code. Adapté de (Chauchereau et Harel-Bellan, 2004).

Pour inhiber l'expression d'un gène, il est nécessaire d'introduire l'ARNdb spécifique de son ARNm à l'intérieur des cellules du tissu ciblé (Fire *et al.*, 1998). De nombreuses techniques ont été développées pour insérer les ARNdb dans les cellules mais leur efficacité dépend souvent de la nature du gène à éteindre, du tissu ciblé et du stade de développement de l'insecte (Walshe *et al.*, 2009; Terenius *et al.*, 2011). La technique d'**injection** a été utilisée dans de nombreuses études (Tabunoki *et al.*, 2004; Jaubert-Possamai *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2012), notamment sur des moustiques adultes (Zhu *et al.*, 2007; Benoit *et al.*, 2010). Cependant, cette approche très invasive induit généralement une forte mortalité lorsqu'elle est appliquée sur des larves de moustiques, empêchant son application dans notre contexte (Poupardin, 2012).

Les protéines potentiellement impliquées dans la résistance au *Bti*, notamment les récepteurs aux toxines Cry, sont localisés au niveau de l'intestin des larves de moustiques. Ainsi, il n'est pas judicieux de choisir une approche éteignant les gènes correspondants dans tout l'organisme mais plutôt de sélectionner une méthode qui cible un tissu particulier, dans notre cas l'intestin. La méthode par **ingestion** a également été très utilisée chez les insectes (Rajagopal *et al.*, 2002; Sivakumar *et al.*, 2007; Terenius *et al.*, 2011) et a fait ses preuves pour inhiber l'expression de gènes d'intérêt au niveau de l'intestin de larves de moustiques

(Cancino-Rodezno *et al.*, 2010). De plus, cette approche a d'ores et déjà été utilisée avec succès pour éteindre des N-aminopeptidases chez des larves d'*Ae. aegypti* (Saengwiman *et al.*, 2011). La méthode consiste à produire des ARNdb, soit par des bactéries (Timmons *et al.*, 2001), soit par PCR en utilisant une ARN polymérase T7 (Cancino-Rodezno *et al.*, 2010) puis à les encapsuler pour qu'ils puissent être facilement ingérés par les larves (Zhang *et al.*, 2010). L'ajout d'un agent de transfection cellulaire permet ensuite de traverser la membrane péritrophique puis la membrane cellulaire afin d'entrer dans les cellules intestinales (Cancino-Rodezno *et al.*, 2010). Cette technique semble donc **tout à fait appropriée pour étudier l'implication dans la résistance des récepteurs** détectés par les approches globales mais également l'implication des V-ATPases et de la myoinositol oxygénase. Ces approches ayant déjà été envisagées dans le cadre de la thèse de Rodolphe Poupardin, le matériel ainsi que le savoir-faire sont présents au LECA, permettant à cette méthode de pouvoir être rapidement adaptée et appliquée à notre problématique.

## 2. Expression des récepteurs en système hétérologue

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de l'implication des gènes candidats dans la résistance, notamment les récepteurs membranaires, les protéines correspondantes peuvent être produites dans des **lignées de cellules d'insectes**. Cette approche est particulièrement appropriée pour analyser les récepteurs qui seront identifiés par ligand blot, les différences attendues étant principalement qualitatives. En sur-exprimant dans des lignées cellulaires différentes les deux versions de chacune des protéines, *i.e.* récepteur fonctionnel chez la souche sensible et altéré chez la souche résistante, on pourra étudier leur capacité de fixation des toxines à la membrane mais également les purifier pour étudier finement leur structure tridimensionnelle.

Cette approche a déjà été réalisée dans le contexte de résistances au *Bt* chez de nombreux Lépidoptères (Agrawal *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2004) mais également pour étudier certains récepteurs à la toxine Cry4Ba chez *Ae. aegypti* (Dechklar *et al.*, 2011; Thammasittirong *et al.*, 2011). Tout le matériel nécessaire aux cultures cellulaires et à leur manipulation est disponible au LECA. Cependant, cette approche n'a encore jamais été envisagée et nécessitera donc un temps conséquent de mise en place.

## 3. Transgénèse chez les moustiques

L'objectif de cette approche est d'insérer dans les moustiques un **transgène**, c'est-à-dire un gène exogène ou un gène modifié, afin qu'il soit abondamment exprimé chez l'individu transgénique et dans les générations suivantes. Cette approche conviendrait ainsi à l'étude de la protéine cuticulaire détectée surexprimée chez la souche LiTOX, une fois sa

localisation au niveau de l'intestin validée. En augmentant son expression, il sera alors possible de déterminer si elle permet effectivement d'augmenter la tolérance des larves de moustiques au *Bti*. Cette approche pourra également être réalisée en sur-exprimant les récepteurs membranaires et vérifier qu'elle induit une sensibilité accrue des larves au *Bti*.

L'utilisation de cette approche est en plein essor et peut être réalisée de plusieurs manières. Les transgènes peuvent être injectés soit dans des moustiques au stade embryonnaire (Kokoza *et al.*, 2001; Labbe *et al.*, 2010) soit dans les adultes femelles (Baxter *et al.*, 2010; Isaacs *et al.*, 2011) qui le transmettront aux générations suivantes. Ces approches restent lourdes à réaliser et nécessitent des infrastructures adaptées et ne sont donc pas réalisables actuellement au LECA. Néanmoins, elles pourront être envisagées dans le cadre d'une collaboration avec d'autres laboratoires de recherche.

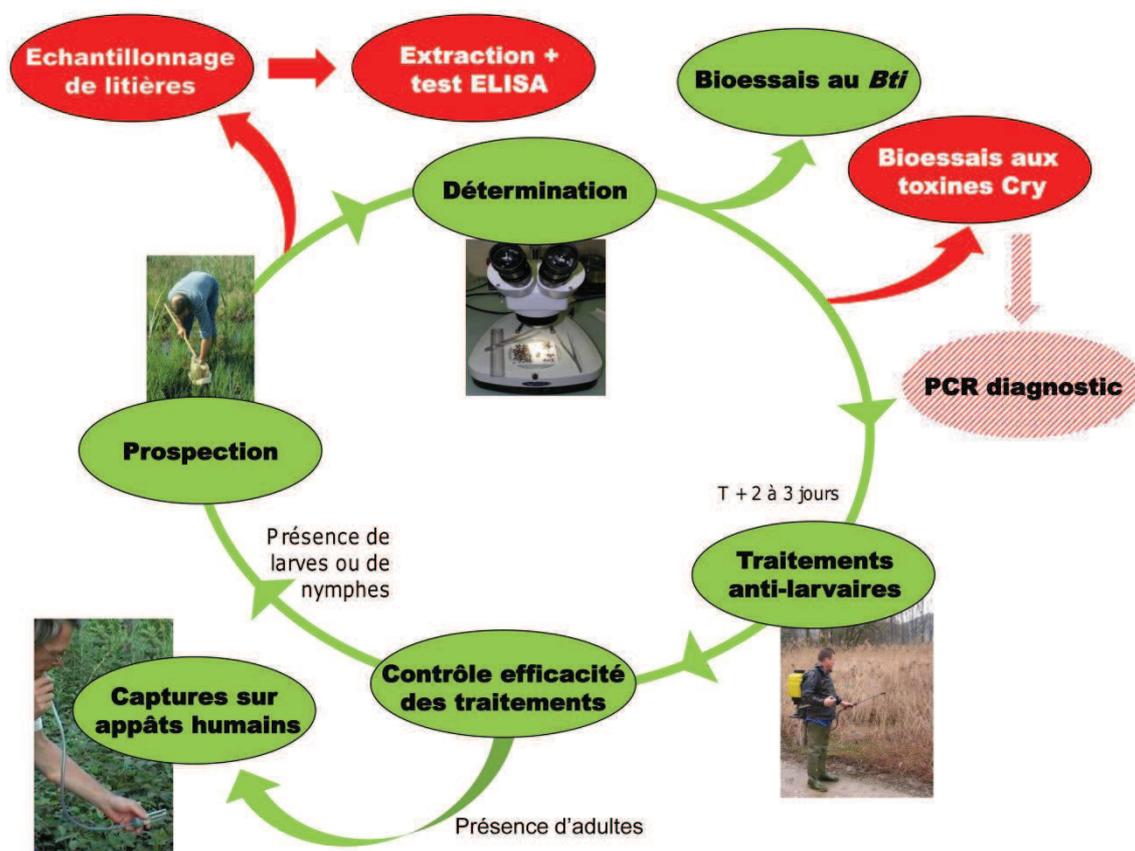
### C. Décortiquer la résistance au *Bti*

Tous les mécanismes précédemment identifiés permettront de mieux comprendre comment les moustiques peuvent résister à un cocktail de plusieurs toxines du *Bti*. Cependant, la part de chacune des toxines dans la pression de sélection ayant abouti au phénotype de résistance reste inconnue. Ainsi, l'étude des **souches LR4A, LR4B et LR11** sélectionnées respectivement aux toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa séparément permettra de mieux décortiquer les pressions de sélection exercées par chacune des toxines Cry du *Bti*. Lorsque les niveaux de résistance développés par ces souches seront suffisamment élevés, les patrons d'expression des gènes seront comparés entre les trois souches et la souche sensible afin de faire ressortir les grandes modifications spécifiques à certaines souches et celles partagées entre les trois souches résistantes. De plus, les mécanismes de résistance décrits chez la souche LiTOX seront systématiquement recherchés.

A terme, la connaissance de ces mécanismes de résistance permettra de développer des **outils diagnostiques** ciblant quelques gènes impliqués dans la résistance, communs à plusieurs souches sélectionnées. Cet outil pourra être utilisé pour détecter l'apparition d'allèles de résistance en populations naturelles de moustiques et suivre l'évolution de leurs fréquences pour contrôler l'apparition de résistances au *Bti*.

### III. Améliorer la détection et la gestion de la résistance

#### A. Apport des outils développés lors de cette thèse



**Figure 92.** Fonctionnement opérationnel du cycle traitements anti-larvaires / contrôles qualités réalisés par les Ententes Interdépartementales pour la Démoustication (EID) (en vert). L'apport des outils opérationnels développés lors de cette thèse sont représentés en rouge. La PCR diagnostic, qui sera développée lorsque le(s) gène(s) de résistance auront été caractérisés, est hachurée en rouge. Source du cycle opérationnel : EID Rhône-Alpes, reproduit avec l'autorisation de Delphine Rey.

En pleine saison de contrôle des populations de moustiques (approximativement de Février à Septembre), les EID appliquent un protocole opérationnel cyclique, comprenant notamment les traitements anti-larvaires mais également des contrôles de l'efficacité du traitement (Figure 92). Lors d'épisodes pluvieux, la mise en eau des gîtes à moustiques et la présence de larves sont recherchées. Avant qu'un traitement n'ait lieu, des larves sont régulièrement prélevées pour réaliser des tests toxicologiques à l'aide du *Bti*, afin de vérifier qu'aucune résistance n'est apparue.

Lors de cette thèse, nous avons développé à la fois des outils de détection des toxines du *Bti* mais également d'une résistance précoce au *Bti*. Les bioessais aux toxines Cry testées séparément peuvent s'ajouter aux bioessais réalisés au *Bti*. L'utilisation des doses diagnostiques, comme suggéré précédemment, permettra de diminuer le coût et le temps nécessaires à leur réalisation mais également d'augmenter la sensibilité des tests

effectués. De plus, si une tolérance accrue est observée, les larves pourront être conservées dans de l'éthanol à -20°C pour pouvoir rechercher les gènes de résistance à l'aide de la PCR diagnostique qui sera développée lors des travaux de recherche qui suivront cette thèse. Enfin, un échantillonnage régulier de litières végétales dans les gîtes à moustiques permettra, en appliquant le test d'extraction couplé à une détection ELISA, de suivre le devenir du *Bti* et de s'assurer qu'aucune remise en culture non-souhaitée du *Bti* n'est observée.

## B. *Bti*, what else ?

Comme nous l'avons présenté en introduction de cette thèse, la législation, notamment européenne, tend à faire du *Bti* le seul insecticide autorisé en démoustication anti-larvaire. Que se passera-t-il si une résistance au *Bti* apparaît et se propage ? Quelles sont les alternatives ?

Nous avons vu que plusieurs stratégies de gestion existent pour retarder l'apparition de résistance. La **stratégie « haute-dose-refuge »** est la stratégie qui montre la meilleure efficacité à diluer la résistance, notamment dans notre contexte de quasi-monopole du *Bti* (Lenormand et Raymond, 1998; Tabashnik, 2008; Tabashnik et Carriere, 2009; Carriere *et al.*, 2012). Les gîtes de la région Rhône-Alpes étant naturellement fortement dispersés, leur traitement systématique et exhaustif est tout bonnement impossible, générant ainsi un grand nombre de gîte non traités jouant le rôle de zones refuges. Dans le cas de la région méditerranéenne, les grandes étendues traitées par avion offrent moins de zones refuges. La présence de la Camargue, encore majoritairement non traitée, est une source importante d'individus sensibles pouvant jouer ce rôle.

La **stratégie de traitement en mosaïque** (Byford *et al.*, 1999) et la **stratégie de rotation** (Byford *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2010), où plusieurs insecticides différents sont utilisés pour traiter des populations adjacentes ou les mêmes populations sur des années différentes, ne semblent actuellement pas appropriées, aucune alternative au *Bti* n'étant actuellement disponible sur le marché. Seul *Bacillus sphaericus*, encore autorisé pour une utilisation combinée avec le *Bti*, peut jouer ce rôle en induisant une pression de sélection supplémentaire et une activité résiduelle plus importante que le *Bti* seul. De plus, les toxines du *Bti*, notamment la toxine Cyt1Aa, est connue pour retarder l'apparition de résistance au *Bs* et rétablir sa toxicité chez des populations résistantes, renforçant l'intérêt de leur utilisation conjointe, même ponctuellement (Wirth *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2010a). L'utilisation d'**insecticides chimiques adulticides** est encore autorisée mais cette approche ne peut être utilisée qu'en dernier recours, lorsque les traitements larvicides ont échoués ou

se sont montrés insuffisants. De nouveaux insecticides sont actuellement en développement pour posséder des alternatives au moins aussi efficaces et respectueuses de l'environnement que le *Bti*, tels que le **spinosad** (Hertlein *et al.*, 2010), ou encore des **inhibiteurs de croissance** (e.g. diflubenzuron) ou des **inhibiteurs de développement** (e.g. pyriproxyfen) (Seccacini *et al.*, 2008). Cependant, leur spécificité et/ou leur efficacité ne sont actuellement pas suffisantes pour remplacer ou relayer à terme le *Bti* (Duchet, 2010). L'utilisation de ces produits peut néanmoins être envisagée en combinaison avec le *Bti*, tout comme le *Bs*, afin de complexifier la pression de sélection exercée sur les moustiques et diminuer le risque de développement de résistance. L'innocuité de ces mélanges pour l'environnement et les populations humaines doit être évaluée avant de pouvoir permettre leur utilisation.

Récemment, un nombre grandissant d'études prône l'utilisation de **moustiques génétiquement modifiés** pour contrôler efficacement les populations de moustiques. Ainsi, des moustiques porteurs d'un gène létal dominant (RIDL) seraient relâchés dans des gîtes à moustiques, entraînant une éradication de la population dans les 10 à 20 semaines selon les auteurs (Black *et al.*, 2011; de Valdez *et al.*, 2011). Une autre stratégie consiste à relâcher des moustiques infectés par des bactéries endosymbiotiques *Wolbachia*, connues pour réduire leur durée de vie et affecter leur reproduction (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Walker et Moreira, 2011). Enfin, des adultes moustiques mâles stérilisés relâchés dans des gîtes à moustiques sont présentés comme une alternative propre pour faire diminuer de manière importante le nombre de moustiques (Bellini *et al.*, 2007). Malgré un nombre grandissant de preuves scientifiques de leur efficacité et de leur innocuité pour l'environnement et les populations humaines (Benedict *et al.*, 2011; Ostera et Gostin, 2011b; Ostera et Gostin, 2011a), l'application de ces approches est principalement limitée par des aspects éthiques et socio-culturels (Lavery *et al.*, 2008; Boete, 2011). Une évolution des mentalités, souvent lente et laborieuse, est nécessaire pour appliquer ces stratégies en milieu naturel, promettant un avenir certain à l'hégémonie du *Bti* en tant que larvicide anti-moustiques (Lacey, 2007).

#### IV. Conclusion générale

La grande spécificité et l'absence de résistance connue au *Bti* font de ce bioinsecticide une excellente alternative aux insecticides chimiques dans la lutte contre les larves de moustiques. Généralement qualifié de peu persistant dans l'environnement, dû à sa faible activité résiduelle, les résultats obtenus lors de cette thèse montrent que son recyclage est possible en milieu naturel et qu'il peut entraîner une production importante et non contrôlée de nouveaux cristaux toxiques. De plus, la persistance des différentes toxines du *Bti* étant différente, le cocktail de toxines présentes est modifié, pouvant faciliter la sélection de mécanismes de résistance chez les moustiques exposés. L'étude des bases moléculaires de la résistance développée contre ces litières toxiques a fait ressortir une résistance complexe, probablement multigénique, et a permis de générer une liste de plusieurs gènes candidats dont l'implication nécessitera d'être validée. L'utilisation de souches sélectionnées à chacune des toxines du *Bti* permettra d'aller plus loin dans la caractérisation de l'influence de chaque toxine dans le phénotype de résistance en analysant les mécanismes de résistance partagés et spécifiques à chaque toxine.

Plusieurs outils ont été développés dans cette thèse, permettant de suivre le devenir des toxines du *Bti* dans l'environnement mais également de détecter précocement l'apparition de résistance en populations naturelles de moustiques. Ces outils diagnostiques apportent aux gestionnaires tels que les EID les moyens de tracer le *Bti* épandu dans l'environnement et la possibilité d'anticiper les potentielles baisses d'efficacité des traitements insecticides liées à une adaptation des moustiques.

# Bibliographie

---

- Abdul-Rauf, M., Ellar, D. J., 1999. Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from whole *Aedes aegypti* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73:1, 45-51.
- Abdullah, M. A. F., Valaitis, A. P., Dean, D. H., 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem*. 7:16.
- Addanki, K. C., Sheraz, M., Knight, K., Williams, K., Pace, D. G., Bagasra, O., 2011. Detection of anthrax toxin genetic sequences by the solid phase oligo-probes. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 29:4, 372-378.
- Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., 2002. Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:9, 4583-4592.
- Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., 2004. SiRNA-directed silencing of transgene expressed in cultured insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 320:2, 428-434.
- Ahmad, A., Wilde, G. E., Zhu, K. Y., 2005. Detectability of Coleopteran-specific Cry3Bb1 protein in soil and its effect on nontarget surface and below-ground arthropods. *Environmental Entomology*. 34:2, 385-394.
- Akiner, M. M., Simsek, F. M., Caglar, S. S., 2009. Insecticide resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Turkey. *Journal of Pesticide Science*. 34:4, 259-264.
- Alcantara, E., Estrada, A., Alpuerto, V., Head, G., 2011. Monitoring Cry1Ab susceptibility in Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt corn in the Philippines. *Crop Protection*. 30:5, 554-559.
- Alonso-del-Rivero, M., Trejo, S. A., Rodriguez de la Vega, M., Gonzalez, Y., Bronsoms, S., Canals, F., Delfin, J., Diaz, J., Aviles, F. X., Chavez, M. A., 2009. A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*- a step into the invertebrate world of proteases. *Febs Journal*. 276:17, 4875-4890.
- Aly, C., Mulla, M. S., Federici, B. A., 1985. Sporulation and toxin production by *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera, Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 46:3, 251-258.
- Amalraj, D. D., Sahu, S. S., Jambulingam, P., Doss, P. S. B., Kalyanasundaram, M., Das, P. K., 2000. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Tropica*. 75:2, 243-246.
- Angst, B. D., Marcozzi, C., Magee, A. I., 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*. 114:4, 629-641.
- Angsuthanasombat, C., Uawithya, P., Leetachewa, S., Pornwiroon, W., Ounjai, P., Kerdcharoen, T., Katzenmeier, G., Panyim, S., 2004. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: Homology-based 3D model and implications for toxin activity. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 37:3, 304-313.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberon, M., Gomez, I., 2010. Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *Journal of Biological Chemistry*. 285:17, 12497-12503.
- Arensburger, P., Megy, K., Waterhouse, R. M., Abrudan, J., Amedeo, P., Antelo, B., Bartholomay, L., Bidwell, S., Caler, E., Camara, F., Campbell, C. L., Campbell, K. S., Casola, C., Castro, M. T., Chandramouliswaran, I., et al., 2010. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* Establishes a Platform for Mosquito Comparative Genomics. *Science*. 330:6000, 86-88.
- Asano, S., 2004. Bioassay with insects for *Bacillus thuringiensis* products - Factors affecting the results. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 48:4, 261-274.

- Bah, A., van Frankenhuyzen, K., Brousseau, R., Masson, L., 2004. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85:2, 120-127.
- Barbault, R., Boeuf, G., Blondel, J., Gouyon, P.-H., Lebreton, J.-D., Le Maho, Y., McKey, D., Raymond, M., Thompson, J., Des moustiques et des hommes. Libération, 2011.
- Barneoud, L., Moustiques non grata. Libération, 2006.
- Barrett, R. D. H., Schluter, D., 2008. Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*. 23:1, 38-44.
- Baxter, R. H. G., Steinert, S., Chelliah, Y., Volohonsky, G., Levashina, E. A., Deisenhofer, J., 2010. A heterodimeric complex of the LRR proteins LRIM1 and APL1C regulates complement-like immunity in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:39, 16817-16822.
- Bayyareddy, K., Andacht, T. M., Abdullah, M. A., Adang, M. J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39:4, 279-286.
- Beaumont, M. A., Nichols, R. A., 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 263:1377, 1619-1626.
- Becker, N., 2002. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 18:1, 57-62.
- Becker, N., 2003. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae - A new application technique. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 19:1, 63-66.
- Becker, N., Djakaria, S., Kaiser, A., Zulhasril, O., Ludwig, H. W., Efficacy of a new tablet formulation of an asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. Society for Vector Ecology, Santa Ana, CA, ETATS-UNIS, 1991.
- Becker, N., Peric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M., Kaiser, A., 2010. Mosquitoes and their control.
- Bel, Y., Siqueira, H. A. A., Siegfried, B. D., Ferré, J., Escriche, B., 2009. Variability in the cadherin gene in an *Ostrinia nubilalis* strain selected for Cry1Ab resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39:3, 218-223.
- Bellini, R., Calvitti, M., Medici, A., Carrieri, M., Celli, G., Maini, S., Use of the Sterile Insect Technique Against *Aedes albopictus* in Italy: First Results of a Pilot Trial In: A. S. R. J. H. M. J. B. Vreysen, (Ed.), Area-Wide Control of Insect Pests, Vienne, 2007.
- Benedict, M. Q., James, A. A., Collins, F. H., 2011. Safety of Genetically Modified Mosquitoes. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 305:20, 2069-2070.
- Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., Lounibos, L. P., 2007. Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 7:1, 76-85.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*. 57:1, 289-300.
- Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Phillips, Z. P., Patrick, K. R., Denlinger, D. L., 2010. Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. *Journal of Insect Physiology*. 56:2, 151-156.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., Holden, M. T. G., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J., 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:10, 5082-5095.
- Beyenbach, K. W., Wieczorek, H., 2006. The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*. 209:4, 577-589.

- Bhattacharya, P. R., 2000. Hyper-production of insecticidal crystal protein (delta-endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is not related to sporulation-specific biochemical functions. *Current Microbiology*. 41:3, 187-191.
- Black, W. C., Alpey, L., James, A. A., 2011. Why RIDL is not SIT. *Trends in Parasitology*. 27:8, 362-370.
- Boete, C., 2011. Scientists and public involvement: a consultation on the relation between malaria, vector control and transgenic mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 105:12, 704-710.
- Boisvert, J., Lacoursière, J., Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Québec, 2004.
- Boisvert, M., Boisvert, J., 1999. Persistence of toxic activity and recycling of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cold water: Field experiments using diffusion chambers in a pond. *Biocontrol Science and Technology*. 9:4, 507-522.
- Boisvert, M., Boisvert, J., 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology*. 10:5, 517-561.
- Boisvert, M., Boisvert, J., Aubin, A., 2001. Factors affecting residual dosages of two formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* tested in the same stream during a 3-year experiment. *Biocontrol Science and Technology*. 11:6, 727-744.
- Bonin, A., Paris, M., Despres, L., Tetreau, G., David, J. P., Kilian, A., 2008. A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection. *BMC Genomics*. 9:459.
- Bonin, A., Paris, M., Tetreau, G., David, J. P., Despres, L., 2009. Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations. *BMC Genomics*. 10:551.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*. 348:2, 363-382.
- Boudko, D. Y., Moroz, L. L., Linser, P. J., Trimarchi, J. R., Smith, P. J. S., Harvey, W. R., 2001. In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using noninvasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *Journal of Experimental Biology*. 204:4, 691-699.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:1-2, 248-254.
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49:4, 423-435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., Soberon, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41:7, 423-431.
- Bravo, A., Sanchez, J., Kouskoura, T., Crickmore, N., 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *Journal of Biological Chemistry*. 277:27, 23985-23987.
- Bravo, A., Soberon, M., 2008. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? *Trends in Biotechnology*. 26:10, 573-579.
- Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., Silva-Filho, M. C., 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37:12, 1283-1290.
- Brogdon, W. G., McAllister, J. C., 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. 4:4, 605-613.
- Brown, A. W., Pal, R., 1971. Insecticide resistance in arthropods. *Public health papers*. 38:0, 1-491.
- Butko, P., 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:5, 2415-2422.

- Byford, R. L., Craig, M. E., DeRouen, S. M., Kimball, M. D., Morrison, D. G., Wyatt, W. E., Foil, L. D., 1999. Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera : Muscidae). *International Journal for Parasitology*. 29:1, 125-135.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., Hamm, H. E., 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine Reviews*. 24:6, 765-781.
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villasenor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberon, M., Gill, S. S., Bravo, A., 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40:1, 58-63.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bulla, L. A., 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2:1, 19-28.
- Canton, P. E., Reyes, E. Z., de Escudero, I. R., Bravo, A., Soberon, M., 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*. 32:3, 595-600.
- Caquet, T., Roucaute, M., Le Goff, P., Lagadic, L., 2011. Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target saltmarsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74:5, 1122-1130.
- Carriere, Y., Eilers-Kirk, C., Biggs, R. W., Nyboer, M. E., Unnithan, G. C., Dennehy, T. J., Tabashnik, B. E., 2006. Cadherin-based resistance to *Bacillus thuringiensis* cotton in hybrid strains of pink bollworm: Fitness costs and incomplete resistance. *Journal of Economic Entomology*. 99:6, 1925-1935.
- Carriere, Y., Eilers-Kirk, C., Hartfield, K., Larocque, G., Degain, B., Dutilleul, P., Dennehy, T. J., Marsh, S. E., Crowder, D. W., Li, X. C., Ellsworth, P. C., Naranjo, S. E., Palumbo, J. C., Fournier, A., Antilla, L., *et al.*, 2012. Large-scale, spatially-explicit test of the refuge strategy for delaying insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:3, 775-780.
- Carron, A., Traits d'histoire de vie et démographie du moustique *Aedes caspius* (Pallas, 1771) (Diptera : Culicidae) : impact des traitements larvicides. UMR 5175 CEFE (Centre d'Ecologie fonctionnelle et évolutive), Vol. Thèse de Doctorat. Université Montpellier III – Paul Valéry, Montpellier, 2007, pp. 220.
- Carson, R., 1962. Silent Spring. Houghton Mifflin, United States.
- Castagnola, A., Jurat-Fuentes, J. L., 2009. Resistance to Cry toxins and epithelial healing. *IOBC/WPRS Bulletin*. 45, 27-32.
- Charles, J. F., Nielsen-LeRoux, C., 2000. Mosquitocidal bacterial toxins: Diversity, mode of action and resistance phenomena. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 95, 201-206.
- Chauchereau, A., Harel-Bellan, A., 2004. Inactivation fonctionnelle des gènes par ARN interférence *Hématologie*. 10:1, 68-79.
- Chen, J. W., Aimanova, K. G., Fernandez, L. E., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S. S., 2009a. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochemical Journal*. 424, 191-200.
- Chen, J. W., Aimanova, K. G., Pan, S. Q., Gill, S. S., 2009b. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39:10, 688-696.
- Chen, L. Z., Liang, G. M., Zhang, J., Wu, K. M., Guo, Y. Y., Rector, B. G., 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 73:2, 61-73.
- Cheung, P. Y. K., Hammock, B. D., 1985. Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:4, 984-988.

- Chevillon, C., Addis, G., Raymond, M., Marchi, A., 1995. Population-structure in mediterranean islands and risk of genetic invasion in *Culex-pipiens* (Diptera, Culicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 55:4, 329-343.
- Chilcott, C. N., Ellar, D. J., 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *Journal of General Microbiology*. 134, 2551-2558.
- Christiansen, J. A., McAbee, R. D., Stanich, M. A., DeChant, P., Boronda, D., Cornel, A. J., 2004. Influence of temperature and concentration of Vectobac(R) on control of the salt-marsh mosquito, *Ochlerotatus squamiger*, in Monterey County, California. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 20:2, 165-170.
- Claeys-Mekdade, C., 2003. Les controverses relatives à la démoustication de la Camargue : rapports à l'animal et au territoire. *Espaces et Sociétés*. 110-111:3-4, 147-166.
- Claeys-Mekdade, C., Nicolas, L., 2009. Le moustique fauteur de troubles. *Ethnologie française*. 39:1, 109-116.
- Claeys, C., Sérandour, J., 2009. Ce que le moustique nous apprend sur le dualisme anthropocentrisme/biocentrisme : perspective interdisciplinaire sociologie/biologie. *Natures Sciences Sociétés*. 17, 136-144.
- Clements, A. N., 1992. The Biology of Mosquitoes. Chapman et Hall Press, London.
- Coates, B. S., Sumerford, D. V., Lopez, M. D., Wang, H. C., Fraser, L. M., Kroemer, J. A., Spencer, T., Kim, K. S., Abel, C. A., Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., 2011. A single major QTL controls expression of larval Cry1F resistance trait in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and is independent of midgut receptor genes. *Genetica*. 139:8, 961-972.
- Consigny, P. H., Lecuit, M., Lortholary, O., 2006. Infection par le virus Chikungunya : une alphavirose ré-émergente. *Medecine/Sciences*. 22, 444-446.
- Coppolino, M. G., Dedhar, S., 1998. Calreticulin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 30:5, 553-558.
- Crandall, C. S., 1913. Mosquitoes Pollinating Orchids. *Science*. 38:11, 51.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D. H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:3, 807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2012. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Crosa, G., Yameogo, L., Calamari, D., Konde, F., Nabe, K., 2001. Effects of larvicide treatment on invertebrate communities of Guinean rivers, West Africa. *Hydrobiologia*. 458, 151-158.
- Darboux, I., Charles, J. F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). *Cellular Microbiology*. 9:8, 2022-2029.
- David, J. P., Boyer, S., Mesneau, A., Ball, A., Ranson, H., Dauphin-Villemant, C., 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36:5, 410-420.
- David, J. P., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M. A., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*. 11:216.
- David, J. P., Rey, D., Cuany, A., Bride, J. M., Meyran, J. C., 2002. Larvicidal properties of decomposed leaf litter in the subalpine mosquito breeding sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21:1, 62-66.
- David, J. P., Rey, D., Pautou, M. P., Meyran, J. C., 2000. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75:1, 9-18.

- de Araujo, A. P., de Melo-Santos, M. A. V., Carlos, S. D., Rios, E., Regis, L., 2007. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera : Culicidae). *Biological Control*. 41:3, 339-347.
- de Barjac, H., Frachon, E., 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35, 233-240.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. 17:4, 193-199.
- de Melo-Santos, M. A. V., de Araujo, A. P., Rios, E. M. M., Regis, L., 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biological Control*. 49:2, 186-191.
- De Respinis-Chappuis, S., Approche moléculaire de l'impact de *Bacillus thuringiensis israelensis* en tant que biopesticide. Persistance et transfert génétique horizontal, après 12 ans d'applications dans une zone humide protégée (Bolle di Magadino). Laboratoire de bactériologie et écologie microbienne. Département de botanique et de biologie végétale., Vol. Thèse de doctorat. Université de Genève, Losone, 2002, pp. 99.
- De Respinis, S., Demarta, A., Patocchi, N., Luthy, P., Peduzzi, R., Tonolla, M., 2006. Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Letters in Applied Microbiology*. 43:5, 495-501.
- de Valdez, M. R. W., Nimmo, D., Betz, J., Gong, H. F., James, A. A., Alphey, L., Black, W. C., 2011. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:12, 4772-4775.
- De Wit, M., Keil, D., van der Ven, K., Vandamme, S., Witters, E., De Coen, W., 2010. An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 alpha-ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative Endocrinology*. 167:2, 190-201.
- Dechklar, M., Tiwari, K., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41:3, 159-166.
- Denamur, E., Matic, I., 2006. Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular Microbiology*. 60:4, 820-827.
- Desenclos, J. C., Fontenille, D., 2011. The future of vector-borne infections in France. *Medecine Et Maladies Infectieuses*. 41:6, 293-294.
- Despres, L., David, J. P., Gallet, C., 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*. 22:6, 298-307.
- Dow, J. A. T., 1986. Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology*. 19, 187-328.
- Du, J. P., Knowles, B. H., Li, J., Ellar, D. J., 1999. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. *Biochemical Journal*. 338, 185-193.
- Duchet, C., Evaluation du risque environnemental lié à l'utilisation de larvicides d'origine biologique dans le cadre de la lutte anti-culicidés - Développement et validation expérimentale de méthodes de suivi des effets à différents niveaux d'organisation biologique chez *Daphnia pulex* et *Daphnia magna*. Vol. Thèse de Doctorat, 2010.
- Dupont, C., Boisvert, J., 1986. Persistence of *Bacillus-thuringiensis* serovar *israelensis* toxic activity in the environment and interaction with natural substrates. *Water Air and Soil Pollution*. 29:4, 425-438.
- Eisenhaber, B., Bork, P., Yuan, Y. P., Löffler, G., Eisenhaber, F., 2000. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C-elegans*. *Trends in Biochemical Sciences*. 25:7, 340-341.
- Erban, T., Hubert, J., 2010. Determination of pH in regions of the midguts of acaridid mites. *Journal of Insect Science*. 10.

- Erlanson, M. A., Hegedus, D. D., Baldwin, D., Noakes, A., Toprak, U., 2010. Characterization of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larval midgut protease complement and adaptation to feeding on artificial diet, brassica species, and protease inhibitor. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 75:2, 70-91.
- Escobar, E., Segura, C., Vanegas, M., Patarroyo, M. E., Orduz, S., 2000. Proteolytic processing of the Cyt1Ab1 toxin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *medellin*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 95:5, 693-700.
- Fang, J., 2010. A world without mosquitoes. *Nature*. 466:7305, 432-434.
- Fankhauser, N., Maser, P., 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*. 21:9, 1846-1852.
- Faulde, M. K., Albiez, G., Nehring, O., 2010. Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. *Parasitology Research*. 106:4, 957-965.
- Federici, B. A., Recombinant Bacterial Larvicides for Control of Important Mosquito Vectors of Disease. In: P. W. Atkinson, (Ed.), *Vector Biology, Ecology and Control*, 2010, pp. 163-176.
- Federici, B. A., Park, H.-W., Bideshi, D. K., Wirth, M. C., Johnson, J. J., Sakano, Y., Tang, M., 2007. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 23:2, 164-175.
- Federici, B. A., Park, H. W., Bideshi, D. K., Wirth, M. C., Johnson, J. J., 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *Journal of Experimental Biology*. 206:21, 3877-3885.
- Feng, Q., Bechtel, W. J., 1994. pH-induced conformational transitions of Cry IA(a), Cry IA(c), and Cry IIIA delta-endotoxins in *Bacillus-thuringiensis*. *Biochemistry*. 33:28, 8521-8526.
- Fernandez-Luna, M. T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S. S., Bravo, A., Soberon, M., Miranda-Rios, J., 2010a. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Microbiology*. 12:3, 746-757.
- Fernandez-Luna, M. T., Tabashnik, B. E., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Soberon, M., Miranda-Rios, J., 2010b. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104:3, 231-233.
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A., Soberon, M., 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal*. 394, 77-84.
- Fernandez, L. E., Perez, C., Segovia, L., Rodriguez, M. H., Gill, S. S., Bravo, A., Soberon, M., 2005. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. *Febs Letters*. 579:17, 3508-3514.
- Ferré, J., Escrache, B., Bel, Y., Vanrie, J., 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus-thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Fems Microbiology Letters*. 132:1-2, 1-7.
- Feyereisen, R., Insect CYP genes and P450 Enzymes. In: L. I. Gilbert, (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press, 2011, pp. 236-316.
- French-Constant, R. H., 2007. Which came first: insecticides or resistance? *Trends in Genetics*. 23:1, 1-4.
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:6669, 806-811.
- Foll, M., Gaggiotti, O., 2008. A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics*. 180:2, 977-993.
- Fonseca-Gonzalez, I., Cardenas, R., Gomez, W., Santacoloma, L., Brochero, H., Ocampo, C., Salazar, M., McAllister, J., Brogdon, W., Quinones, M., 2010. Diagnostic doses for monitoring insecticide resistance of malaria vectors in Colombia. *Revista Colombiana De Entomologia*. 36:1, 54-61.

- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M. D., Martinez, R., 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 31:3, 257-272.
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M. D., Tato, A., Martinez, R., 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 42:1, 51-63.
- Fornasier, F., Margon, A., 2007. Bovine serum albumin and Triton X-100 greatly increase phosphomonoesterases and arylsulphatase extraction yield from soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 39:10, 2682-2684.
- Fortier, M., Vachon, V., Kirouac, M., Schwartz, J. L., Laprade, R., 2005. Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Journal of Membrane Biology*. 208:1, 77-87.
- Foss, E. J., Radulovic, D., Shaffer, S. A., Goodlett, D. R., Kruglyak, L., Bedalov, A., 2011. Genetic Variation Shapes Protein Networks Mainly through Non-transcriptional Mechanisms. *PLoS Biology*. 9:9, e1001144.
- Gahan, L. J., Gould, F., Heckel, D. G., 2001. Identification of a gene associated with *Bt* resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. 293:5531, 857-860.
- Gao, Y. L., An, J. J., Liu, C. X., Wu, K. M., 2010. Monitoring of Bt Resistance from Field-collected *Helicoverpa armigera* Populations in Northern China. *Southwestern Entomologist*. 35:3, 399-402.
- Gassmann, A. J., Carriere, Y., Tabashnik, B. E., 2009. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. 54, 147-163.
- Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Keweshan, R. S., Dunbar, M. W., 2011. Field-Evolved Resistance to *Bt* Maize by Western Corn Rootworm. *PLoS ONE*. 6:7, e22629.
- Georghiou, G. P., Metcalf, R. L., E., G. F., 1966. Carbamate-Resistance in Mosquitos. Selection of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann (= *C. quinquefasciatus* Say) for Resistance to Baygon. *Bulletin of World Health Organization*. 35, 691-708.
- Georghiou, G. P., Wirth, M. C., 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3, 1095-1101.
- Gibson, D. M., Gallo, L. G., Krasnoff, S. B., Ketchum, R. E. B., 1995. Increased efficacy of *Bacillus-thuringiensis* subsp *kurstaki* in combination with tannic-acid. *Journal of Economic Entomology*. 88:2, 270-277.
- Gibson, G., Dworkin, I., 2004. Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Reviews Genetics*. 5:9, 681-690.
- Gill, S. S., Cowles, E. A., Pietrantonio, P. V., 1992. The mode of action of *Bacillus-thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37, 615-636.
- Girish, V., Vijayalakshmi, A., 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*. 41:1, 47.
- Goeldi, E. A., Os Mosquitos no Pará. Memorias do Museu Goeldi, Pará, Brazil, 1905.
- Goldberg, L. J., Margalit, J., 1977. Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles-sergentii*, *Uranotaenia-unguiculata*, *Culex-univitattus*, *Aedes-aegypti* and *Culex-pipiens*. *Mosquito News*. 37:3, 355-361.
- Goldman, I. F., Arnold, J., Carlton, B. C., 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47:3, 317-324.
- Gomez, I., Arenas, I., Pacheco, S., Bravo, A., Soberon, M., 2010. New Insights into the Mode of Action of Cry1Ab Toxin Used in Transgenic Insect-resistant Crops. *Southwestern Entomologist*. 35:3, 387-390.

- Gonzalez, P., Pantani, O. L., Ristori, G. G., Fereres, A., Toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* sorbed on clays: Persistence and activity against the mosquito *Culex pipiens*. In: A. Violante, P. M. Huang, J. M. Bollag, L. Gianfreda, Eds.), Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health, Volume 28b - Ecological Significance of the Interactions among Clay Minerals, Organic Matter and Soil Biota, 2002, pp. 69-78.
- Gorham, J. R., 1976. Orchid Pollination By *Aedes* Mosquitos In Alaska. *American Midland Naturalist*. 95:1, 208-210.
- Gould, E. A., Gallian, P., de Lamballerie, X., Charrel, R. N., 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinical Microbiology and Infection*. 16:12, 1702-1704.
- Gould, F., Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner, L., Moar, W., 1995. Selection and genetic-analysis of a *Heliothis-virescens* (Lepidoptera, Noctuidae) strain with high-levels of resistance to *Bacillus-thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology*. 88:6, 1545-1559.
- Gould, F., Martinezramirez, A., Anderson, A., Ferré, J., Silva, F. J., Moar, W. J., 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus-thuringiensis* toxins in *H-virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:17, 7986-7990.
- Gratz, N. G., 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 18:3, 215-227.
- Griffitts, J. S., Aroian, R. V., 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. *Bioessays*. 27:6, 614-624.
- Griffitts, J. S., Haslam, S. M., Yang, T. L., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell, A., Adang, M. J., Aroian, R. V., 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*. 307:5711, 922-925.
- Griffitts, J. S., Whitacre, J. L., Stevens, D. E., Aroian, R. V., 2001. *Bt* toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*. 293:5531, 860-864.
- Gubler, D. J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:3, 480-496.
- Guerchicoff, A., Ugalde, R. A., Rubinstein, C. P., 1997. Identification and characterization of a previously undescribed Cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:7, 2716-2721.
- Guidi, V., De Respinis, S., Benagli, C., Luthy, P., Tonolla, M., 2010. A real-time PCR method to quantify spores carrying the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cry4Aa and cry4Ba genes in soil. *Journal of Applied Microbiology*. 109:4, 1209-1217.
- Guillemaud, T., Lenormand, T., Bourguet, D., Chevillon, C., Pasteur, N., Raymond, M., 1998. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: Allele replacement and changing environment. *Evolution*. 52:2, 443-453.
- Gunning, R. V., Dang, H. T., Kemp, F. C., Nicholson, I. C., Moores, G. D., 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:5, 2558-2563.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R., 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 19:3, 1720-1730.
- Hajaj, M., Carron, A., Deleuze, J., Gaven, B., Setier-Rio, M. L., Vigo, G., Thiery, I., Nielsen-LeRoux, C., Lagneau, C., 2005. Low persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* spores in four mosquito biotopes of a salt marsh in southern france. *Microbial Ecology*. 50:4, 475-487.
- Haldane, J. B. S., 1927. A Mathematical Theory of Natural and Artificial Selection, Part V: Selection and Mutation. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. 23, 838-844.
- Hannon, G. J., 2002. RNA interference. *Nature*. 418:6894, 244-251.
- Harrison, G., 1978. Mosquitos, malaria and man - A history of the hostilities since 1880. New York.

- Hartley, C. J., Newcomb, R. D., Russell, R. J., Yong, C. G., Stevens, J. R., Yeates, D. K., La Salle, J., Oakeshott, J. G., 2006. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:23, 8757-8762.
- Harvey, W. R., Okech, B. A., Linser, P. J., Becnel, J. J., Ahearn, G. A., Sterling, K. M., 2010. H<sup>+</sup> V-ATPase-Energized Transporters in Brush Border Membrane Vesicles from Whole Larvae of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 56:10, 1377-1389.
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao, J. Z., Shelton, A. M., Gould, F., Tabashnik, B. E., 2007. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95:3, 192-197.
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., 1999. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:15, 8373-8377.
- Heintze, C., Garrido, M. V., Kroeger, A., 2007. What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 101:4, 317-325.
- Helassa, N., M'Charek, A., Quiquampoix, H., Noinville, S., Dejardin, P., Frutos, R., Staunton, S., 2011a. Effects of physicochemical interactions and microbial activity on the persistence of Cry1Aa *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 43:5, 1089-1097.
- Helassa, N., Quiquampoix, H., Noinville, S., Szponarski, W., Staunton, S., 2009. Adsorption and desorption of monomeric *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology & Biochemistry*. 41:3, 498-504.
- Helassa, N., Revault, M., Quiquampoix, H., Dejardin, P., Staunton, S., Noinville, S., 2011b. Adsorption on montmorillonite prevents oligomerization of *Bt* Cry1Aa toxin. *Journal of Colloid and Interface Science*. 356:2, 718-725.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34:7, 653-665.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*. 45, 371-391.
- Henchal, E. A., Putnak, J. R., 1990. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 3:4, 376-396.
- Hermisson, J., Pennings, P. S., 2005. Soft sweeps: Molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation. *Genetics*. 169:4, 2335-2352.
- Hernandez-Martinez, P., Navarro-Cerrillo, G., Caccia, S., de Maagd, R. A., Moar, W. J., Ferré, J., Escrache, B., Herrero, S., 2010. Constitutive Activation of the Midgut Response to *Bacillus thuringiensis* in *Bt*-Resistant *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*. 5:9, e12795.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J., de Maagd, R. A., 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*. 6:96.
- Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J., 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:3, 1085-1089.
- Hertlein, M. B., Mavrotas, C., Jousseau, C., Lysandrou, M., Thompson, G. D., Jany, W., Ritchie, S. A., 2010. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 26:1, 67-87.
- Hivrale, V. K., Lomate, P. R., Kalve, N. D., Kachole, M. S., 2011. *Periplaneta americana* midgut proteases differentially expressed against dietary components from different plant seeds. *Physiological Entomology*. 36:2, 180-186.
- Holt, J. S., Lebaron, H. M., 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology*. 4:1, 141-149.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M. C., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W.

- H., Rusch, D. B., *et al.*, 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298:5591, 129-149.
- Hosseininaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S., Kazzazi, M., 2007. Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae : Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*. 43, 515-522.
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M. A. F., Adang, M. J., 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry*. 47:18, 5101-5110.
- Hua, G., Zhang, R., Bayyareddy, K., Adang, M. J., 2009. *Anopheles gambiae* Alkaline Phosphatase Is a Functional Receptor of *Bacillus thuringiensis jegathesan* Cry11Ba Toxin. *Biochemistry*. 48:41, 9785-9793.
- Huang, F. N., Zhu, K. Y., Buschman, L. L., Higgins, R. A., Oppert, B., 1999. Comparison of midgut proteinases in *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 65:2, 132-139.
- Hwang, J., Kim, Y., 2011. RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 108:3, 194-200.
- Igic, R., Garber, S., Sekosan, M., Urbanska, R. A., Behnia, R., 2003. Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney. *Peptides*. 24:8, 1237-1240.
- Isaacs, A. T., Li, F. W., Jasinskiene, N., Chen, X. G., Nirmala, X., Marinotti, O., Vinetz, J. M., James, A. A., 2011. Engineered Resistance to *Plasmodium falciparum* Development in Transgenic *Anopheles stephensi*. *Plos Pathogens*. 7:4.
- Isayama, S., Suzuki, T., Nakai, M., Kunimi, Y., 2011. Influences of Tannic Acid and Polyphenols in the Leaves of Strawberry, Fragaria x ananassa, and Perilla, *Perilla frutescens viridis* on the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Formulation against the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 55:2, 49-57.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., Neill, S. L. O., 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *Embo Reports*. 12:6, 508-518.
- Ivanov, D. B., Philippova, M. P., Tkachuk, V. A., 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry-Moscow*. 66:10, 1174-1186.
- Jaccoud, D., Peng, K. M., Feinstein, D., Kilian, A., 2001. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*. 29:4.
- Jackson, J. K., Horwitz, R. J., Sweeney, B. W., 2002. Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* on black flies and nontarget macroinvertebrates and fish in a large river. *Transactions of the American Fisheries Society*. 131:5, 910-930.
- Janmaat, A. F., Myers, J., 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 270:1530, 2263-2270.
- Jaubert-Possamai, S., Le Trionnaire, G., Bonhomme, J., Christophides, G. K., Risse, C., Tagu, D., 2007. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Bmc Biotechnology*. 7.
- Jia, X. Y., Briese, T., Jordan, I., Rambaut, A., Chi, H. C., Mackenzie, J. S., Hall, R. A., Scherret, J., Lipkin, W. I., 1999. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet*. 354:9194, 1971-1972.
- Jimenez-Juarez, N., Munoz-Garay, C., Gomez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J. Y., Gill, S. S., Soberon, M., Bravo, A., 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *Journal of Biological Chemistry*. 282:29, 21222-21229.
- Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M. J., 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*. 271:15, 3127-3135.

- Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M. J., 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92:3, 166-171.
- Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M. J., 2007. A proteomic approach to study Cry1Ac binding proteins and their alterations in resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95:3, 187-191.
- Jurat-Fuentes, J. L., Karumbaiah, L., Jakka, S. R. K., Ning, C. M., Liu, C. X., Wu, K. M., Jackson, J., Gould, F., Blanco, C., Portilla, M., Perera, O., Adang, M., 2011. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*. 6:3, e17606.
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V., Paupy, C., 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors*. 4.
- Karch, S., Asidi, N., Manzambi, Z. M., Salaun, J. J., 1992. Efficacy of *Bacillus-sphaericus* against the malaria vector *Anopheles-gambiae* and other mosquitos in swamps and rice fields in Zaire. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 8:4, 376-380.
- Karch, S., Manzambi, Z. A., Salaun, J. J., 1991. Field trials with Vectolex (*Bacillus-sphaericus*) and Vectobac (*Bacillus-thuringiensis* (H-14)) against *Anopheles-gambiae* and *Culex quinquefasciatus* breeding in Zaire. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 7:2, 176-179.
- Karumbaiah, L., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M. J., 2007. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 146:1, 139-146.
- Kayondo, J. K., Mukwaya, L. G., Stump, A., Michel, A. P., Coulibaly, M. B., Besansky, N. J., Collins, F. H., 2005. Genetic structure of *Anopheles gambiae* populations on islands in northwestern Lake Victoria, Uganda. *Malaria Journal*. 4:59.
- Khawaled, K., Bendov, E., Zaritsky, A., Barak, Z., 1990. The fate of *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* in *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis*-killed pupae of *Aedes-aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56:3, 312-316.
- Knowles, B. H., Blatt, M. R., Tester, M., Horsnell, J. M., Carroll, J., Menestrina, G., Ellar, D. J., 1989. A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Febs Letters*. 244:2, 259-262.
- Knowles, B. H., Ellar, D. J., 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus-thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 924:3, 509-518.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E. A., Raikhel, A. S., 2001. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac 3xP3-EGFP afm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31:12, 1137-1143.
- Kramer, L. D., Styer, L. M., Ebel, G. D., A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annual Review of Entomology*, 2008, pp. 61-81.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J. L., McNall, R. J., Andacht, T., Adang, M. J., 2007. Identification of novel CryIAC binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37:3, 189-201.
- Kumar, A., Sharma, V. P., Thavaselvam, D., Sumodan, P. K., Kamat, R. H., Audi, S. S., Surve, B. N., 1996. Control of *Culex quinquefasciatus* with *Bacillus sphaericus* in Vasco City, Goa. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 12:3, 409-413.
- Kwon, B., Kim, Y., 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 101:1, 36-41.
- Kwon, S., Kim, Y., 2007. Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Yponoineutidae). *Biological Control*. 42:1, 72-76.

- Kyle, J. L., Harris, E., 2008. Global Spread and Persistence of Dengue. *Annual Review of Microbiology*. 62, 71-92.
- Labbe, G. M. C., Nimmo, D. D., Alphey, L., 2010. piggybac- and PhiC31-Mediated Genetic Transformation of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *Plos Neglected Tropical Diseases*. 4:8.
- Labbe, P., Sidos, N., Raymond, M., Lenormand, T., 2009. Resistance Gene Replacement in the Mosquito *Culex pipiens*: Fitness Estimation From Long-Term Cline Series. *Genetics*. 182:1, 303-312.
- Lacey, L. A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 23:2, 133-163.
- Lacey, L. A., Smittle, B., 1985. The effects of gamma radiation on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Bulletin of Society For Vector Ecology*. 10, 98-101.
- Lambert, B., Peferoen, M., 1992. Insecticidal promise of *Bacillus-thuringiensis*. *Bioscience*. 42:2, 112-122.
- Lambrechts, L., Scott, T. W., Gubler, D. J., 2010. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4:5, e646.
- Lavery, J. V., Harrington, L. C., Scott, T. W., 2008. Ethical, social, and cultural considerations for site selection for research with genetically modified mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79:3, 312-318.
- Lee, C. Y., 2009. Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2, 2.4.1-2.4.29.
- Lee, L., Saxena, D., Stotzky, G., 2003a. Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:7, 4111-4115.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., Chen, J. S., 2003b. Mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:8, 4648-4657.
- Lenormand, T., Raymond, M., 1998. Resistance management: the stable zone strategy. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 265:1409, 1985-1990.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A., Benz, R., 2006. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for oligomer and channel formation. *Biochemistry*. 45:1, 283-288.
- Li, H. R., Oppert, B., Higgins, R. A., Huang, F. N., Zhu, K. Y., Buschman, L. L., 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34:8, 753-762.
- Li, J., Derbyshire, D. J., Promdonkoy, B., Ellar, D. J., 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochemical Society Transactions*. 29, 571-577.
- Li, J., Koni, P. A., Ellar, D. J., 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*. 257:1, 129-152.
- Likitvivanavong, S., Chen, J. W., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S. S., 2011a. Cadherin, Alkaline Phosphatase, and Aminopeptidase N as Receptors of Cry11Ba Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:1, 24-31.
- Likitvivanavong, S., Chen, J. W., Evans, A. M., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S. S., 2011b. Multiple Receptors as Targets of Cry Toxins in Mosquitoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:7, 2829-2838.

- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araujo, A. P., da Silva, E. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., Santana, A. E. G., Barbosa, C. N., Neto, C. C. D., Goulart, M. O. F., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J., Santos, M., 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. *Parasites & Vectors*. 4:5.
- Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, C., Netsawang, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., Thiemmecca, S., Sriburi, R., Sittisombut, N., Malasit, P., Yenichitsomanus, P. T., 2009. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 379:2, 196-200.
- Linser, P. J., Smith, K. E., Seron, T. J., Oviedo, M. N., 2009. Carbonic anhydrases and anion transport in mosquito midgut pH regulation. *Journal of Experimental Biology*. 212:11, 1662-1671.
- Liu, H., Cupp, E. W., Guo, A. G., Liu, N. N., 2004a. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology*. 41:5, 946-952.
- Liu, H. Q., Cupp, E. W., Micher, K. M., Guo, A. G., Liu, N. N., 2004b. Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Medical Entomology*. 41:3, 408-413.
- Loke, S. R., Andy-Tan, W. A., Benjamin, S., Lee, H. L., Sofian-Azirun, M., 2010. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Tropical Biomedicine*. 27:3, 493-503.
- Lundstrom, J. O., Schafer, M. L., Petersson, E., Vinnersten, T. Z. P., Landin, J., Brodin, Y., 2010. Production of wetland Chironomidae (Diptera) and the effects of using *Bacillus thuringiensis israelensis* for mosquito control. *Bulletin of Entomological Research*. 100:1, 117-125.
- Luz, P. M., Vanni, T., Medlock, J., Paltiel, A. D., Galvani, A. P., 2011. Dengue vector control strategies in an urban setting: an economic modelling assessment. *Lancet*. 377:9778, 1673-1680.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., Schmidt, O., 2005. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant, *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35:7, 729-739.
- Maddrell, S. H. P., Gardiner, B. O. C., 1980. The permeability of the cuticular lining of the insect alimentary canal. *Journal of Experimental Biology*. 85:APR, 227-237.
- Madliger, M., Gasser, C. A., Schwarzenbach, R. P., Sander, M., 2011. Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to Silica Particles. Effects on Transport and Bioactivity. *Environmental Science & Technology*. 45:10, 4377-4384.
- Malavige, G. N., Fernando, S., Fernando, D. J., Seneviratne, S. L., 2004. Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal*. 80:948, 588-601.
- Mancebo, A., Molier, T., Gonzalez, B., Lugo, S., Riera, L., Arteaga, M. E., Bada, A. M., Gonzalez, Y., Pupo, M., Hernandez, Y., Gonzalez, C., Rojas, N. M., Rodriguez, G., 2011. Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 59:1, 184-190.
- Manceva, S. D., Pusztai-Carey, M., Russo, P. S., Butko, P., 2005. A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry*. 44:2, 589-597.
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., Brengues, C., Yebakima, A., Ranson, H., Corbel, V., David, J. P., 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*. 10:494.
- Margalit, J., Bobroglo, H., 1984. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* serotype-H-14. *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology*. 97:5, 516-520.

- Matambo, T. S., Abdalla, H., Brooke, B. D., Koekemoer, L. L., Mnzava, A., Hunt, R. H., Coetzee, M., 2007. Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the *kdr* mutation. *Medical and Veterinary Entomology*. 21:1, 97-102.
- Matsui, M., Fowler, J. H., Walling, L. L., 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*. 387:12, 1535-1544.
- McGaughey, W. H., Johnson, D. E., 1994. Influence of crystal protein-composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in indianmeal moths (Lepidoptera, Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*. 87:3, 535-540.
- McNall, R. J., Adang, M. J., 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33:10, 999-1010.
- Meigen, J. W., 1818. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. Aachen.
- Meigs, T. E., Fedor-Chaikin, M., Kaplan, D. D., Brackenbury, R., Casey, P. J., 2002.  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$  negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *Journal of Biological Chemistry*. 277:27, 24594-24600.
- Meissle, M., Romeis, J., Bigler, F., 2011. Bt maize and integrated pest management - a European perspective. *Pest Management Science*. 67:9, 1049-1058.
- Meunier, L., Prefontaine, G., Van Munster, M., Brousseau, R., Masson, L., 2006. Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Molecular Biology*. 15:4, 475-483.
- Mittal, P. K., Adak, T., Subbarao, S. K., 2005. Laboratory selection to investigate the development of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera : Culicidae). *National Academy Science Letters-India*. 28:7-8, 281-283.
- Mohan, M., Gujar, G. T., 2003. Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae : Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. 82:1, 1-11.
- Moreira Beltrao, H. D. B., Neves Lobo Silva-Filha, M. H., 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) larvae midgut. *Fems Microbiology Letters*. 266:2, 163-169.
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Eilers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Brown, J. K., Tabashnik, B. E., 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:9, 5004-5009.
- Mulla, M. S., Chaney, J. D., Rodchareon, J., 1993. Elevated dosages of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* fail to extend control of *Culex* larvae. *Bulletin of Society For Vector Ecology*. 18, 125-132.
- Mulla, M. S., Thavara, U., Tawatsin, A., Chompoonsri, J., 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 20:1, 64-73.
- Munoz-Garay, C., Rodriguez-Almazan, C., Aguilar, J. N., Portugal, L., Gomez, I., Saab-Rincon, G., Soberon, M., Bravo, A., 2009. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* Has an Important Role in Toxicity against *Aedes aegypti*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:23, 7548-7550.
- Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z. J., Loftus, B., Xi, Z. Y., Megy, K., Grabherr, M., Ren, Q. H., Zdobnov, E. M., Lobo, N. F., Campbell, K. S., Brown, S. E., et al., 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 316:5832, 1718-1723.
- Neri-Barbosa, J. F., Quiroz-Martinez, H., Rodriguez-Tovar, M. L., Tejada, L. O., Badii, M. H., 1997. Use of Bactimos(R) briquets (*Bti* formulation) combined with the backswimmer *Notonecta*

- irrorata* (Hemiptera:Notonectidae) for control of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 13:1, 87-89.
- Newcomb, R. D., Gleeson, D. M., Yong, C. G., Russell, R. J., Oakeshott, J. G., 2005. Multiple mutations and gene duplications conferring organophosphorus insecticide resistance have been selected at the Rop-1 locus of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Journal of Molecular Evolution*. 60:2, 207-220.
- Nielsen-Leroux, C., Pasteur, N., Pretre, J., Charles, J. F., Ben Sheikh, H., Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae): The complex situation of west Mediterranean countries. *Journal of Medical Entomology*. 39:5, 729-735.
- Nielsen, R., Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*, 2005, pp. 197-218.
- Nothomb, A., 2001. *Cosmétique de l'ennemi*. Albin Michel, France.
- Ocampo, C. B., Salazar-Terreros, M. J., Mina, N. J., McAllister, J., Brogdon, W., 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*. 118:1, 37-44.
- Oestergaard, J., Ehlers, R. U., Martinez-Ramirez, A. C., Real, M. D., 2007a. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera : Nematocera) and subsequent pore formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:11, 3623-3629.
- Oestergaard, J., Voss, S., Lange, H., Lemke, H., Strauch, O., Ehlers, R. U., 2007b. Quality control of *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis* products based on toxin quantification with monoclonal antibodies. *Biocontrol Science and Technology*. 17:3, 295-302.
- Ohana, B., Margalit, J., Barak, Z., 1987. Fate of *Bacillus-thuringiensis* subsp *israelensis* under simulated field conditions *Applied and Environmental Microbiology*. 53:4, 828-831.
- Okech, B. A., Boudko, D. Y., Linser, P. J., Harvey, W. R., 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*. 211:6, 957-968.
- Oliveira, C. M. F., Silva-Filha, M. H., Nielsen-Leroux, C., Pei, G. F., Yuan, Z. M., Regis, L., 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from China and Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 41:1, 58-64.
- Oliveros, J. C., Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams., 2007.
- Onken, H., Moffett, D. F., 2009. Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalization in the anterior midgut of larval mosquitoes. *Journal of Experimental Biology*. 212:3, 373-377.
- Onken, H., Moffett, S. B., Moffett, D. F., 2008. Alkalinization in the isolated and perfused anterior midgut of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of insect science (Online)*. 8, 1-20.
- Oppert, B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 42:1, 1-12.
- Oppert, B., Hammel, R., Throne, J. E., Kramer, K. J., 2000. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. 96:3, 281-287.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., McGaughey, W. H., 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*. 272:38, 23473-23476.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D. E., Macintosh, S. C., McGaughey, W. H., 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus-thuringiensis* resistant strain of *Plodia-interpunctella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 198:3, 940-947.
- Organisme Mondial de la Santé, 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. *Report of the WHO Informal Consultation, 28-30 September 1998*. WHO/CDS/CPC/MAL/9812.
- Organisme Mondial de la Santé, 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *Geneva: World Health Organization*. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
- Organisme Mondial de la Santé, Chikungunya ; Aide-mémoire n°327. 2008.

- Organisme Mondial de la Santé, Dengue et dengue hémorragique ; Aide-mémoire n°117. 2009.
- Organisme Mondial de la Santé, 2010. World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization. 39-62.
- Organisme Mondial de la Santé, Fièvre jaune ; Aide-mémoire n°100. 2011a.
- Organisme Mondial de la Santé, Filariose lymphatique ; Aide-mémoire n°102. 2011b.
- Organisme Mondial de la Santé, Paludisme ; Aide-mémoire n°94. 2011c.
- Organisme Mondial de la Santé, Virus du Nil Occidental ; Aide-mémoire n°354. 2011d.
- Orr, H. A., 2005. The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics*. 6:2, 119-127.
- Ostera, G. R., Gostin, L. O., 2011a. Biosafety Concerns Involving Genetically Modified Mosquitoes to Combat Malaria and Dengue in Developing Countries. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 305:9, 930-931.
- Ostera, G. R., Gostin, L. O., 2011b. Safety of Genetically Modified Mosquitoes Reply. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 305:20, 2070-2070.
- Ounjai, P., Unger, V. M., Sigworth, F. J., Angsuthanasombat, C., 2007. Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: Implications for toxin-pore formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 361:4, 890-895.
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S. S., Bravo, A., Soberon, M., 2009. Domain II Loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Is Involved in a "Ping Pong" Binding Mechanism with *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and Cadherin Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 284:47, 32750-32757.
- Pagel-Wieder, S., Niemeyer, J., Fischer, W. R., Gessler, F., 2007. Effects of physical and chemical properties of soils on adsorption of the insecticidal protein (Cry1Ab) from *Bacillus thuringiensis* at Cry1Ab protein concentrations relevant for experimental field sites. *Soil Biology & Biochemistry*. 39:12, 3034-3042.
- Palm, C. J., Donegan, K., Harris, D., Seidler, R. J., 1994. Quantification in soil of *Bacillus-thuringiensis* var *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology*. 3:2, 145-151.
- Palm, C. J., Schaller, D. L., Donegan, K. K., Seidler, R. J., 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* delta-endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology*. 42:12, 1258-1262.
- Pardo-Lopez, L., Munoz-Garay, C., Porta, H., Rodriguez-Almazan, C., Soberon, M., Bravo, A., 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*. 30:3, 589-595.
- Paris, M., David, J. P., Despres, L., 2011a. Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology*. 20, 1184-1194.
- Paris, M., Despres, L., 2012. Identifying insecticide resistance genes in mosquito by combining AFLP genome scans and 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05499.x.
- Paris, M., Melodelima, C., Coissac, E., Tetreau, G., Reynaud, S., David, J. P., Despres, L., 2012. Transcription profiling of resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109:2, 201-208.
- Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., David, J.-P., 2011b. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Management Science*. 67, 122-128.
- Patz, J. A., Epstein, P. R., Burke, T. A., Balbus, J. M., 1996. Global climate change and emerging infectious diseases. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 275:3, 217-223.
- Paul, A., Harrington, L. C., Zhang, L., Scott, J. G., 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 21:3, 305-309.

- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., Fontenille, D., 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*. 11:14-15, 1177-1185.
- Petersen, L. R., Hayes, E. B., 2004. Westward ho? The spread of West Nile virus. *New England Journal of Medicine*. 351:22, 2257-2259.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29:9, e45.
- Pierleoni, A., Martelli, P. L., Casadio, R., 2008. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*. 9:392.
- Pigott, C. R., Ellar, D. J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71:2, 255-281.
- Poisson, G., Chauve, C., Chen, X., Bergeron, A., 2007. FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring. *Genomics, proteomics & bioinformatics / Beijing Genomics Institute*. 5:2, 121-30.
- Popova-Butler, A., Dean, D. H., 2009. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *Journal of Insect Physiology*. 55:3, 264-272.
- Poulin, B., Lefebvre, G., Paz, L., 2010. Red flag for green spray: adverse trophic effects of *Bti* on breeding birds. *Journal of Applied Ecology*. 47:4, 884-889.
- Poupardin, R., Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Laboratoire d'Ecologie Alpine, Vol. Thèse de doctorat. Université de Grenoble I, Grenoble, 2012.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J. P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38:5, 540-551.
- Poupardin, R., Riaz, M. A., Jones, C. M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., David, J. P., 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic Toxicology*. 114-115, 49-57.
- Promdonkoy, B., Ellar, D. J., 2003. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Journal*. 374, 255-259.
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., Panyim, S., 2005. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Fems Microbiology Letters*. 252:1, 121-126.
- Przeworski, M., Coop, G., Wall, J. D., 2005. The signature of positive selection on standing genetic variation. *Evolution*. 59:11, 2312-2323.
- R Development Core Team, R: a language and environment for statistical computing., 2007. <www.R-project.org>.
- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O., 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:9, 2696-2699.
- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., Schmidt, O., 2007. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96:2, 125-132.
- Raiko, I., Sander, I., Weber, D. G., Raulf-Heimsoth, M., Gillissen, A., Kollmeier, J., Scherpereel, A., Bruning, T., Johnen, G., 2010. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients. *BMC Cancer*. 10:242.
- Rajagopal, R., Arora, N., Sivakumar, S., Rao, N. G. V., Nimbalkar, S. A., Bhatnagar, R. K., 2009. Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochemical Journal*. 419, 309-316.

- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 277:49, 46849-46851.
- Ranson, H., Abdallah, H., Badolo, A., Guelbeogo, W. M., Kerah-Hinzoumbe, C., Yangalbe-Kalnone, E., Sagnon, N., Simard, F., Coetzee, M., 2009. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malaria Journal*. 8:299.
- Ravoahangimalala, O., Charles, J. F., 1995. *In-vitro* binding of *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles-gambiae* larvae (Diptera, Culicidae). *Febs Letters*. 362:2, 111-115.
- Ravoahangimalala, O., Charles, J. F., Schoellerraccand, J., 1993. Immunological localization of *Bacillus-thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles-gambiae* larvae (Diptera, Culicidae). *Research in Microbiology*. 144:4, 271-278.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol*. 18:5, 189-94.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., Chevillon, C., 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation ? *Genetica*. 112, 287-296.
- Regis, L., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J. F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*. 17:8, 377-380.
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M. G., Majori, G. C., *et al.*, 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 370:9602, 1840-1846.
- Riaz, M. A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., David, J. P., 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicology*. 93:1, 61-69.
- Ribeiro, J. M. C., Francischetti, I. M. B., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*. 48, 73-88.
- Ricroch, A., Berge, J. B., Kuntz, M., 2010. Is the German suspension of MON810 maize cultivation scientifically justified? *Transgenic Research*. 19:1, 1-12.
- Riobo, N. A., Manning, D. R., 2005. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G<sub>12</sub> family. *Trends in Pharmacological Sciences*. 26:3, 146-154.
- Ritchie, S. A., Rapley, L. P., Benjamin, S., 2010. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *Am J Trop Med Hyg*. 82:6, 1053-9.
- Rodriguez-Almazan, C., de Escudero, I. R., Canton, P. E., Munoz-Garay, C., Perez, C., Gill, S. S., Soberon, M., Bravo, A., 2011. The Amino- and Carboxyl-Terminal Fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa Toxin Have Differential Roles in Toxin Oligomerization and Pore Formation. *Biochemistry*. 50:3, 388-396.
- Rodriguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D. J., Ayra-Pardo, C., 2010. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*. 12:11, 2894-2903.
- Rodriguez, M. D., Martinez-Barnette, J., Alvarado-Delgado, A., Batista, C., Argotte-Ramos, R. S., Hernandez-Martinez, S., Ceron, L. G., Torres, J. A., Margos, G., Rodriguez, M. H., 2007. The surface protein Pvs25 of *Plasmodium vivax* ookinetes interacts with calreticulin on the midgut apical surface of the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 153:2, 167-177.
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., Je, Y. H., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17:4, 547-559.

- Ross-Ibarra, J., Morrell, P. L., Gaut, B. S., 2007. Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 8641-8648.
- Ross, R., 1901. Malaria and mosquitoes. *Nature*. 63, 440-440.
- Ruiz, L. M., Segura, C., Trujillo, J., Orduz, S., 2004. *In vivo* binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera : Culicidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 99:1, 73-79.
- Rukmini, V., Reddy, C. Y., Venkateswerlu, G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*. 82:2, 109-116.
- Ryffel, G. U., 2011. Dismay with GM maize A science-based solution to public resistance against genetically modified crops that could be compatible with organic farming. *Embo Reports*. 12:10, 996-999.
- Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. *In vivo* identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 407:4, 708-713.
- Saleh, M. S., El-Meniawi, F. A., Kelada, N. L., Zahran, H. M., 2003. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*. 127:1, 29-32.
- Schnell, D. J., Pfannenstiel, M. A., Nickerson, K. W., 1984. Bioassay of solubilized *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals by attachment to latex beads. *Science*. 223:4641, 1191-1193.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:3, 775-806.
- Schwartz, O., Albert, M. L., 2010. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*. 8:7, 491-500.
- Seccacini, E., Lucia, A., Harburguer, L., Zerba, E., Licastro, S., Masuh, H., 2008. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 24:3, 398-403.
- Setbon, M., Bley, D., Perceptions et information-éducation-communication (IEC) sur la LAV. In: I. Editions, (Ed.), La lutte antivectorielle en France, 2009, pp. 319-349.
- Setbon, M., Raude, J., Collaboration Avec Cire, A., 2008. Perceptions and preventive behavior against dengue fever in Martinique. *Medecine Et Maladies Infectieuses*. 38, S78-S81.
- Severson, D. W., Knudson, D. L., Soares, M. B., Loftus, B. J., 2004. *Aedes aegypti* genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34:7, 715-721.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A., Salkinoja-Salonen, M., 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*. 27:3, 347-355.
- Sheeran, W., Fisher, S. W., 1992. The effects of agitation, sediment, and competition on the persistence and efficacy of *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* (Bti). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 24:3, 338-346.
- Shin, E. H., Park, C., Kim, H. K., Lee, D. K., Kim, S. I., Kang, H., Chang, K. S., 2011. Insecticide susceptibility of *Ephemera orientalis* (Ephemeroptera: Ephemeridae) and two mosquito species, *Anopheles sinensis* and *Culex pipiens* in the Republic of Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 14:3, 233-236.
- Silva, M., de Melo Chalegre, K. D., Anastacio, D. B., de Oliveira, C. M. F., da Silva, S. B., Acioli, R. V., Hibi, S., de Oliveira, D. C., Parodi, E. S. M., Marques, C. A. M., Furtado, A. F., Regis, L., 2008. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biological Control*. 44:2, 227-234.

- Silva, T. B. M., Siqueira, H. A. A., Oliveira, A. C., Torres, J. B., Oliveira, J. V., Montarroyos, P. A. V., Farias, M., 2011. Insecticide resistance in Brazilian populations of the cotton leaf worm, *Alabama argillacea*. *Crop Protection*. 30:9, 1156-1161.
- Singh, G. J. P., Schouest Jr, L. P., Gill, S. S., 1986. The toxic action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Aedes aegypti* in vivo: I. The relevance of midgut lesions to its poisoning syndrome. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 26:1, 36-46.
- Sivakumar, S., Rajagopal, R., Venkatesh, G. R., Srivastava, A., Bhatnagar, R. K., 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*. 282:10, 7312-7319.
- Sivasupramaniam, S., Head, G. P., English, L., Li, Y. J., Vaughn, T. T., 2007. A global approach to resistance monitoring. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95:3, 224-226.
- Skibbe, U., Christeller, J. T., Callaghan, P. T., Eccles, C. D., Laing, W. A., 1996. Visualization of pH gradients in the larval midgut of *Spodoptera litura* using P-31-NMR microscopy. *Journal of Insect Physiology*. 42:8, 777-790.
- Soberon, M., Gill, S. S., Bravo, A., 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66:8, 1337-1349.
- Soberon, M., Pardo-Lopez, L., Lopez, I., Gomez, I., Tabashnik, B. E., Bravo, A., 2007. Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. *Science*. 318:5856, 1640-1642.
- Son, Y., Hwang, J., Kim, Y., 2012. Functional study of the gene encoding apolipoprotein III in development and immune responses in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 15:1, 106-112.
- Song, S. M., Park, J. H., Kim, J., Kim, S. I., Hong, Y. C., Kong, H. H., Chung, D. I., 2008. Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitology International*. 57:3, 334-341.
- Soper, F. L., 1963. Elimination of urban yellow-fever in Americas through eradication of *Aedes aegypti*. *American Journal of Public Health and the Nations Health*. 53:1, 7-16.
- Springate, S., Colvin, J., 2012. Pyrethroid insecticide resistance in British populations of the cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella*. *Pest Management Science*. 68:2, 260-267.
- Srivastava, R., Bhalwar, R., Tilak, V. W., 1998. A mathematical model for predicting the persistence and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in relation to water pollution. *Medical Journal Armed Forces India*. 54:2, 107-110.
- Stapley, J., Reger, J., Feulner, P. G. D., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison, C., Ball, A. D., Beckerman, A. P., Slate, J., 2010. Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology & Evolution*. 25:12, 705-712.
- Stevens, M. M., Helliwell, S., Hughes, P. A., 2005. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulations, spinosad, and selected synthetic insecticides to *Chironomus tepperi* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 21:4, 446-450.
- Stoops, C. A., Adler, P. H., 2006. Feeding behavior of larval black flies (Diptera : Simuliidae) with and without exposure to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Vector Ecology*. 31:1, 79-83.
- Stotzky, G., 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil*. 266:1-2, 77-89.
- Su, T. Y., Mulla, M. S., 2004. Documentation of high-level *Bacillus sphaericus* 2362 resistance in field populations of *Culex quinquefasciatus* breeding in polluted water in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 20:4, 405-411.
- Tabashnik, B. E., 2008. Delaying insect resistance to transgenic crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:49, 19029-19030.

- Tabashnik, B. E., Biggs, R. W., Fabrick, J. A., Gassmann, A. J., Dennehy, T. J., Carriere, Y., Morin, S., 2006. High-level resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cadherin genotype in pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*. 99:6, 2125-2131.
- Tabashnik, B. E., Carriere, Y., Insect Resistance to Genetically Modified Crops. In: N. Ferry, A. M. R. Gatehouse, Eds.), Environmental Impact of Genetically Modified Crops, 2009, pp. 74-100.
- Tabashnik, B. E., Carriere, Y., 2010. Field-Evolved Resistance to *Bt* Cotton Bollworm in the U S and Pink Bollworm in India. *Southwestern Entomologist*. 35:3, 417-424.
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N., Johnson, M. W., 1990. Field development of resistance to *Bacillus-thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*. 83:5, 1671-1676.
- Tabashnik, B. E., Liu, T. B., Dennehy, T. J., Sims, M. A., Sisterson, M. S., Biggs, R. W., Carriere, Y., 2002. Inheritance of resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera : Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*. 95:5, 1018-1026.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., de Maagd, R. A., Dennehy, T. J., 2000. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:10, 4582-4584.
- Tabunoki, H., Higurashi, S., Ninagi, O., Fujii, H., Banno, Y., Nozaki, M., Kitajima, M., Miura, N., Atsumi, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Sato, R., 2004. A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Febs Letters*. 567:2-3, 175-178.
- Taylor, A., 1993. Aminopeptidases: structure and function. *Faseb Journal*. 7:2, 290-298.
- Tenaillon, M. I., Tiffin, P. L., 2008. The quest for adaptive evolution: a theoretical challenge in a maze of data. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:2, 110-115.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C. J., Aymeric, J. L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalieri, F., Collinge, D. P., *et al.*, 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*. 57:2, 231-245.
- Terra, W. R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes - properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 109:1, 1-62.
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C. M., Stalinski, R., Riaz, M. A., Paris, M., David, J. P., Adang, M. J., Despres, L., 2012a. Larval Midgut Modifications Associated with *Bti* Resistance in the Yellow Fever Mosquito using Proteomic and Transcriptomic Approaches. *BMC Genomics*. 13.
- Tetreau, G., Reynaud, S., Veyrenc, S., Despres, L., Extraction des toxines du bioinsecticide *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) à partir d'échantillons environnementaux. In: U. d. G. I.-UJF, (Ed.), Vol. FR 11 60365, France, 2011.
- Tetreau, G., Stalinski, R., David, J. P., Despres, L., Soumis à JIP. Larval gut proteolytic activity and *Bti* resistance in the dengue fever mosquito. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J. P., Reynaud, S., Despres, L., 2012b. Decreased Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquito Larvae after Contact with Leaf Litter *Applied and Environmental Microbiology*. 78:15.
- Thai, K. T. D., Anders, K. L., 2011. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. *Experimental Biology and Medicine*. 236:8, 944-954.
- Thammasittirong, A., Dechklar, M., Leetachewa, S., Pootanakit, K., Angsuthanasombat, C., 2011. *Aedes aegypti* Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Expressed in Escherichia coli Retains High-Affinity Binding for Bacillus thuringiensis Cry4Ba Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:19, 6836-6840.
- Theiler, M., Smith, H. H., 1937. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *Journal of Experimental Medicine*. 65:6, 787-800.

- Thien, L. B., 1969. Mosquito Pollination of *Habenaria obtusata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 56:2, 232-&.
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R. A., Gury, J., 2008. Long Lasting Persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp *israelensis* (*Bti*) in Mosquito Natural Habitats. *PLoS ONE*. 3:10, e3432.
- Timmons, L., Court, D. L., Fire, A., 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 263:1-2, 103-112.
- Tomori, O., 2004. Yellow fever: The recurring plague. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 41:4, 391-427.
- Tousignant, M. E., Boisvert, J. L., Chalifour, A., 1993. Loss of *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* larvicidal activity and its distribution in benthic substrates and hyporheic zone of streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50:2, 443-451.
- Tran, L. B., Vachon, V., Schwartz, J. L., Laprade, R., 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:10, 4488-4494.
- Unlu, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., 1997. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 18:11, 2071-2077.
- Vachon, V., Laprade, R., Schwartz, J. L., 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., Bulla, L. A., 1993. A specific binding-protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus-thuringiensis* subsp *berliner*. *Journal of Biological Chemistry*. 268:17, 12334-12340.
- Valaitis, A. P., 2008. *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38:6, 611-618.
- Valaitis, A. P., Jenkins, J. L., Lee, M. K., Dean, D. H., Garner, K. J., 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 46:4, 186-200.
- van Munster, M., Prefontaine, G., Meunier, L., Elias, M., Mazza, A., Brousseau, R., Masson, L., 2007. Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Molecular Biology*. 16:1, 25-35.
- Vasquez, M. I., Violaris, M., Hadjivassilis, A., Wirth, M. C., 2009. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Field Populations in Cyprus to Conventional Organic Insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*, and Methoprene. *Journal of Medical Entomology*. 46:4, 881-887.
- Vaughan, I. P., Newberry, C., Hall, D. J., Liggett, J. S., Ormerod, S. J., 2008. Evaluating large-scale effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-biting midges (*Chironomidae*) in a eutrophic urban lake. *Freshwater Biology*. 53:10, 2117-2128.
- Venkatesan, M., Rasgon, J. L., 2010. Population genetic data suggest a role for mosquito-mediated dispersal of West Nile virus across the western United States. *Molecular Ecology*. 19:8, 1573-1584.
- Venugopal, M. G., Wolfersberger, M. G., Wallace, B. A., 1992. Effects of pH on conformational properties related to the toxicity of *Bacillus-thuringiensis* delta-endotoxin. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1159:2, 185-192.
- Vettori, C., Paffetti, D., Saxena, D., Stotzky, G., Giannini, R., 2003. Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 35:12, 1635-1642.
- Vilarinhos, P. T. R., Monnerat, R., 2004. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 20:3, 311-314.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandeleee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP - a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23:21, 4407-4414.
- Walker, T., Moreira, L. A., 2011. Can *Wolbachia* be used to control malaria? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 106, 212-217.
- Walshe, D. P., Lehane, S. M., Lehane, M. J., Haines, L. R., 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*. 18:1, 11-19.
- Ward, E. S., Ellar, D. J., Chilcott, C. N., 1988. Single amino-acid changes in the *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. *Journal of Molecular Biology*. 202:3, 527-535.
- Weaver, S. C., Reisen, W. K., 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*. 85:2, 328-345.
- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., Kilian, A., 2004. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:26, 9915-9920.
- Wenzl, P., Li, H. B., Carling, J., Zhou, M. X., Raman, H., Paul, E., Hearnden, P., Maier, C., Xia, L., Caig, V., Ovesna, J., Cakir, M., Poulsen, D., Wang, J. P., Raman, R., *et al.*, 2006. A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics*. 7:206.
- Wickson, F., 2010. Mosquitoes: just how much biodiversity does humanity need? *Nature*. 466:7310, 1041-1041.
- Williamson, M. S., Anstead, J. A., Devine, G. J., Devonshire, A. L., Field, L. M., Foster, S. P., Moores, G. D., Denholm, I., Bcpc, Insecticide resistance: from science to practice. Bcpc International Congress Crop Science & Technology 2003, Vol 1 and 2, Congress Proceedings, 2003, pp. 681-688.
- Wirth, M. C., Federici, B. A., Walton, W. E., 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3, 1093-1097.
- Wirth, M. C., Jiannino, J. A., Federici, B. A., Walton, W. E., 2004. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 41:5, 935-941.
- Wirth, M. C., Park, H. W., Walton, W. E., Federici, B. A., 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1, 185-189.
- Wirth, M. C., Walton, W. E., Federici, B. A., 2010a. Evolution of resistance to the *Bacillus sphaericus* Bin toxin is phenotypically masked by combination with the mosquitocidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*. *Environmental Microbiology*. 12:5, 1154-1160.
- Wirth, M. C., Walton, W. E., Federici, B. A., 2010b. Inheritance Patterns, Dominance, Stability, and Allelism of Insecticide Resistance and Cross-Resistance in Two Colonies of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Selected With Cry Toxins From *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Medical Entomology*. 47:5, 814-822.
- Wood, O. R., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*. 3.
- Wright, S. I., Gaut, B. S., 2005. Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants. *Molecular Biology and Evolution*. 22:3, 506-519.
- Xu, G., Qin, J. D., 1994. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heliothis-armigera* and *H-assulta* (Lepidoptera, noctuidae) and their inhibition by tannic-acid. *Journal of Economic Entomology*. 87:2, 334-338.
- Xu, X. J., Yu, L. Y., Wu, Y. D., 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:2, 948-954.

- Yamagiwa, M., Kamauchi, S., Okegawa, T., Esaki, M., Otake, K., Amachi, T., Komano, T., Sakai, H., 2001. Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical microvilli of larval midgut of *Culex pipiens*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 65:11, 2419-2427.
- Yamagiwa, M., Ogawa, R., Yasuda, K., Natsuyama, H., Sen, K., Sakai, H., 2002. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66:3, 516-522.
- Yang, Y. J., Chen, H. Y., Wu, Y. D., Yang, Y. H., Wu, S. W., 2007. Mutated cadherin Alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:21, 6939-6944.
- Yang, Y. L., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Leonard, B. R., Abel, C., Luttrell, R., Huang, F. N., 2011. Down Regulation of a Gene for Cadherin, but Not Alkaline Phosphatase, Associated with Cry1Ab Resistance in the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis*. *PLoS ONE*. 6:10, e25783.
- Yuan, C., Ding, X. Z., Xia, L. Q., Yin, J., Huang, S. Y., Huang, F., 2011. Proteomic analysis of BBMV in *Helicoverpa armigera* midgut with and without Cry1Ac toxin treatment. *Biocontrol Science and Technology*. 21:2, 139-151.
- Yuan, Z. M., Zhang, Y. M., Cai, Q. X., Liu, E. Y., 2000. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. *Biocontrol Science and Technology*. 10:1, 41-49.
- Zeng, R. S., Wen, Z., Niu, G., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R., 2009. Enhanced Toxicity and Induction of Cytochrome P450s Suggest a Cost of "Eavesdropping" in a Multitrophic Interaction. *Journal of Chemical Ecology*. 35:5, 526-532.
- Zhang, R., Hua, G., Andacht, T. M., Adang, M. J., 2008. A 106-kDa Aminopeptidase Is a Putative Receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba Toxin in the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry*. 47:43, 11263-11272.
- Zhang, S. P., Cheng, H. M., Gao, Y. L., Wang, G. R., Liang, G. M., Wu, K. M., 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39:7, 421-429.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L., Bulla, L. A., 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R-1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*. 12:11, 1407-1416.
- Zhang, X., Zhang, J., Zhu, K. Y., 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*. 19:5, 683-693.
- Zhang, X. B., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., Bulla, L. A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:26, 9897-9902.
- Zhao, J. Z., Collins, H. L., Shelton, A. M., 2010. Testing insecticide resistance management strategies: mosaic versus rotations. *Pest Management Science*. 66:10, 1101-1105.
- Zhou, X. Y., Huang, Q. Y., Chen, S. W., Yu, Z. N., 2005. Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil. *Applied Clay Science*. 30:2, 87-93.
- Zhu, J. S., Chen, L., Raikhel, A. S., 2007. Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, Vitellogenin, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 267:1-2, 97-105.
- Zhu, Y.-C., Kramer, K. J., Oppert, B., Dowdy, A. K., 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30:3, 215-224.
- Zhuang, M. B., Oltean, D. I., Gomez, I., Pullikuth, A. K., Soberon, M., Bravo, A., Gill, S. S., 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the

midgut epithelium and subsequent pore formation. *Journal of Biological Chemistry*. 277:16, 13863-13872.



## Liste des publications scientifiques

- I. Bonin, A., Paris, M., Després, L., **Tétreau, G.**, David, J. P., Kilian, A., 2008. A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection. *BMC Genomics*. 9:459.  
**Contribution** : *J'ai participé à l'analyse des séquences.*
- II. Bonin, A., Paris, M., **Tétreau, G.**, David, J. P., Després, L., 2009. Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations. *BMC Genomics*. 10:551.  
**Contribution** : *J'ai remplacé les marqueurs DArT sur le génome d'Aedes aegypti et recherché les gènes candidats à proximité. J'ai séquencé les deux gènes (cadhérine et leucine-aminopeptidase), recherché les SNPs et de potentielles mutations diagnostiques et réalisé les tests de neutralité. J'ai également mesuré leur niveau d'expression par RT-qPCR. J'ai participé à la rédaction de l'article.*
- III. Paris, M., **Tétreau, G.**, Laurent, F., Lelu, M., Després, L., David, J.-P., 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Management Science*. 67, 122-128.  
**Contribution** : *J'ai produit les toxines séparées du Bti, participé aux expérimentations, à l'analyse des données ainsi qu'à leur discussion.*
- IV. Paris, M., Melodelima, C., Coissac, E., **Tétreau, G.**, Reynaud, S., David, J. P., Després, L., 2012. Transcription profiling of resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109:2, 201-208.  
**Contribution** : *J'ai participé à l'analyse et à la discussion des résultats.*
- V. **Tétreau, G.**, Bayyareddy, K., Jones, C. M., Stalinski, R., Riaz, M. A., Paris, M., David, J. P., Adang, M. J., Després, L., 2012. Larval Midgut Modifications Associated with *Bti* Resistance in the Yellow Fever Mosquito using Proteomic and Transcriptomic Approaches. *BMC Genomics*. 13:248.  
**Contribution** : *Je suis à l'origine de la collaboration avec le laboratoire de Michael Adang et ai réalisé l'analyse protéomique sur le premier réplicat biologique (extraction d'intestins et DIGE). J'ai également réalisé la préparation des ARNs pour les microarrays. J'ai réalisé les validations de gènes en RT-qPCR. J'ai supervisé les mesures d'activité enzymatique. J'ai rédigé l'article.*
- VI. **Tétreau, G.**, Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J. P., Reynaud, S., Després, L., 2012. Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:15. (sous presse)  
**Contribution** : *J'ai conçu le plan expérimental, réalisé les extractions et les tests ELISA ainsi que les bioessais. J'ai rédigé l'article.*

**VII. Tétreau, G.,** Stalinski, R., David, J. P., Després, L. Larval gut proteolytic activity and *Bti* resistance in the dengue fever mosquito. *Soumis à Journal of Invertebrate Pathology.*

**Contribution :** *J'ai supervisé et participé aux expérimentations. J'ai rédigé l'article.*

# Article I

---

**A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection.**

BONIN, A., PARIS, M., DESPRES, L., TETREAU, G., DAVID, J. P., KILIAN, A.

*BMC Genomics*. 9:459 (2008)



Methodology article

Open Access

## A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection

Aurélie Bonin\*<sup>1,2</sup>, Margot Paris<sup>1</sup>, Laurence Després<sup>1</sup>, Guillaume Tetreau<sup>1</sup>, Jean-Philippe David<sup>1</sup> and Andrzej Kilian<sup>2</sup>

Address: <sup>1</sup>Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France and <sup>2</sup>Diversity Arrays Technology P/L, PO Box 7141, Yarralumla, ACT 2600, Australia

Email: Aurélie Bonin\* - abonin@indiana.edu; Margot Paris - margot.paris@e.ujf-grenoble.fr; Laurence Després - laurence.despres@ujf-grenoble.fr; Guillaume Tetreau - guillaume.tetreau@e.ujf-grenoble.fr; Jean-Philippe David - jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr; Andrzej Kilian - a.kilian@diversityarrays.com

\* Corresponding author

Published: 6 October 2008

Received: 25 July 2008

BMC Genomics 2008, 9:459 doi:10.1186/1471-2164-9-459

Accepted: 6 October 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/459>

© 2008 Bonin et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** For most organisms, developing hundreds of genetic markers spanning the whole genome still requires excessive if not unrealistic efforts. In this context, there is an obvious need for methodologies allowing the low-cost, fast and high-throughput genotyping of virtually any species, such as the Diversity Arrays Technology (DArT). One of the crucial steps of the DArT technique is the genome complexity reduction, which allows obtaining a genomic representation characteristic of the studied DNA sample and necessary for subsequent genotyping. In this article, using the mosquito *Aedes aegypti* as a study model, we describe a new genome complexity reduction method taking advantage of the abundance of miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) in the genome of this species.

**Results:** *Ae. aegypti* genomic representations were produced following a two-step procedure: (1) restriction digestion of the genomic DNA and simultaneous ligation of a specific adaptor to compatible ends, and (2) amplification of restriction fragments containing a particular MITE element called *Pony* using two primers, one annealing to the adaptor sequence and one annealing to a conserved sequence motif of the *Pony* element. Using this protocol, we constructed a library comprising more than 6,000 DArT clones, of which at least 5.70% were highly reliable polymorphic markers for two closely related mosquito strains separated by only a few generations of artificial selection. Within this dataset, linkage disequilibrium was low, and marker redundancy was evaluated at 2.86% only. Most of the detected genetic variability was observed between the two studied mosquito strains, but individuals of the same strain could still be clearly distinguished.

**Conclusion:** The new complexity reduction method was particularly efficient to reveal genetic polymorphisms in *Ae. aegypti*. Overall, our results testify of the flexibility of the DArT genotyping technique and open new prospects as regards its application to a wider range of species, including animals which have been refractory to it so far. DArT has also a role to play in the current burst of whole-genome scans carried out in various organisms, which track signatures of selection in order to unravel the basis of genetic adaptation.

## Background

Since the early sixties and the first protein gels to assess genetic diversity in human and *Drosophila*, genotyping methods have gone a very long way. Researchers working on model organisms have now at their disposal a repertoire of different molecular markers to help answer various biological questions [1]. For such species, the recent advances in genotyping throughputs and data management allow to simultaneously examine many loci in the genome of many individuals, leading the way to the genomic era [2]. However, as regards non-model species, the picture is not so bright. For most organisms indeed, whole genome surveys are often hampered by a shortage of genomic sequences and/or a lack of interspecific transferability of known molecular markers such as microsatellites or single nucleotide polymorphisms (SNPs) [3,4]. In this context, there is an obvious need for new methodologies allowing the low-cost, fast and high-throughput genotyping of virtually any species.

The Diversity Arrays Technology (DArT) has the potential to fill in this gap [5]. This innovative genotyping method can provide from hundreds to tens of thousands of highly reliable markers for any species in theory, as it does not require any precise information about the genome sequence [5,6]. Moreover, DArT was recently shown to provide good genome coverage in wheat and barley [6,7]. The keystone of the DArT protocol is a step called "genome complexity reduction". This step aims at providing a genomic representation of the studied DNA sample, by extracting informative loci while avoiding repetitive sequences that usually plague eukaryote genomes. This is generally achieved by methylation sensitive restriction enzyme digestion, adaptor ligation and subsequent PCR amplification [6]. The number of markers DArT detects is determined primarily by the level of DNA sequence variation in the material subjected to analysis and by the complexity reduction method deployed [8]. In many cultivated species in which selection through traditional and modern breeding reduced genetic diversity, DArT usually generates several hundreds highly reproducible markers in a single assay in a single biparental cross [6]. Another noteworthy property of DArT markers is that their sequence is easily accessible. This distinguishes them from other random markers such as amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and offers interesting perspectives in functional genomics. Overall, these characteristics make DArT a method of choice for non-model species [9] when it comes to assess genetic variation at the genome scale, to construct quantitative trait loci (QTL) or linkage maps, or to conduct genomic scans in order to track loci under selection in the genome.

The DArT technique was applied for the first time to the rice genome [5]. Thereafter, it has met an increasing suc-

cess and was developed for a wide range of crop and plant species [6,9-11] and was even used to identify soil microorganisms [12]. However, despite an initial proof-of-concept work on mouse (Jaccoud, pers. comm.), attempts to develop DArTs for animals have been strongly delayed so far. This can be explained by differences in genome organization between plants and animals, demanding significant changes in the complexity reduction step.

This study has been motivated by research on the genetic basis of insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*, the primary vector species for the yellow fever and dengue viruses [13]. In particular, we were interested in characterizing genes linked to resistance to *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*), a soil bacterium producing insecticidal crystal proteins which are widely used for controlling *Aedes* mosquito larvae [14]. In order to identify these genes, we chose to adopt a population genomics approach, i.e. to screen the genome of *Ae. aegypti* to detect loci showing a signature of selection by *Bti*. A prerequisite was thus to obtain many (several hundreds) random markers that could be surveyed at low cost and effort, and the DArT technology appeared as an appealing option for this purpose given the current shortage of SNPs markers isolated in *Ae. aegypti*.

In this article, we present a modification of the complexity reduction step of the DArT protocol taking advantage of the abundance of transposable elements (TEs) in many eukaryote genomes. Indeed, most TEs have conserved sequence motifs which can serve as specific anchors for the primers used to amplify fragments from the DArT genomic representation. Here, we implement the DArT technique for *Aedes aegypti* by targeting a TE called *Pony*, which belongs to the miniature inverted repeat transposable element (MITE) family of TEs and can be found in many copies in the genome of *Ae. aegypti* [15]. We show that this method is powerful enough to detect DNA polymorphisms even between populations separated by only a few generations of artificial selection. Beyond these promising results, this example testifies of the flexibility of the DArT technology and opens new prospects as regards its application to a wider range of species, including animals which have been refractory to it so far.

## Results

### **Principle of the new complexity reduction method implemented**

The DArT technique is based on the analysis of "genomic representations", which are simplified surrogates of the DNA samples of interest. Concretely, a genomic representation is a set of DNA fragments of various sizes and sequences which are characteristic of the studied sample and obtained through highly reproducible (and preferentially technically simple) methods. These methods are

usually based on restriction digestion: genomic DNA is digested using one or several restriction enzymes, with simultaneous ligation of appropriate adaptors to the restriction fragments and subsequent amplification of fragments by PCR using the adapter and the restriction site as targets for primer annealing [6]. A suitable genomic representation typically includes 5,000–20,000 amplified fragments, i.e. a number low enough to ensure the reproducibility of the PCR reaction, but high enough to yield a reasonable number of polymorphic markers. Fragment sizes are ideally evenly distributed in a 100–1000 bp range, and representations showing distinct bands on agarose gel are avoided because these are presumably derived from repetitive genomic sequences and/or mitochondrial or chloroplast DNA.

In *Ae. aegypti*, several restriction enzyme combinations were tested (Additional file 1), but all of them gave genomic representations unfavourable to the application of the traditional DArT protocol, with clear repetitive bands and/or an unsuitable range size for the fragments (See Additional file 2 for an example of poor-quality genomic representations). On the basis of these results, a different strategy was thus adopted. The underlying idea was to exploit any kind of motifs occurring frequently in the genome as a second anchor during the PCR reaction,

in addition to the adaptor-ligated restriction site. By adjusting PCR conditions, it was possible to preferably amplify fragments with the restriction site on one extremity and the chosen motif on the other one, so that the genomic representations to be obtained were expected to be a mixture of such fragments. Because of their abundance in eukaryote genomes, TEs were good candidates for such a purpose. We selected a particular MITE family named *Pony* to perform the role of second anchor in the *Ae. aegypti* genome (Figure 1). *Pony* TEs have all the characteristics of MITEs, including terminal inverted repeats, A+T richness and a small size [15]. Two highly divergent subfamilies, *Pony-A* and *Pony-B*, can be distinguished and occur in about 8,400 and 9,900 copies in *Ae. aegypti* genome, respectively [15]. We designed a primer targeting any *Pony* sequence present in the genome (*PonyAll* primer; Table 1), as well as one specific to the *Pony-B* subfamily (*PonyB* primer; Table 1).

**Evaluation of the MITE display approach for DArT genotyping**

A library comprising 6144 DArT clones was constructed using the approach described in Figure 1 (see *Methods* for details). Hybridizations were performed for 58 *Aedes aegypti* individuals with two, three and four replicated representations independently hybridized for 25, 4 and 29

**Table 1: Adaptor and primer sequences used for preparation of genomic representations and library construction**

	Adaptors (5'-3')	Primers (5'-3')
<b>BspI 286I restriction site</b>		
<i>Preparation of genomic representations for genotyping</i>	<p><i>BspI 286I adaptors I</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Forward strand: equimolar mix of CATAGGTGCCACAGTCGGTCTGCA CATAGGTGCCACAGTCGGTCTGCT CATAGGTGCCACAGTCGGTCTGC C</li> <li>• Reverse strand GACCGACTGTGGAC</li> </ul>	<p><i>BspI 286I primer I</i></p> <p>AGGTGCCACAGTCGGTCT</p>
<i>Library construction</i>	<p><i>BspI 286I adaptors II</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Forward strand: equimolar mix of CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTGC A CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTGC C CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTGCT</li> <li>• Reverse strand GACCGTTCTGGCA</li> </ul>	<p><i>BspI 286I primer II</i></p> <p>CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTC</p>
<b>Pony sequence</b>	-	<p><b>1536-clone preliminary library construction</b></p> <p><i>PonyAll primer</i> CGNAATNTGARYCAAAACGGTA</p> <p><b>4608-clone expanded library construction and preparation of genomic representations for genotyping</b></p> <p><i>PonyB primer</i> GGANGCGTATTCTTYACCCAC</p>

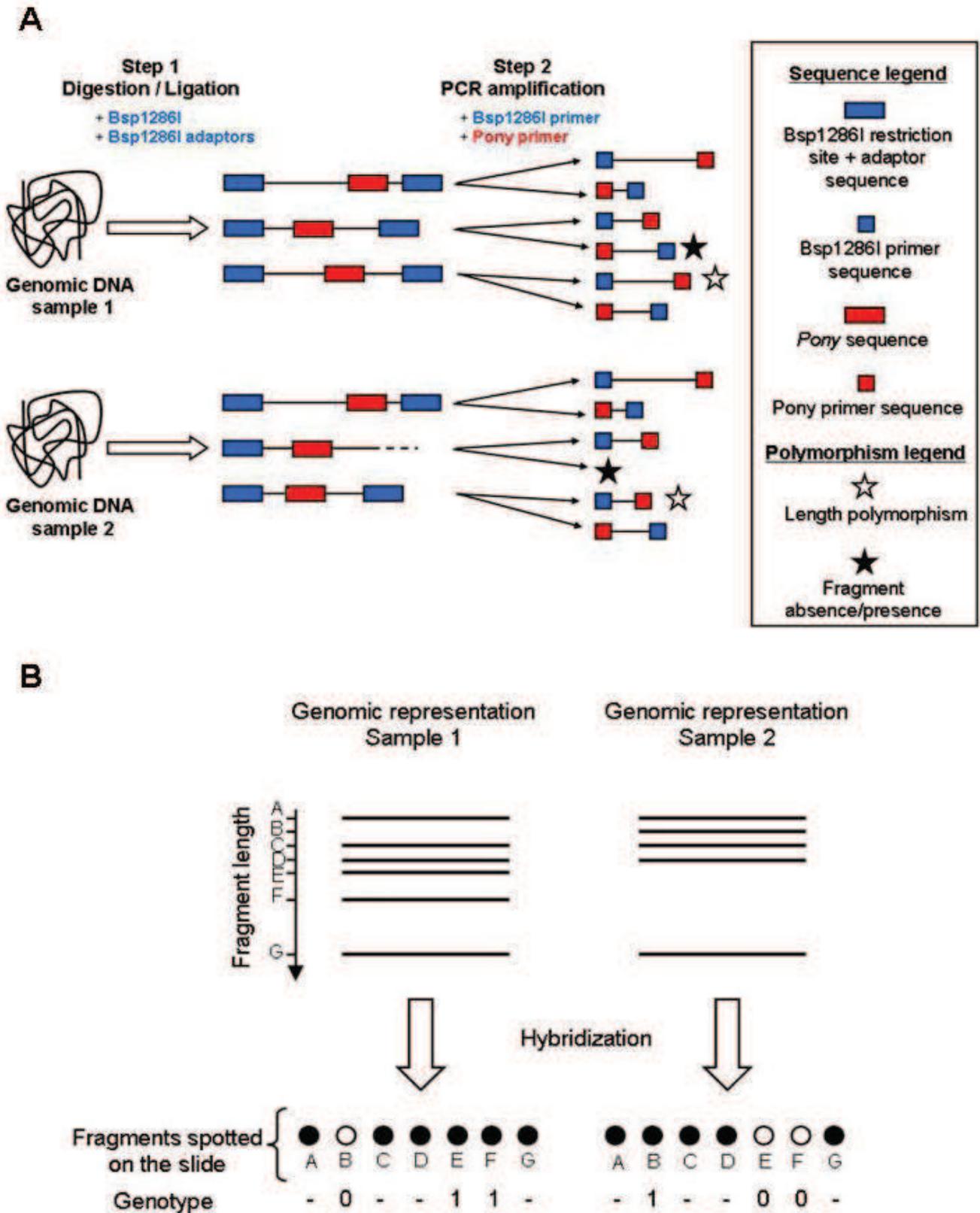


Figure 1 (see legend on next page)

**Figure 1** (see previous page)

**Schematic illustration of the DArT protocol.** (A) Principle of the MITE-based genome complexity reduction method. Genomic DNA is digested by restriction enzyme BspI286I, and BspI286I adaptors are ligated to the generated overhangs. Then two rounds of PCR amplifications are performed using two primers: one annealing to BspI286I adaptors (BspI286I primer), and one complementary to a conserved sequence motif of the *Pony* element. For the most part, the resulting genomic representations include fragments with the BspI286I restriction site on one extremity and the *Pony* motif on the other one, because the PCR conditions are adjusted to preferably amplify this particular type of fragments. (B) Principle of the polymorphism detection on DArT microarrays. Genomic representations of each sample are hybridized against a library containing all fragments spotted on a slide. When a fragment is missing in one representation, it will not hybridize to the corresponding fragment on the slide. In this example, monomorphic fragments present in both representations are scored as '-' while polymorphic fragments present or absent in one representation are scored as '1' or '0', respectively.

individuals, respectively. These *Ae. aegypti* individuals belonged either to the Bora-Bora strain (29 individuals), susceptible to all insecticides, or to a strain artificially selected for several generations to develop resistance to the insecticidal *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) toxins (29 individuals; see *Methods*).

The polymorphism analysis was performed on the obtained images focusing on three parameters which are central for the data quality: (1) the Call Rate, which corresponds to the percentage of successfully scored replicates for a given marker; (2) the *P* value, which measures the fraction of the total variation across all individuals due to bimodality (i.e. polymorphism) for a particular marker; and (3) the discordance, which measures the overall variation of scores within replicates and is thus an indication of the marker reproducibility. First, the most unreliable markers (discordance > 5%) were discarded from the analysis. The remaining markers were then sorted out by decreasing *P* values and grouped in bins with an increment of 50 markers between two successive bins. As shown in Figure 2A, the average discordance increased as the average *P* value of a marker group increased (Pearson correlation coefficient = -0.996,  $p < 0.01$ ). There was also a quasi-linear relationship between the decrease in average *P* and the decrease in Call Rate (Pearson correlation coefficient = 0.999,  $p < 0.01$ ; Figure 2B). Overall, the top 350 markers ( $P = 80.06\%$ ) showed a satisfactory Call Rate (88.90%) while displaying an acceptable level of discordance (1.48%). They met the standard quality thresholds usually applied to DArT data, giving a polymorphism rate of about 5.7% in the whole mosquito dataset.

**Working dataset and marker redundancy**

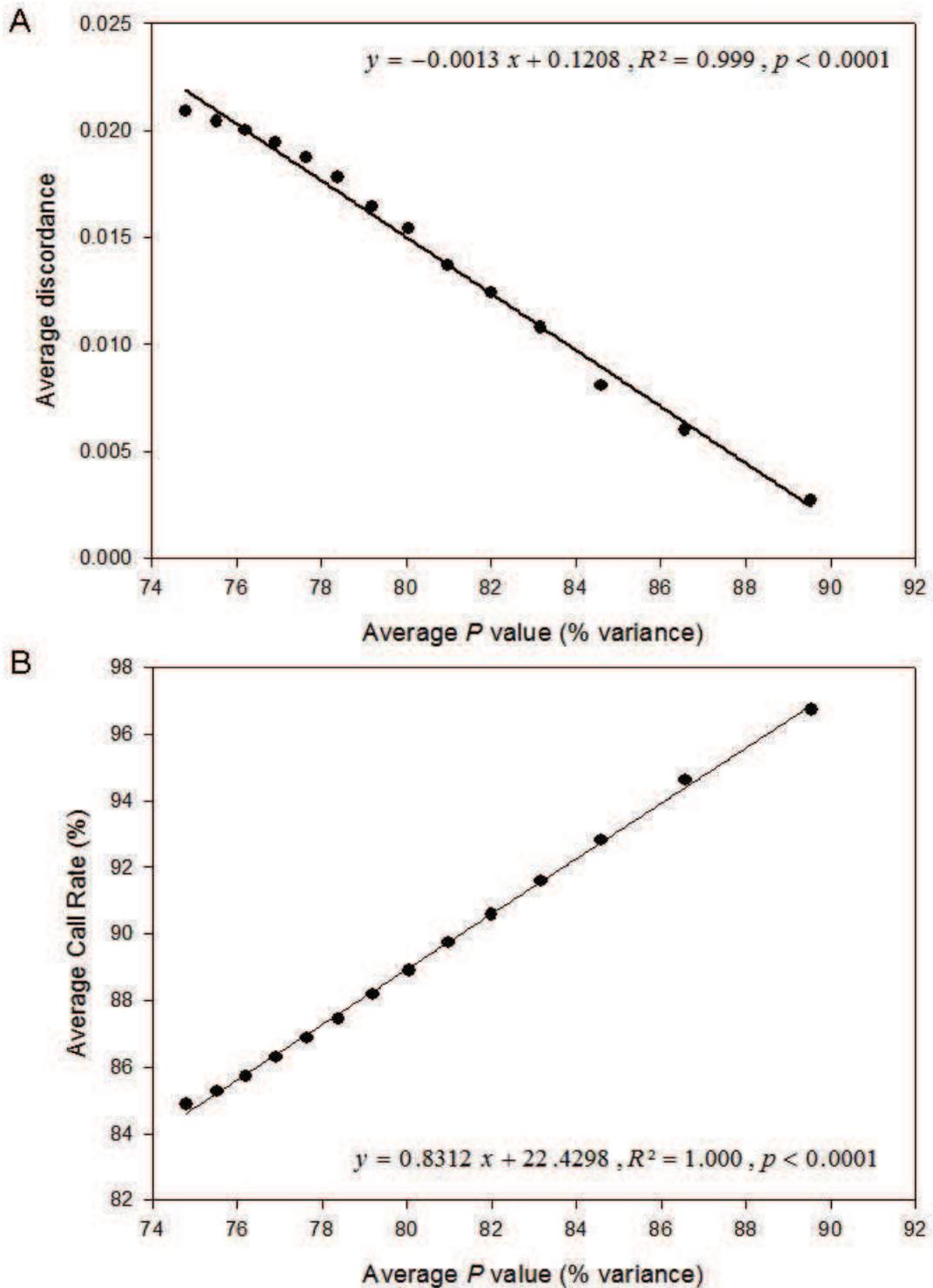
The primary goal of this study was to characterize loci potentially responsible for resistance to *Bti*. For this purpose, population genomics was adopted to reveal loci displaying apparent selection footprints, such as an atypical pattern of genetic variability compared to the rest of the genome. To implement this approach, a robust estimation of the overall genetic diversity throughout the genome first had to be obtained. This was achieved by slightly

relaxing the quality parameters to include more markers in our analyses and allow a more comprehensive sampling of the genome. A polymorphism analysis was thus performed with a minimum Call Rate, minimum *P* value, and maximum discordance set at 81%, 71%, and 5%, respectively. It identified a set of 476 markers (polymorphism rate = 7.75%) with a mean Call Rate, *P* value, and discordance of 87.72 %, 78.34 %, and 1.93%, respectively.

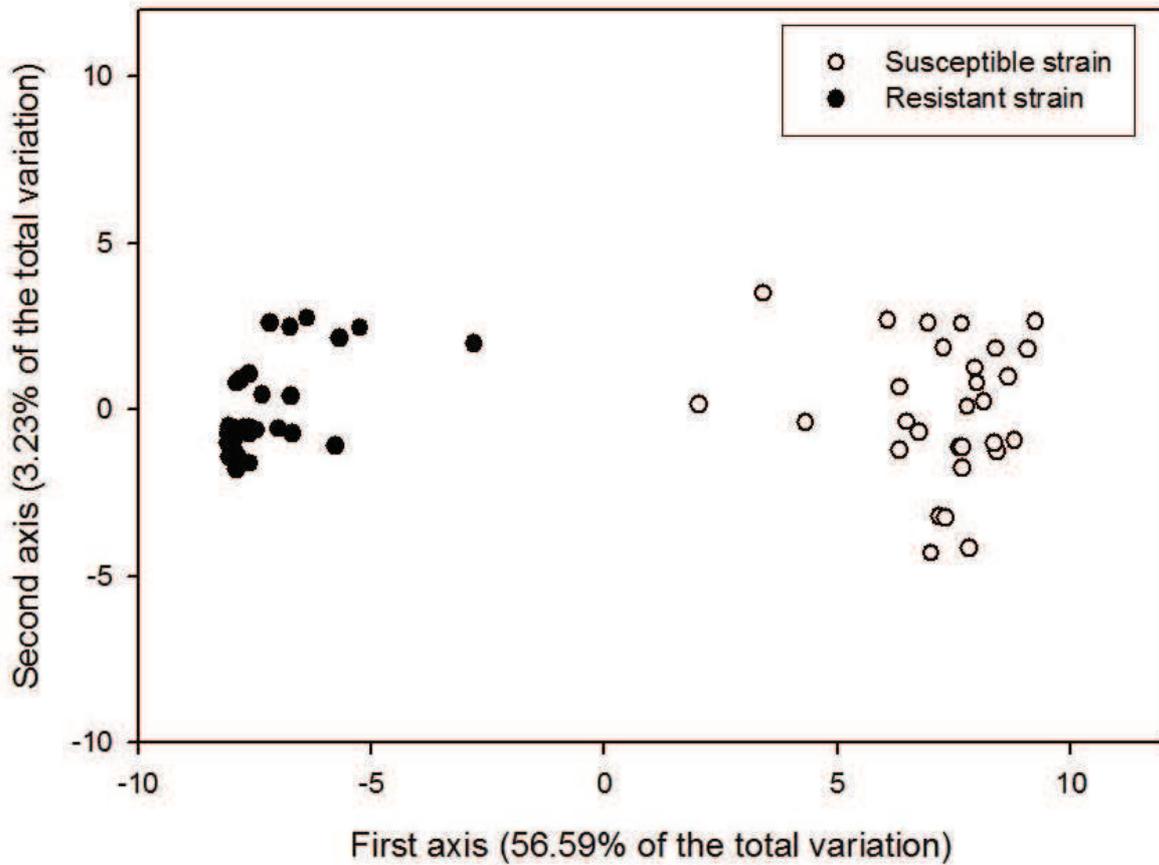
In this working dataset comprising 476 markers, linkage disequilibrium was low with only 0.72% and 1.90% of pairwise linkage indices > 0.95 and < 0.05, respectively. Furthermore, a subset of 70 markers involved in 76.92% of the marker pairs showing high linkage disequilibrium was sequenced. Only two of them (2.86%) turned out to be redundant, with one pair of markers differing by a gap and the second one by a mutation (similarity > 98.5% in BioEdit). After trimming the *Pony* motif, the 68 unique marker sequences (GenBank accession no. [FJ231034-FJ231090](#); sequences shorter than 50 bp could not be deposited) were blasted against the *Ae. aegypti* genome. In total, 41 of them could be assigned without ambiguity to single genomic positions distributed on 40 different supercontigs. The two markers situated on the same supercontig were separated by more than 215 kb.

**Assessment of genetic diversity between and within mosquito strains**

The working dataset was used to assess the genetic diversity observed between and within the two studied mosquito strains. As revealed by an analysis of molecular variance (AMOVA), most of the genetic variation was distributed between the resistant and the susceptible strains (69.6 %, versus 30.4 % within strains;  $p < 0.0001$  in both cases), corroborating the high genetic differentiation observed between the two strains ( $F_{st} = 0.556$ ). Likewise, in a principal coordinate analysis (PCO), the first axis unmistakably separated the two strains and explained 56.59 % of the variation (Figure 3). However, when the PCO analysis was carried out on each strain independently, enough genetic diversity seemed to be retained



**Figure 2**  
**Relationships between different quality parameters in the MITE library.** After discarding the most unreliable markers (discordance > 5%), remaining markers were sorted out by decreasing P values and grouped in bins with an increment of 50 markers between two successive bins. Within-group average P was plotted against within-group average discordance (**A**) and within-group average Call Rate (**B**).



**Figure 3**  
**Principal coordinate analysis.** A principal coordinate analysis (PCO) was carried out with the working dataset (476 DArT markers), and for each *Aedes aegypti* individual, the coordinate obtained for the first axis of the PCO was plotted against that obtained for the second axis.

within each strain to clearly differentiate individuals (data not shown), with the first two axes explaining 20.48 % and 26.72 % of the variation for the susceptible strain and the resistant strain, respectively.

Assessment of genetic diversity within strains allowed to complete this picture and revealed a strong difference

between the two strains (Table 2). All the diversity indices calculated (Shannon index of phenotypic diversity *S*, mean Jaccard pair-wise coefficient, Nei's gene diversity and proportion of polymorphic markers at the 5% level, see *Methods* for more details) give evidence of a high level of genetic diversity within the susceptible strain, whereas

**Table 2: Indices of genetic diversity within each mosquito strain**

Diversity index	Susceptible strain	Resistant strain
Mean pairwise Jaccard coefficient (minimum – maximum)	0.350 (0.196 – 0.643)	0.331 (0.110 – 0.590)
Shannon index of phenotypic diversity <i>S</i>	0.451	0.275
Nei's gene diversity	0.341	0.207
Percentage of polymorphic markers at the 5% level	94.1	58.6

these indices were substantially lower for the resistant strain, except the mean pairwise Jaccard coefficient.

## Discussion

In this article, we report a substantial refinement to the DArT genotyping technique which allowed its implementation for the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. More specifically, the genome complexity reduction step was achieved thanks to a MITE-display procedure which utilizes the *Ae. aegypti* *Pony* element [15] as an additional primer anchor. After restriction digestion of genomic DNA and ligation of specific adaptor to compatible ends, *Pony*-containing fragments were amplified using two primers, one annealing to the adaptor sequence and the other to a conserved sequence motif of the *Pony* element (Figure 1).

In the 6144-clone library we generated, the relationships observed between the quality parameters (Call Rate, *P* value and discordance) for the best markers were consistent with those reported in other species, for example wheat (see Figure 1 in [7]). It has to be noted that the mean discordance, although acceptable, is 3–5 times higher than that usually published in plants [6,7,11]. Genomic representations generated with the MITE procedure are potentially more complex, and there is also a competition for amplification between three types of fragments (i.e., "Restriction enzyme-Restriction enzyme" fragments, "Restriction enzyme-*Pony*" fragments, and "*Pony-Pony*" fragments). Both of these factors may contribute to increase the mean discordance in the MITE procedure compared to the traditional DArT protocol. In any case, the discordance parameter can be viewed as a genotyping error rate, and the value reported here (1.48%) is excellent in comparison to those typically obtained with other marker systems [16]. This high reproducibility of the DArT technique is mainly due to the routine practice of systematically genotyping samples at least twice, in order to discard unreliable markers as soon as the scoring step. Another reason of this high data quality is the computerized scoring of DArT markers, which transforms detected fluorescence intensities into presence/absence of a given fragment and limits scoring subjectivity.

Our MITE approach was successful to reveal a substantial number of DNA polymorphisms in the two closely related laboratory strains of *Ae. aegypti* studied here, with 5.70 % of highly reliable polymorphic markers in the library. This polymorphism rate is slightly lower than that obtained in other species where the MITE procedure has also been tested, probably because of an inherent lower diversity in the laboratory material studied here. In the sugarcane genome, for example, 9.78 % of the cloned fragments turned out to be polymorphic with similar average quality parameters (Heller-Uszynska *et al.*, submitted).

Our working dataset, containing 476 polymorphic DArT markers selected with less stringent quality parameters, helped highlight substantial genetic differences between the two mosquito strains, with an observed *Fst* value reaching 0.556. Although the two strains diverged only 18 generations ago, this high level of genetic differentiation was not surprising in the light of the intensity of selection (80%) applied to the selected strain at each generation. In addition to this strong inter-strain genetic structure, the DArT dataset was also able to reveal high genetic diversity within both strains. Linkage analyses combined with marker sequencing also suggested that most of the markers were unique and scattered in the genome, and thus that our results could not be overly inflated by redundant or physically linked markers. In short, DArT markers appear to be discriminatory at both the intra- and inter-population levels, and have therefore the potential to become valuable tools in population genomics, even if they have not been used in this purpose so far.

As exemplified by our study and others in molecular genotyping [17,18], TEs can be wonderful devices to help identify DNA polymorphisms. They are not only omnipresent in most genomes, but also tightly associated with various types of genetic variability, from changes in genome size and arrangement to single nucleotide mutations [19]. MITEs are particularly fascinating in this respect. The mode of transposition of most MITE families discovered so far has long remained mysterious [20,21]. They lack an active transposase, but according to recent studies, they seem to originate from ancestral autonomous TEs and to depend on transposases encoded by related autonomous TEs for contemporary transposition events [21,22]. Incidentally, there are hints indicating that stress may be a triggering factor in contemporary transposition events of MITEs [20]. In our case, one can speculate that the stress represented by insecticide selection could have played a role in shaping the strong genetic structure between the two strains. Moreover, despite their apparently deficient transposition capability, MITEs are usually present in high copy numbers in many eukaryote genomes. For example, the *Tourist* MITE superfamily represents alone more than 3 % of the rice genome [23], and between 10<sup>3</sup> and 10<sup>4</sup> copies of the *Angel* element can be found in the zebrafish genome [24]. MITEs also generally display well conserved motifs, which is particularly convenient for primer design [22]. Last but not least, they tend to insert in or near transcriptionally active genomic regions [20,21]. This particularity offers exciting prospects in studies of phenotypic traits of economical interest, or in genomic surveys tracking genes under selection. Interestingly, transposable elements often initiate the rapid evolution of insect resistance to insecticides, including resistance to *Bt* toxins [25,26]. In *Ae. aegypti*, DArT markers with atypically high genetic differentiation between

the susceptible and resistant strains might thus be linked to genes involved in resistance to *Bti* toxins. Some of these markers have already been sequenced and at least two promising candidate genes have been identified in their vicinity (Paris, pers. comm.).

### Conclusion

The MITE approach described here (Figure 1) allowed obtaining the first DArT dataset ever published for an animal genome, although it has to be noted that the DArT method had previously been successfully developed for the mice genome (Jaccoud, pers. comm.). This example in *Ae. aegypti* testifies of the flexibility of the DArT genotyping technique, which can accommodate a wide range of other strategies for genome complexity reduction. Its quasi-universal applicability, the fact that limited genome information is necessary to its development, the possibility to obtain markers near coding regions and the possibility to rapidly sequence markers of interest are some of the features that can make DArT a serious competitor to other markers such as SNPs in non-model organisms [9]. In particular, DArT has a role to play in the current burst of whole-genome scans tracking signatures of selection in order to unravel the genetic basis of adaptation [2,27].

### Methods

#### Biological material used and selection of the resistant strain

Two laboratory strains of *Ae. aegypti* were used as biological material in this study: the standard Bora-Bora strain, susceptible to all insecticides, and a strain artificially selected for several generations to develop resistance to a decomposed tree leaf litter showing a high toxicity when ingested by mosquito larvae. This toxic litter was proved to contain *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) bacteria strains from commercial origin [28]. *Bti* bacterium produces insecticidal toxins which are widely used for mosquito control, and the toxic litter was collected in a mosquito pond in Eastern France three months after treatment with commercial *Bti* insecticide (Bactimos, Valent Biosciences Corporation). This experimental design allowed us to study resistance mechanisms to *Bti* toxins in a situation close to field conditions.

Selection of the toxic leaf litter resistant strain was performed on early fourth-instar larvae of the Bora-Bora strain. At each generation, groups of 200 calibrated larvae were exposed to 30 mg of finely ground toxic leaf litter in 200 ml of tap water. Selection was carried out repeatedly for 18 generations, with an average of 2000 larvae being exposed to toxic litter per generation. At each generation, the experiment was stopped when mortality reached 80% in order to obtain a minimum of 300 adults for the next generation. The survivors were transferred to clean water, fed with hay pellets, and allowed to emerge as adults,

reproduce, blood feed and lay eggs for the next generation. The average generation turnover was 30 days.

To monitor the evolution of resistance to toxic leaf litter, bioassays were conducted at each generation in plastic cups containing 20 fourth-instar larvae in 50 ml of tap water and various doses of toxic leaf litter [29]. The lethal dose for 50% of individuals after 24 h exposure (24 h-LD<sub>50</sub>) was determined using the Probit software [30]. The resistance ratio (RR) of the selected strain was calculated by dividing the 24 h-LD<sub>50</sub> value of the selected strain with the value obtained for the susceptible strain. After 18 generations of selection, the RR of the resistant strain was 4-fold.

#### Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fourth-instar larvae using the Qiagen DNeasy Tissue Kit and protocol (Qiagen). To avoid bacterial contamination, the larvae midgut was removed carefully before DNA extraction.

#### Preparation of genomic representations

For each sample, digestion and ligation reactions were carried out simultaneously at 37°C for 3 hours on 50 ng of genomic DNA, using 2 units of restriction enzyme Bsp1286I (New England Biolabs, NEB), 80 units of T4 DNA ligase (NEB) and 0.05 μM Bsp1286I adaptors I (Table 1), in a buffer with final concentrations of 10 mM Tris-OAc, 50 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 5 mM DTT (pH 7.8), 1 mM ATP and 100 ng/ml Bovine Serum Albumin (NEB). The obtained ligated products served as template in a first round of PCR amplification. For this purpose, ligated products were diluted five times with sterile water and 2.5 μl of the diluted product were added to a 22.5-μl PCR reaction mix leading to final concentrations of 0.04 μM of Bsp1286I primers I (Table 1), 0.4 μM of PonyB primers (Table 1), 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP and 1 unit of RedTaq DNA Polymerase (Sigma). The amplification reaction was performed with the following conditions: 94°C for 1 min; 20 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 40 sec and 72°C for 1 min; followed by a final 7-min extension step at 72°C. The resulting PCR product was diluted 5 times with sterile water and 2.5 μl of the diluted product served as a template for a second round of amplification performed exactly as the first round except that the final volume was 50 μl, the final concentration of both primers and of each dNTP was 0.2 μM and 0.05 mM, respectively, and 2 units of RedTaq DNA polymerase were used.

#### Construction of the DArT library and printing of microarrays

A preliminary 1536-clone library was first constructed based on genomic representations prepared for 29 individuals of each strain. These representations were

obtained as described above, except the sequences of the adaptors and primers were slightly different (Bsp1286I adaptors II, Bsp1286I primer II and PonyAll primer; see Table 1), allowing the amplification from any type of *Pony* element (subfamily A or B). Representations were mixed according to the origin of the individuals to form a "susceptible pool" and a "resistant pool", and these pools were cloned separately in the PCR2.1 TOPO vector (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Individual clones were grown overnight in 384-well plates containing LB medium with 100 µg/ml ampicillin and 4.4 % glycerol. Small aliquots of the cultures were used as templates for insert amplification in a 25-µl reaction containing 0.2 µM of each M13 forward and M13 reverse primers (Invitrogen), 50 µM of each dNTP, 50 mM Tris, 6 mM HCl, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 units of Taq Polymerase. The cycling conditions were as follows: 95°C for 4 min, 57°C for 35s, 72°C for 1 min followed by 35 cycles of 94°C for 35s, 52°C for 35s and 72°C for 1 min and final 72°C for 7 min. After amplification, PCR products were dried, washed with 70% ethanol and resuspended in a spotting buffer developed for poly-L-lysine coated microarray slides (Wenzl *et al.*, in prep.). The final library contained 1536 clones, half of them originating from the "susceptible pool" and half of them from the "resistant pool", so that each pool of genetic diversity was equally represented.

The first genotyping experiments carried out with this preliminary library resulted in a low number of reliable polymorphic clones due to high levels of background noise in signal intensities (data not shown). One likely explanation was that the genomic representations hybridized against the library included too many fragments so that some of them were amplified stochastically during the two rounds of PCRs and/or did not hybridize specifically. To solve this problem, a second library was built, which was based on genomic representations with fewer fragments. It relied on the use of the PonyB primer designed to anneal only to the *Pony-B* sequences. Except for this different primer, the protocol was identical to that detailed above and lead to the production of a 4608-clone library. Clones from both libraries, i.e. 6144 in total, were printed in duplicates on poly-L-lysine-coated slides (Erie Scientific) using a *MicroGridII* arrayer (Biorobotics). Printed DNA spots were denatured and fixed on the surface of the slide by incubation in hot water (95°C) for 2 min, followed by dipping in 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA solution and drying by centrifugation at 500 × g for 7 min.

#### Individual genotyping using DArT microarrays

For each individual, at least two genomic representations were obtained independently as reported in the section "Preparation of genomic representations". Each representa-

tion was subsequently precipitated with one volume of isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in 3.5 µl of sterile water. After a 3-min denaturation at 95°C, the representation was fluorescently-labelled for 3 hours at 37°C with 250 units of Klenow exo- fragment of *E. coli* Polymerase I (NEB), 2.5 nmoles of either Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Amersham Bioscience) and 25 µM random decamers. A Cy3- and a Cy5-labelled samples (thereafter called targets) were combined one after the other to 60 µl of a hybridization buffer containing a 50:5:1 mixture of ExpressHyb (Clontech), herring sperm DNA (Promega), FAM-labelled polylinker of the PCR2.1 vector (Invitrogen) used for library preparation, and 2 mM EDTA (pH 8.0). This mix was denatured at 95°C for 3 min, deposited onto microarray slides and covered with a glass coverslip. Slides were incubated for 16 h in a humid chamber at 65°C. Following hybridization, coverslips were removed and slides were washed in 1 × SSC + 0.1% SDS for 5 min, 1 × SSC for 5 min, 0.2 × SSC for 2 min, and 0.02 × SSC for 30 sec, before being dried by centrifugation at 500 g for 7 min.

#### Microarray scanning and data acquisition

A Tecan LS300 confocal laser scanner was used to scan the hybridized slides and generate three different TIF images per slide, one per type of hybridized dye (Cy3, Cy5 and FAM). Image and polymorphism analyses were performed with *DArTSoft* version 7.4.3, a software especially developed for this purpose by *Diversity Arrays Technology Pty. Ltd.* (Cayla *et al.*, in prep.). Briefly, *DArTSoft* automatically localizes the arrayed spots on the images using a seeded-region-growth algorithm, rejects those with a weak reference signal, computes and normalizes background-subtracted relative hybridization intensities [e.g. log(cy3-target/FAM-reference)], and calculates the median value for replicate spots. Then, polymorphic clones are identified by means of a combination of ANOVA and fuzzy K-means clustering at a fuzziness level of 1.5 before being assigned as 'present' or 'absent' in each representation hybridized to the array.

#### Linkage disequilibrium between markers and clone sequencing

Independence and uniqueness of DArT markers were evaluated by calculating the linkage index  $I_{k,l}$  for each possible pair of markers  $k$  and  $l$ , according to the following formula:

$$I_{k,l} = \frac{1}{n} \sum |m_{ki} - m_{li}|$$

where  $n$  is the number of individuals,  $m_{ki}$  the score (0/1) of individual  $i$  at marker  $k$ , and  $m_{li}$  the score of individual  $i$  at marker  $l$ . Values of  $I < 0.05$  or  $I > 0.95$  are indicative of

a statistical linkage disequilibrium between the two markers under consideration.

A subset of markers involved in pairs showing high linkage disequilibrium was selected and sequenced to assess the level of marker redundancy in the dataset. For these markers, bacterial cultures were sent to Genome Express® (<http://www.genome-express.com>) for insert amplification and sequencing with M13 forward and M13 reverse primers. Raw sequence files were trimmed and aligned using Bioedit 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Marker sequences were also blasted against the full genomic sequence of *Ae. aegypti* (available for download at <http://aaegypti.vectorbase.org/GetData/Downloads?type=Genome> and comprising 4758 supercontigs in total).

#### Evaluation of genetic diversity between and within mosquito strains

Genetic variation was assessed within each mosquito strain by computing the Shannon index of phenotypic diversity *S* [31] with Popgene v1.32 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/pr01.htm>) as well as the pair-wise Jaccard coefficients [32] with the vegdist function of the vegan R package (<http://cc.oulu.fi/~jarioksa/softhelp/vegan.html>). These two diversity indices do not rely on the estimation of allelic frequencies, which for dominant data such as DArT data requires additional assumptions (e.g. Hardy-Weinberg equilibrium). In addition, estimates of allelic frequencies were obtained with the Bayesian method with non-uniform prior distribution [33] implemented in AFLP-SURV v1.0 (<http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>) [34], and used to calculate Nei's gene diversity [35] and the proportion of polymorphic markers at the 5% level within each strain. Genetic differentiation between strains was estimated by performing an analysis of molecular variance (AMOVA) using Arlequin v3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>) [36] and by calculating the *F*<sub>st</sub> index with AFLP-SURV v1.0. Principal coordinate analyses (PCO) were carried out with PCO v1.0 (<http://www.stat.auckland.ac.nz/~mja/Programs.htm>).

#### Abbreviations

*Bti*: *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*; AFLP: amplified fragment length polymorphism; DArT: Diversity Arrays Technology; MITE: miniature inverted repeat transposable element; TE: transposable element; SNP: single nucleotide polymorphism.

#### Authors' contributions

AB carried out the DArT experiments, analysed the data and drafted the manuscript. MP was in charge of the mosquito rearing, the bioassays, the DNA extractions and the sequence analyses, and wrote parts of the draft. LD and

JPD conceived the overall study and helped with the writing. GT took part to the sequence analyses. AK designed the MITE protocol, coordinated the data analysis and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Additional material

##### Additional file 1

*Enzyme combinations tested to implement the traditional DArT protocol on the genome of Aedes aegypti.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-459-S1.doc>]

##### Additional file 2

*Example of a poor-quality genomic representation obtained with enzyme combination PstI + Tsp509I.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-459-S2.jpeg>]

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Joëlle Patouraux for technical assistance in mosquito rearing, Sébastien Boyer for help with insecticide selection, and Mathieu Tilquin for providing recent data on toxic leaf litters. They are also grateful to Vanessa Caig and Margaret Evers for technical help with the DArT technique, and to Kasia Heller-Uszynska and Damian Jaccoud for constructive discussion during this work. AB and LD were funded by the Région Rhône-Alpes (grants #0501553401 and #0501545401, respectively) and MP, LD and JPD benefited from a collaborative grant attributed by the Démoustication Rhône-Alpes.

#### References

- Schlötterer C: **The evolution of molecular markers – just a matter of fashion?** *Nat Rev Genet* 2004, **5**:63-69.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P: **The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**:981-994.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, group atSw: **SNPs in ecology, evolution and conservation.** *Trends Ecol Evol* 2004, **19**:208-216.
- Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C: **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations.** *Mol Ecol* 2007, **16**:3759-3767.
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A: **Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e25.
- Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A: **Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9915-9920.
- Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yang S, Uszynski G, Mohler V, Lehmsiek A, Kuchel H, Hayden M, Howes N, Sharp P, Vaughan P, Rathmell B, Huttner E, Kilian A: **Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome.** *Theor Appl Genet* 2006, **113**:1409-1420.
- Kilian A, Huttner E, Wenzl P, Jaccoud D, Carling J, Caig V, Evers M, Heller-Uszynska K, Cayla C, Patarapuwadol S, Xia L, Yang S, Thomson B: **The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement.** *In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution*; 27–31 May 2003; Bologna 2005:443-461.

9. James KE, Schneider H, Ansell SW, Evers M, Robba L, Uszynski G, Pedersen N, Newton AE, Russell SJ, Vogel JC, Kilian A: **Diversity Arrays Technology (DArT) for pan-genomic evolutionary studies of non-model organisms.** *PLoS ONE* 2008, **3**:e1682.
10. Wittenberg A, Lee T, Cayla C, Kilian A, Visser R, Schouten H: **Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Genet Genomics* 2005, **274**:30-39.
11. Yang S, Pang W, Ash G, Harper J, Carling J, Wenzl P, Huttner E, Zong X, Kilian A: **Low level of genetic diversity in cultivated pigeonpea compared to its wild relatives is revealed by diversity arrays technology.** *Theor Appl Genet* 2006, **113**:585-595.
12. Sessitsch A, Hackl E, Wenzl P, Kilian A, Kostic T, Stralis-Pavese N, Sandjong BT, Bodrossy L: **Diagnostic microbial microarrays in soil ecology.** *New Phytol* 2006, **171**:719-736.
13. Tomori O: **Yellow fever: The recurring plague.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004, **41**:391-427.
14. Lacey LA: ***Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control.** *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**:133-163.
15. Tu ZJ: **Molecular and evolutionary analysis of two divergent subfamilies of a novel miniature inverted repeat transposable element in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.** *Mol Biol Evol* 2000, **17**:1313-1325.
16. Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P: **How to track and assess genotyping errors in population genetics studies.** *Mol Ecol* 2004, **13**:3261-3273.
17. Behura SK: **Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues.** *Mol Ecol* 2006, **15**:3087-3113.
18. Cornman RS, Arnold ML: **Phylogeography of *Iris missouriensis* (Iridaceae) based on nuclear and chloroplast markers.** *Mol Ecol* 2007, **16**:4585-4598.
19. Kidwell MG, Lisch DR: **Transposable elements and host genome evolution.** *Trends Ecol Evol* 2000, **15**:95-99.
20. Casacuberta JM, Santiago N: **Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes.** *Gene* 2003, **311**:1-11.
21. Jiang N, Feschotte C, Zhang XY, Wessler SR: **Using rice to understand the origin and amplification of miniature inverted repeat transposable elements (MITEs).** *Curr Opin Plant Biol* 2004, **7**:115-119.
22. Feschotte C, Jiang N, Wessler SR: **Plant transposable elements: Where genetics meets genomics.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:329-341.
23. Matsumoto T, Wu JZ, Kanamori H, Katayose Y, Fujisawa M, Namiki N, Mizuno H, Yamamoto K, Antonio BA, Baba T, Sakata K, Nagamura Y, Aoki H, Arikawa K, Arita K, Bito T, Chiden Y, Fujitsuka N, Fukunaka R, Hamada M, Harada C, Hayashi A, Hijishita S, Honda M, Hosokawa S, Ichikawa Y, Itonuma A, Iijima M, Ikeda M, Ikeno M, Ito K, Ito S, Ito T, Ito Y, Iwabuchi A, Kamiya K, Karasawa W, Kurita K, Katagiri S, Kikuta A, Kobayashi H, Kobayashi N, Machita K, Maehara T, Masukawa M, Mizubayashi T, Mukai Y, Nagasaki H, Nagata Y, Naito S, Nakashima M, Nakama Y, Nakamichi Y, Nakamura M, Meguro A, Negishi M, Ohta I, Ohta T, Okamoto M, Ono N, Saji S, Sakaguchi M, Sakai K, Shibata M, Shimokawa T, Song JY, Takazaki Y, Terasawa K, Tsugane M, Tsuji K, Ueda S, Waki K, Yamagata H, Yamamoto M, Yamamoto S, Yamane H, Yoshiki S, Yoshihara R, Yukawa K, Zhong HS, Yano M, Sasaki T, Yuan QP, Shu OT, Liu J, Jones KM, Gansberger K, Moffat K, Hill J, Bera J, Fadrosch D, Jin SH, Johri S, Kim M, Overton L, Reardon M, Tsitrin T, Vuong H, Weaver B, Cieccko A, Tallon L, Jackson J, Pai G, Van Aken S, Utterback T, Reidmuller S, Feldblyum T, Hsiao J, Zismann V, Iobst S, de Vazeille AR, Buell CR, Ying K, Li Y, Lu TT, Huang YC, Zhao Q, Feng Q, Zhang L, Zhu JJ, Weng QJ, Mu J, Lu YQ, Fan DL, Liu YL, Guan JP, Zhang YJ, Yu SL, Liu XH, Zhang Y, Hong GF, Han B, Choise N, Demange N, Orjeda G, Samain S, Cattolico L, Pelletier E, Couloux A, Segurens B, Wincker P, D'Hont A, Scarpelli C, Weissenbach J, Salanoubat M, Quetier F, Yu Y, Kim HR, Rambo T, Currie J, Collura K, Luo MZ, Yang TJ, Ammiraju JSS, Engler F, Soderlund C, Wing RA, Palmer LE, de la Bastide M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, O'Shaughnessy A, Dike S, Dedhia N, Preston R, Balija V, McCombie WR, Chow TY, Chen HH, Chung MC, Chen CS, Shaw JF, Wu HP, Hsiao KJ, Chao YT, Chu MK, Cheng CH, Hour AL, Lee PF, Lin SJ, Lin YC, Liou JY, Liu SM, Hsing YI, Raghuvanshi S, Mohanty A, Bharti AK, Gaur A, Gupta V, Kumar D, Ravi V, Vij S, Kapur A, Khurana P, Khurana JP, Tyagi AK, Gaikwad K, Singh A, Dalal V, Srivastava S, Dixit A, Pal AK, Ghazi IA, Yadav M, Pandit A, Bhargava A, Sureshbabu K, Batra K, Sharma TR, Mohapatra T, Singh NK, Messing J, Nelson AB, Fuks G, Kavchok S, Keizer G, Llaca ELV, Song RT, Tanyolac B, Young S, Il KH, Hahn JH, Sangsakoo G, Vanavichit A, de Mattos LAT, Zimmer PD, Malone G, Dellagostin O, de Oliveira AC, Bevan M, Bancroft I, Minx P, Cordum H, Wilson R, Cheng ZK, Jin WW, Jiang JM, Leong SA, Iwama H, Gojobori T, Itoh T, Niimura Y, Fujii Y, Habara T, Sakai H, Sato Y, Wilson G, Kumar K, McCouch S, Juretic N, Hoen D, Wright S, Bruskiwicz R, Bureau T, Miyao A, Hirochika H, Nishikawa T, Kadowaki K, Sugiura M, Int Rice Genome Sequencing P: **The map-based sequence of the rice genome.** *Nature* 2005, **436**:793-800.
24. Izsvák Z, Ivics Z, Shimoda N, Mohn D, Okamoto H, Hackett PB: **Short inverted-repeat transposable elements in teleost fish and implications for a mechanism of their amplification.** *J Mol Evol* 1999, **48**:13-21.
25. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG: **Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*.** *Science* 2001, **293**:857-860.
26. Wilson TG: **Transposable elements as initiators of insecticide resistance.** *J Econ Entomol* 1993, **86**:645-651.
27. Storz JF: **Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence.** *Mol Ecol* 2005, **14**:671-688.
28. Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Després L, Ravanel P, Géréria R, Gury J: **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* spores in mosquitoes' natural habitats.** *PLoS ONE* in press.
29. David JP, Rey D, Pautou MP, Meyran JC: **Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites.** *J Invertebr Pathol* 2000, **75**:9-18.
30. Raymond M, Prato G, Ratsira D: **Probability analysis of mortality assays displaying quantal response, version 3.3.** Praxeme, Saint Georges D'Orques, France; 1995.
31. Shannon CE: **A mathematical theory of communication.** *Bell System Technical Journal* 1948, **27**:379-423.
32. Jaccard P: **Nouvelles recherches sur la distribution florale.** *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 1908, **44**:223-270.
33. Zhivotovskiy LA: **Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers.** *Mol Ecol* 1999, **8**:907-913.
34. Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I: **Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size.** *Mol Ecol* 2002, **11**:139-151.
35. Nei M: **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, **70**:3321-3323.
36. Excoffier L, Laval G, Schneider S: **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.** *Evol Bioinform Online* 2005, **1**:47-50.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
http://www.biomedcentral.com/info/publishing\_adv.asp



## Article II

---

**Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations.**

BONIN, A., PARIS, M., TETREAU, G., DAVID, J. P., DESPRES, L.

*BMC Genomics*. 10:55 (2009)



Research article

Open Access

## Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations

Aurélie Bonin\*<sup>†</sup>, Margot Paris<sup>†</sup>, Guillaume Tetreau<sup>†</sup>, Jean-Philippe David and Laurence Després

Address: Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

Email: Aurélie Bonin\* - abonin@indiana.edu; Margot Paris - margot.paris@e.ujf-grenoble.fr; Guillaume Tetreau - guillaume.tetreau@e.ujf-grenoble.fr; Jean-Philippe David - jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr; Laurence Després - laurence.despres@ujf-grenoble.fr

\* Corresponding author <sup>†</sup>Equal contributors

Published: 21 November 2009

Received: 25 July 2009

BMC Genomics 2009, 10:551 doi:10.1186/1471-2164-10-551

Accepted: 21 November 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/551>

© 2009 Bonin et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Genome scans are becoming an increasingly popular approach to study the genetic basis of adaptation and speciation, but on their own, they are often helpless at identifying the specific gene(s) or mutation(s) targeted by selection. This shortcoming is hopefully bound to disappear in the near future, thanks to the wealth of new genomic resources that are currently being developed for many species. In this article, we provide a foretaste of this exciting new era by conducting a genome scan in the mosquito *Aedes aegypti* with the aim to look for candidate genes involved in resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) insecticidal toxins.

**Results:** The genome of a *Bti*-resistant and a *Bti*-susceptible strains was surveyed using about 500 MITE-based molecular markers, and the loci showing the highest inter-strain genetic differentiation were sequenced and mapped on the *Aedes aegypti* genome sequence. Several good candidate genes for *Bti*-resistance were identified in the vicinity of these highly differentiated markers. Two of them, coding for a cadherin and a leucine aminopeptidase, were further examined at the sequence and gene expression levels. In the resistant strain, the cadherin gene displayed patterns of nucleotide polymorphisms consistent with the action of positive selection (e.g. an excess of high compared to intermediate frequency mutations), as well as a significant under-expression compared to the susceptible strain.

**Conclusion:** Both sequence and gene expression analyses agree to suggest a role for positive selection in the evolution of this cadherin gene in the resistant strain. However, it is unlikely that resistance to *Bti* is conferred by this gene alone, and further investigation will be needed to characterize other genes significantly associated with *Bti* resistance in *Ae. aegypti*. Beyond these results, this article illustrates how genome scans can build on the body of new genomic information (here, full genome sequence and MITE characterization) to finally hold their promises and help pinpoint candidate genes for adaptation and speciation.

## Background

In the past few years, evolutionary biologists have increasingly bet on population genomics approaches to study the genetic basis of adaptation and speciation. Genome scans have flourished in the literature, providing valuable insight into the genetics of local adaptation [1,2], sympatric speciation [3], host race or ecotype differentiation [4-7], and response to climate change or exotic invasions [8,9], among others. In most cases, however, population genomics alone fell short of pinpointing the specific gene(s) or mutation(s) targeted by selection during the adaptation or speciation process [10,11].

One of the main reasons for this recurring setback is the present lack of genomic resources for most examined species. For example, due to the absence of more powerful alternatives, many population genomics studies rely on genetic markers such as AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphisms) [11,12], which can generally be obtained easily for any organism. Unfortunately, such markers present the double disadvantage of being anonymous and of falling predominantly in non-coding regions of the genome, i.e. far from potential candidate regions for adaptation and speciation [10]. Moreover, when genomic sequences are scarce or poorly annotated, identifying candidate genes in the vicinity of markers showing a selection signature represents a daunting task that few researchers have undertaken so far (but see [13]). Yet, we predict that these limitations are bound to disappear in the near future, especially with the increasing use of next-generation sequencing technologies. In this article, we aim at providing a foretaste of this exciting new era by illustrating how new genomic tools can help unravel the genetic basis of mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) insecticidal toxins.

Considered as a safe alternative to chemical insecticides, the bio-insecticide *Bti* is widely used worldwide for mosquito control [14]. *Bti* toxicity is mainly conferred by three Cry toxins (Cry4A, Cry4B and Cry11A) and one Cyt toxin (Cyt1A), which aggregate in a proteic crystal produced during sporulation of the bacteria [15]. *Bti* is usually sprayed in mosquito breeding sites as a mixture of spores and toxins, which is ingested together with organic detritus by developing larvae. In the larval midgut, *Bti* toxins are first activated by protease/trypsin-like enzymes or aminopeptidases [16]. Then, they bind to specific receptors of the midgut cells (Cry toxins), or directly interact with the cell membrane (Cyt1A toxin), ultimately causing pore formation and cell lysis [16]. Cyt1A is also known to act synergistically with Cry toxins, increasing the overall toxicity of the *Bti* mixture [17,18]. Due to the complexity of *Bti* toxicity mechanisms, some have argued that resistance to *Bti* would likely require adaptive mutations in several genes [19,20]. This argument is reinforced by the fact that

only a handful of studies have observed evidence of laboratory or natural resistance to *Bti* in mosquito [19,21-23]. Because of the probable multilocus nature of *Bti* resistance, population genomics appears to be an approach of choice to identify genes involved in this process.

Here, we describe the application of population genomics to the search for candidate genes for resistance to a toxic leaf litter containing *Bti* spores. With the mosquito *Aedes aegypti* as a model, we first conducted a genome scan relying on about 500 MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element)-derived markers expected to occur frequently in gene-rich regions [24,25]. By combining the results of this genome scan with data from the publicly available genome sequence of *Ae. aegypti*, we were then able to localize two good candidate genes for *Bti* resistance. Finally, these two genes were further analyzed at the sequence and gene expression levels in order to determine if selection was indeed a driving force in their evolution.

## Results

### Genome scan and identification of outlier loci presumably influenced by selection

Our search for candidate genes linked to *Bti* resistance was conducted in two *Aedes aegypti* strains differing drastically in their susceptibility to *Bti* as well as to individual *Bti* toxins (see the Methods part for resistance ratios). The genome of *Ae. aegypti* was screened using a variant of the DArT (Diversity Arrays Technology) procedure, where motifs of a particular MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) family called *Pony* served as primer anchors for PCR amplification. In total, 476 biallelic dominant markers were surveyed for 29 individuals in each mosquito strain, revealing a particularly high genetic differentiation between strains (mean  $F_{st} = 0.556$ ). This strong genetic structure was not surprising given the history of the two strains, and in particular the recent bottleneck experienced by the resistant strain (Additional file 1). However, high neutral  $F_{st}$  values are expected to reduce the power of methods revealing outlier loci potentially under selection on the basis of an atypically high genetic differentiation. For example, the application of the program Dfdist [26] to our data detected only one locus departing from neutral expectations for  $\alpha = 1\%$ , because the neutral envelope included almost the entire range of possible differentiation values (Additional file 2). As a result, we adopted a different strategy and retained as outliers those loci for which alternative phenotypes (fragment presence/absence) were fixed or nearly fixed in each strain. A total of 70 such markers were sequenced for further analyses.

### Outlier sequencing and localization in the genome

Among the outlier sequences obtained, one pair differed only by a gap and another one by only a mutation, result-

ing in a redundancy rate of 2.86%. After trimming the primer sequence and the *Pony* motif, the 68 unique marker sequences (GenBank accession no. [FJ231034-FJ231090](#); sequences shorter than 50 bp could not be deposited) had an average size of 185.2 bp (range 16-868 bp). Of these unique sequences, 41 could be assigned to a unique position in the *Aedes aegypti* genome, and all but two of these positions were found on different supercontigs (Additional file 3). Six sequences were situated on the same supercontig as a candidate gene for *Bti* resistance (DArT\_102, DArT\_318, DArT\_400, DArT\_415, DArT\_432 and DArT\_467), and two of them (DArT\_432 and DArT\_467) co-localized with the same gene (a cadherin). It had to be noted that physical distances between candidate genes and outlier markers situated on the same supercontig were considerable, ranging from 97907 bp (cadherin and DArT\_467) to more than 300 Mbp (glycosyltransferase and DArT\_415). According to these results, the cadherin gene (CAD, VectorBase Gene ID AAEL001196) turned out to be a serious candidate for *Bti* resistance because two outlier markers pointed towards it, one of them at the shortest distance recorded in this study. This gene, which codes for a possible toxin-binding receptor [27], was thus selected for further investigation at the sequence and expression levels. We also focused on the leucine aminopeptidase gene (LAP, VectorBase Gene ID AAEL001649) because of its potential implication in *Bti* toxin activation [28].

#### Candidate gene sequence analysis

A total of 1,467 bp and 1,657 bp were sequenced for the CAD and LAP genes, respectively. All sequences were deposited into GenBank, with accession numbers [GU066340](#) to [GU066385](#). As shown in Table 1, the two candidate genes shared similarities: both had a higher genetic diversity in the susceptible than in the resistant strain even if more individuals were sequenced in this latter. This observation was consistent with the fact that both strains are separated by 18 generations of selection, and that the resistant strain experienced a strong bottleneck at generation 10 (Additional file 1). Both genes also showed similar numbers of haplotypes in each strain (13 and 12 haplotypes in the susceptible strain for CAD and LAP, respectively; and 5 haplotypes in the resistant strain for both genes). On the other hand, the two candidate genes differed by their overall level of genetic diversity and inter-strain differentiation. For example, the *Fst* value was 0.186 only for CAD vs. 0.321 for LAP. Likewise, the nucleotide diversity estimated for LAP in the susceptible strain was about four times lower than that estimated for CAD, this ratio reaching 17 when considering the resistant strain. However, it has to be noted that polymorphisms were not uniformly distributed along the CAD gene sequence, some regions showing globally more variation (e.g. sub-domain SD4 and interdomain SD4-SD5 of the protein; Figure 1).

These patterns of genetic diversity translated differently at the codon level. We found three non-synonymous sites in the CAD sequence, of which none was diagnostic of one strain in particular, whereas for the LAP sequence, only two of nine non-synonymous mutations were present in the resistant strain. Six non-synonymous sites, among which five could only be found in the susceptible strain, were noticeably situated in 5' and 3' untranslated regions and could thus affect transcript stability and/or translation.

Finally, the examination of haplotype repartition between strains allowed this picture to be completed. For the CAD gene, one haplotype present in all 12 sampled resistant individuals (18 haplotypes out of 24) existed only in 2 susceptible individuals (2 haplotypes out of 20). For the LAP gene, the most frequent haplotype in the resistant strain (11 haplotypes out of 24) was absent from the susceptible strain.

#### Neutrality tests

For both candidate genes, we tested for deviation from neutral evolution in the resistant strain by applying different neutrality tests to the observed polymorphism data (Table 2). Tajima's *D* and Fay and Wu's *H* highlight a skew in the frequency distribution of variants, *H* giving more weight to high-frequency polymorphisms, whereas Fu and Li's *D\** and *F\** detect a discrepancy between either the total number of mutations (*D\**) or the average number of differences between two sequences (*F\**) and the number of singletons. As a result, each one of these tests is based on different diversity parameters and gives different information on the type of selection presumably in action. In this study, every test except Fay and Wu's *H* gave positive values for both genes (Table 2), which is consistent with the recent bottleneck experienced by the resistant strain. None of the tests was significant for LAP, whereas *D\**, *F\** and *H* remained significant for CAD even when accounting for the particular demographic history of the strain (Table 2). The positive values of *D\** and *F\** suggested a deficiency of recent (i.e. rare) mutations, whereas the negative *H* indicated an excess of high compared to intermediate frequency mutations.

#### Gene expression analyses

Real-time reverse-transcription PCR (RT-PCR) analyses revealed that levels of gene expression were reduced in the resistant strain compared to the susceptible strain for both candidate genes (2.17-fold and 1.68-fold under-expression for the CAD and the LAP genes, respectively; Figure 2). Non-parametric Mann-Whitney tests indicated that reduction in expression levels was significant for both genes ( $p = 0.017$  and  $p = 0.002$  for the CAD and LAP genes, respectively). However, only the expression fold change observed for the CAD gene (2.17) was higher than the

**Table 1: Measures of genetic diversity and divergence obtained for the two candidate genes**

Gene/Domain	Strain	Fragment size (bp)	N	Hap	S	Si	NS	Hd	$\pi$	$\theta_w$	k	K	Fst	
Cadherin (CAD)	Whole sequence*	Susceptible	1467	20	13	67	0	3	0.932	0.023	0.013	32.363	35.254	0.186
		Resistant		24	5	65	1	3	0.435	0.017	0.012	25.033		
	SD2	Susceptible	75	22	3	2	0	0	0.567	0.013	0.007	0.961	1.136	0.233
		Resistant		24	2	2	0	0	0.391	0.010	0.007	0.783		
	SD2-SD3	Susceptible	69	22	3	2	1	0	0.558	0.009	0.008	0.610	0.568	0.119
		Resistant		24	2	1	0	0	0.391	0.006	0.004	0.391		
	SD3	Susceptible	268	22	3	12	4	1	0.541	0.016	0.012	4.264	4.705	0.214
		Resistant		24	2	8	0	0	0.391	0.012	0.008	3.130		
	SD3-SD4	Susceptible	77	22	2	3	0	2	0.485	0.019	0.011	1.455	1.705	0.229
		Resistant		24	2	3	0	1	0.391	0.015	0.010	1.174		
	SD4	Susceptible	279	22	4	18	4	0	0.571	0.026	0.018	7.273	8.080	0.211
		Resistant		24	2	14	0	0	0.391	0.020	0.013	5.478		
	SD4-SD5	Susceptible	69	22	3	6	1	0	0.541	0.038	0.024	2.602	2.795	0.185
		Resistant		24	2	5	0	0	0.391	0.028	0.019	1.957		
SD5	Susceptible	246	10	4	17	1	1	0.733	0.034	0.024	8.422	8.164	0.176	
	Resistant		22	4	14	0	1	0.398	0.020	0.016	5.039			
SD5-SD6	Susceptible	63	10	2	1	0	0	0.533	0.008	0.006	0.533	0.555	0.187	
	Resistant		22	2	1	0	0	0.368	0.006	0.004	0.368			
SD6	Susceptible	279	10	2	15	0	1	0.533	0.029	0.019	8.000	8.318	0.187	
	Resistant		22	2	15	0	1	0.368	0.020	0.015	5.519			
SUP6	Susceptible	42	10	2	1	0	0	0.533	0.013	0.008	0.533	0.555	0.187	
	Resistant		22	2	1	0	0	0.368	0.009	0.007	0.368			
Leucine aminopeptidase (LAP)	Susceptible	1657	22	12	29	0	9	0.900	0.006	0.005	10.069	8.909	0.321	
	Resistant		24	5	6	0	2	0.688	0.001	0.001	2.025			

N, number of alleles sampled; Hap, number of different haplotypes; S, number of segregating sites; Si, number of singletons; NS, number of non-synonymous mutations; Hd, haplotype diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity (per site);  $\theta_w$ , Watterson's mutation parameter  $\theta$  estimated from S (per site); k, average number of nucleotide differences within strain; K, average number of nucleotide differences between strains; Fst, genetic differentiation between strains.

\* Some measures (e.g. S and NS) are different between the whole sequence and the total of all sequences because of a different number of sampled haplotypes.

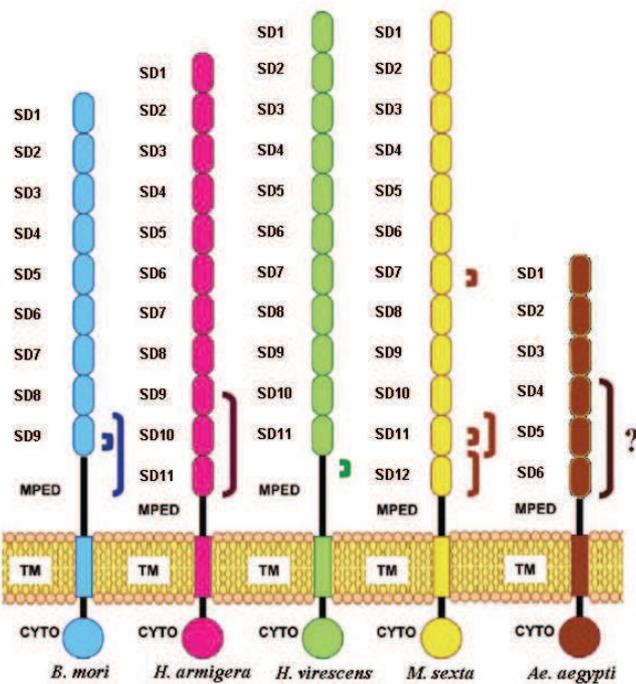
two-fold change conservatively used as a significant threshold in expression studies [29].

## Discussion

### A MITE-based genome scan to search for candidate genes

The goal of this study was to identify genes conferring resistance to the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in an *Aedes aegypti* mosquito strain selected for several generations with a toxic leaf litter containing *Bti* spores. The genetic basis of *Bti* resistance is likely to be multigenic [19,20], and in *Ae. aegypti*, we listed as many as 160 serious candidates by virtue of their known function and/or proven association with *Bti* resistance in other species (e.g. [20,30,31]). As a result, we

chose to tackle this study by adopting a population genomics approach. The underlying idea was to examine many MITE-derived DArT markers scattered in the genome to get an accurate estimate of the overall background (i.e. neutral) genetic differentiation between the selected (*Bti*-resistant) and control (*Bti*-susceptible) strains. This in turn allowed detecting markers with an atypically high inter-strain genetic differentiation, and thus possibly linked to a gene under positive selection due to *Bti* resistance. Our genome scan revealed an overall high level of neutral genetic differentiation between the two strains (mean Fst = 0.556), which is not unexpected in the light of the history of the resistant strain, and especially of the bottleneck it experienced at generation 10



**Figure 1**  
**Comparison between lepidopteran cadherin-like proteins and the *Aedes aegypti* cadherin studied here.**

Cadherin-like proteins are constituted of different domains: SD, subdomain; MPED, membrane-proximal extracellular domain; TM, transmembrane domain; CYTO, cytoplasmic domain. Only features present in the mature form of the protein are outlined here. Known and putative Cry binding sites characterized in lepidopterans are indicated by parentheses. *B. mori*, *Bombyx mori*; *H. armigera*, *Helicoverpa armigera*; *H. virescens*, *Heliothis virescens*; *M. sexta*, *Manduca sexta*; *Ae. aegypti*, *Aedes aegypti*. Adapted from Figure 10 in [27].

(see Additional File 1). Yet, the *Fst* value obtained between the same two mosquito strains using AFLP markers is substantially lower (mean *Fst* = 0.114; Paris, pers. comm.). AFLP and DArT markers are biallelic, dominant and, to a certain extent, randomly distributed in the genome so they should provide similar genetic differentiation estimates. However, the DArT markers developed for the purpose of this study are intimately associated with a specific family of MITEs called *Pony*, whose characteristics might explain the discrepancy between the two *Fst* measures. *Pony* elements constitute about 1.1% of the genome of *Ae. aegypti* [25], and although their transposition mechanism is still unclear, it could be triggered by unfavorable environmental conditions as was shown for other MITEs in plants for example [24,32,33]. Several authors have even underlined the potential contribution of MITEs to rapid adaptations and, ultimately, genome evolution [24,34]. One can thus speculate that the environmental stress imposed by toxic leaf litter selection stimulated *Pony* transpositions, hence inflating estimates of inter-strain genetic differentiation as measured by our *Pony*-associated markers. Like many MITEs, *Pony* motifs are also known to frequently occur in the non-coding regions of genes [25]. Because of this last characteristic of *Pony* elements and of their high mutational potential possibly enhanced by stress, *Pony*-based DArTs are ideal random markers to explore the genome of *Ae. aegypti* and search for genes conferring resistance to *Bti*.

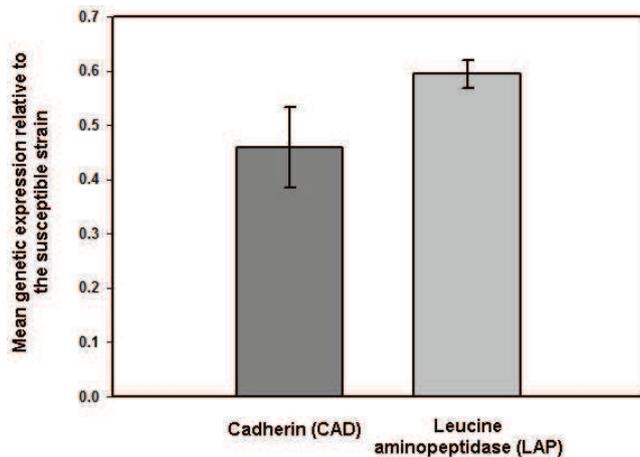
**DArT marker sequences and identification of candidate genes**

We decided to sequence the MITE-based DArT markers showing the highest inter-strain differentiation (outliers), as those are the most likely to be linked to genes conferring resistance to *Bti*. Of the 70 sequences obtained, 41 (68.6%) matched to unique locations in the genome of

**Table 2: Results of the neutrality tests for the resistant strain**

Neutrality test	Value	Significance according to coalescent simulations based on a large constant population size <sup>a</sup>	Significance according to coalescent simulations based on the known demographic history of the resistant strain <sup>b</sup>
<b>Cadherin (CAD)</b>			
Tajima's <i>D</i>	1.717	<i>p</i> < 0.01	n.s.
Fu and Li's <i>D</i> *	1.698	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
Fu and Li's <i>F</i> *	2.000	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
Fay and Wu's <i>H</i>	-50.370	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
<b>Leucine aminopeptidase (LAP)</b>			
Tajima's <i>D</i>	0.788	n.s.	n.s.
Fu and Li's <i>D</i> *	1.233	n.s.	n.s.
Fu and Li's <i>F</i> *	1.280	n.s.	n.s.
Fay and Wu's <i>H</i>	1.181	n.s.	n.s.

<sup>a</sup>, performed following the method of Hudson [70] implemented in DnaSP; <sup>b</sup>, performed using the program ms [68].



**Figure 2**  
**Results of the expression analyses for the two candidate genes.** This figure illustrates, for each candidate gene, the mean gene expression in the resistant strain relative to that in the susceptible strain.

*Ae. aegypti*, while the rest consisted of repeated sequences. As less than 40% of the genome of this species is constituted of single or low copy sequences [35], this result confirms the fact that MITE-based DArTs tend to fall near low-copy, possibly coding, sequences. The 41 genomic locations involved were all but two situated on different supercontigs of the *Ae. aegypti* full genome sequence, suggesting that there was no real bias in the distribution of our markers in the genome, at least for highly differentiated ones. Unfortunately, the *Ae. aegypti* genome has a weak gene density [35], and most of our outlier sequences (85.4%) fell in supercontigs with few or no putative genes. Furthermore, we recently performed a differential transcriptome analysis of *Ae. aegypti* larvae exposed to different xenobiotics. This study, based on the sequencing of millions of cDNA tags using next-generation sequencing, detected more than 2000 loci situated outside predicted genes and showing a significant transcription signal (David, pers. comm.). There is thus an obvious need for a better gene annotation in the *Ae. aegypti* genome, and one efficient strategy to tackle this task would be to concentrate the effort on regions of interest, like those showing signatures of selection.

The selection with toxic leaf litter was a recent event in the history of the resistant strain so linkage disequilibrium is probably extensive in the vicinity of selected genes [36]. In those conditions, detecting selection signatures in a genome is somewhat easier even with a relatively small marker density [37], but on the other hand, the existence of large haplotype blocks makes it more difficult to pinpoint the exact gene(s) under selection. In this study, the distance between outlier markers and candidate genes was

considerable (between 100 and 3,000 Kb) and might exceed the window of linkage disequilibrium around selected genes. In other words, we might have overlooked closer genes genuinely responsible for the signatures of selection, but not already annotated or absent from our list of candidates.

#### **The cadherin and leucine aminopeptidase as candidate genes**

Among the five candidate genes discovered in the proximity of outlier markers, we decided to examine further the cadherin (CAD) and leucine aminopeptidase (LAP) at the sequence and expression levels, to confirm or infirm the selection footprint. This step was all the more crucial since selection but also particular demographic histories can generate an atypically high genetic differentiation [38,39].

Neutrality tests are often used to verify the influence of selection in intraspecific sequence data [40,41]. However, they have often been criticized for their lack of power and their sensitivity to demographic events like bottlenecks or population expansions which can mimic selective effects [38,42]. In this study, this possible bias was overcome by performing tailor-made coalescence simulations based on the known demographic history of the resistant strain, in order to assess the significance of the tests. No firm evidence of selection was found at the nucleotide or expression level for the LAP gene, which rules out its implication in *Bti* resistance, at least as a gene with major effects. For the CAD gene, Fu and Li's  $D^*$  and  $F^*$  tests highlighted a deficit in rare mutations, which is usually the trademark of balancing selection [43]. Fay and Wu's  $H$  statistics indicated an excess of high compared to intermediate frequency mutations, which on the contrary suggests the spread of an advantageous mutation at a linked site (i.e. positive selection) [44]. Although those conflicting results might be hard to interpret at first glance, one has to keep in mind that the selection with the toxic leaf litter started only 20 generations ago. In addition, the resistant strain experienced a recent bottleneck which probably further eliminated low frequency variants. New mutations certainly have not had time yet to appear in the population, which would explain the positive  $D^*$  and  $F^*$  values. For the same reason, Tajima's  $D$  can be transiently positive right after a bottleneck [45]. As for the  $H$  statistics, it is not as sensitive to the loss of rare variants, so it is presumably more reliable here and we can reasonably think that the CAD gene shows genuine signs of positive selection. This evidence is further reinforced by the significant under-expression of this gene in the resistant strain. Cadherins are indeed known to bind to Cry toxins in other insect species [27] and to be involved in many cases of Cry resistance in insects (e.g. [46-48]). Here, under-expression of the cadherin gene could reduce the number of a certain type of Cry receptors and thus hinder pore forming, ulti-

mately limiting susceptibility to *Bti*. Similarly, resistance to the toxin Cry1Ac has been shown to be linked to reduced levels of membrane receptors in the cotton pest *Heliothis virescens* [49], or in the cabbage moth *Plutella xylostella* [50]. Nevertheless, cadherins are usually specific to one particular Cry toxin [27], and it is unlikely that the CAD gene alone is responsible for resistance to *Bti* which is a mixture of several Cry toxins. One can thus hypothesize that this gene's effects supplement those of one or several other genes that remain to be identified.

## Conclusion

Beyond their implications for the understanding of the genetic mechanisms of *Bti* mosquito resistance, these results illustrate how genome scans can build on the body of new genomic information (here, full genome sequence and MITE characterization) to finally hold their promises and help pinpoint candidate genes for adaptation and speciation [10]. In the near future, a wealth of genomics tools will be available for a much wider range of species, mostly thanks to the rapid development of next-generation sequencing technologies [51]. We predict this new knowledge will boost in many respects the use of population genomics for the study of the genetic bases of adaptation and speciation. Several limitations of current genome scans will certainly be soon overcome, with for example (1) the development of new genetic markers allowing screening the genome more finely (e.g. [52]) or specifically targeting coding regions (e.g. [53]); (2) an easier access to outlier sequences as well as full genomic sequences serving as references to locate outlier loci and identify nearby candidate genes; and (3) a better gene annotation. In short, population genomics will at last have the means to meet our expectations when it comes to identify genes under natural or artificial selection.

## Methods

### Biological material

Two *Aedes aegypti* laboratory strains were compared for the purpose of this study: the Bora Bora reference strain, known to be susceptible to most insecticides, and a strain artificially selected for resistance to a decomposed tree leaf litter showing a high toxicity for mosquito larvae. This leaf litter had been collected in a mosquito pond in Eastern France three months after treatment for mosquito control, and has been proved to contain *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) spores from commercial origin [54]. The use of this *Bti*-contaminated leaf litter in the selection experiments allowed mimicking the evolution of resistance to *Bti* in a situation close to field conditions. The susceptible and resistant strains were separated by 18 generations of selection (and by 20 generations in total), with a strong bottleneck at generation 10 (see Additional File 1 for more details on the demographic history of the resistant strain). The selection experiment and the bio-

assays implemented to monitor the evolution of resistance are described in [55]. At each generation, the lethal dose for 50% of the individuals after a 24 h-exposure (24 h-LD50) was determined for each strain using the Probit software [56]. After 18 generations of selection, the resistance ratios RR of the resistant strain (i.e., the ratio between the 24 h-LD50 values for the resistant and the susceptible strains, respectively) were 3.4-fold, 30.2-fold, 13.7-fold, 6.3-fold and 3-fold for the toxic leaf litter, Cry4A, Cry4B, Cry11A and Cyt1A toxins, respectively.

### DNA extraction and genome scan

The genomic DNA used for all subsequent molecular work was extracted from fresh fourth-instar mosquito larvae using the Qiagen DNeasy Tissue Kit and protocol (Qiagen). Prior to extraction, the larvae midgut was removed carefully to avoid bacterial contamination.

The classical protocol of the Diversity Array Technology (DArT) [57] was slightly modified so as to provide hundreds of good-quality markers scattered in the genome of *Ae. aegypti* and possibly associated to gene-rich regions [55]. Briefly, in a first step, genomic DNA was digested with restriction enzyme Bsp1286I and a specific adaptor was ligated to compatible ends. Restriction fragments including a particular *Ae. aegypti* MITE called *Pony* were PCR-amplified using a primer annealing to the adaptor sequence and a primer complementary to a conserved motif of the *Pony* element. PCR products obtained for all individuals of the two strains were pooled together and cloned to construct a DArT library containing a total of 6144 MITE-based clones. In a second step, a labelled target produced for each *Ae. aegypti* individual as described in the first step was hybridized to the library fragments spotted on a glass slide in order to reveal the polymorphic ones. Details of the protocol, in particular the adaptor and primer sequences used and the reproducibility rates, can be found in [55].

### Identification and sequencing of outlier loci potentially under selection

For each DArT marker obtained, allelic frequencies were estimated with the Bayesian method with non-uniform prior distribution [58] implemented in AFLP-SURV 1.0 [59]. Among those markers, we tracked those for which alternative phenotypes (fragment presence/absence) were fixed or nearly fixed in the two strains (for example, fragment present/absent for all individuals or all individuals except one). Our assumption was that such a pattern of extreme inter-strain genetic differentiation could be explained by the spread, in the resistant strain, of an advantageous allele initially present at low or intermediate frequency in the susceptible strain (standing variation), from which it is eventually purged by genetic drift and/or because it is slightly deleterious.

For 70 such markers, bacterial cultures were sent to Genome Express® <http://www.genome-express.com> for insert amplification and sequencing with M13 forward and M13 reverse primers. Raw sequence files were edited with BioEdit 7.0.9 [60] and purged from *Pony* and primer sequences. The obtained sequenced were blasted against the full genomic sequence of *Ae. aegypti* (consisting of 4758 supercontigs and available at <http://aaegypti.vectorbase.org/GetData/Downloads?type=Genome>).

### Identification of candidate genes

Although mechanisms of resistance to *Bti* are still unknown in dipterans, resistances to several Cry toxins have been intensively studied, especially in lepidopteran pests resistant to transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry toxins genes [20,30]. Because these toxins share similar three-dimensional structures, similar modes of action and resistance mechanisms can be expected between lepidopteran and dipteran insects [16,61]. We therefore considered as candidate genes for *Bti* resistance those belonging to families previously proved to be involved in Cry resistance [20,30,31]. To this list, we added genes potentially implicated in activation of *Bti* toxins (aminopeptidases, e.g. [28]; and trypsins and chymotrypsins, e.g. [62]), in toxin binding (alkaline phosphatases, e.g. [49,63]; aminopeptidases, e.g. [64]; cadherins, e.g. [48]; galactosidases and glycosyltransferases, e.g. [20,65]); or immune defense (mitogen-activated protein kinases, e.g. [31]). A keyword search was conducted in the VectorBase database <http://aaegypti.vectorbase.org/index.php> and a total of 160 candidates located on 98 different supercontigs were identified out of the 15,419 putative genes (16789 transcripts in total) referenced in the *Aedes aegypti* genome.

### Cadherin (CAD) and leucine aminopeptidase (LAP) gene sequencing

The complete genomic sequences of the CAD and LAP genes (VectorBase Gene IDs AAEL001196 and AAEL001649, respectively) were downloaded from the VectorBase website to help design sequencing primers (Additional file 4) with the software package Lasergene 7.2 (DNASTAR Inc.). The sequencing strategy for the CAD gene targeted exon 5 and more specifically the membrane-proximal subdomains (subdomains 4 to 6) of the protein which are the preferential binding sites of *Bti* Cry toxins in lepidopterans (Figure 1). For the LAP gene, three different primer pairs were selected to amplify the two main exons.

PCR amplifications were conducted for each gene in a 25- $\mu$ l total volume with 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP (Roche), 0.2  $\mu$ M of each primer, 5  $\mu$ g of BSA, 0.6 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10-30 ng of DNA. The PCR program included an initial 10-min denaturation step at 95°C; 40 cycles of dena-

uration at 95°C for 45s, annealing at the optimal temperature indicated in Additional file 4 for 45s and elongation at 72°C for 60s; followed by a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and sequencing reactions were performed in both directions using the amplification primers and the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems), following the manufacturer's indications. Fluorescently labelled sequencing products were run on an ABI PRISM 3100 capillary DNA sequencer (Applied Biosystems) and sequences were analyzed with SeqMan Pro 7.1.0 (DNASTAR Inc.). Overall, we obtained sequences for 11 and 12 individuals of the susceptible and resistant strains, respectively.

### Sequence analysis and neutrality tests

The software DnaSP 5.0 [66] was used to infer haplotype phase and to assess a variety of genetic diversity and differentiation parameters (e.g., nucleotide diversity  $p$ , haplotype diversity  $Hd$ , number of segregating sites  $S$ ,  $Fst$ , etc.) for each gene. Several statistics were also calculated based on the observed polymorphism data to test for deviation from neutral evolution in the resistant strain, including Tajima's  $D$  [67], Fu and Li's  $D^*$  and  $F^*$  [43], and Fay and Wu's  $H$  [44]. To assess whether these statistics significantly departed from a neutral scenario of evolution given the known demographic history of the resistant strain, we performed coalescent simulations using the program ms [68]. This program generates random independent samples according to a Wright-Fisher neutral model allowing population size changes in the past. For each gene, the mutation rate  $\mu$  was estimated from the per-locus mutation parameter  $\theta$  observed for the susceptible strain ( $\theta = 4N_e\mu$  and  $N_e = 6000$ ) and used as the starting value for the simulations (that is, as the value at present). Then 1000 neutral samples consisting of 24 haplotypes were simulated based on the known demographic history of the resistant strain (Additional file 1).

### RNA extraction and gene expression analyses

For the two candidate genes, real-time reverse-transcription PCR (RT-PCR) analyses were performed on three biological replicates for each strain, with each replicate consisting of 30 larvae reared in standard insectary conditions up to the fourth-instar stage (5 days). Total RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions and their quality was assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent) after DNase I (Invitrogen) treatment. Four micrograms of total RNA were digested with DNase I (Invitrogen) and then used for first-strand cDNA synthesis with SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase and oligo-dT<sub>20</sub> primers for 60 min at 50°C, according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR reactions were performed on an iQ5 system

(Bio-Rad) in a 25- $\mu$ L total reaction volume with 0.3  $\mu$ M of each primer, 12.5  $\mu$ L of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) and 5  $\mu$ L of cDNA diluted 25 times. The real-time RT-PCR program included an initial 3-min denaturation step at 95°C and 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s and annealing for 30s at the optimal temperature indicated in Additional file 4. For each gene, real-time RT-PCR efficiency was estimated from a serial dilution of cDNA (5 to 500 times) and taken into account in the data analysis performed with the  $\Delta\Delta C_T$  method [69]. Two housekeeping genes encoding ribosomal protein L8 (*RPL8*, GenBank accession number: [DQ440262](#)) and S7 (*RPS7*, GenBank accession number: [AY380336](#)) were used for normalization. Results were represented as mean expression ratios between *Bti*-resistant and susceptible larvae ( $\pm$  SE).

### Abbreviations

*Bti*: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; CAD: cadherin; DAiT: Diversity Arrays Technology; LAP: leucine aminopeptidase; MITE: miniature inverted-repeat transposable element; RT-PCR: reverse-transcription PCR.

### Authors' contributions

AB carried out the genome scan, analyzed the candidate gene sequence data and drafted the manuscript. MP worked on the outlier sequences, identified the two candidate genes, helped with the analyses and wrote substantial parts of the paper. GT obtained and analyzed the candidate gene sequence and expression data and was involved in the writing. JPD supervised the gene expression study and helped draft the manuscript. LD conceived the overall study, performed the demographic simulations and took part to the data analysis and to the writing. All authors read and approved the final manuscript.

### Additional material

#### Additional file 1

*Demographic history of the Aedes aegypti Bti-resistant strain. The Bti-resistant strain was originally selected from the susceptible standard Bora-Bora strain. This table presents the effective population size at each generation of selection.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S1.DOC>]

#### Additional file 2

*Results of the Dfdist analysis with  $r = 1\%$ . In this plot of inter-strain  $F_{st}$  values against heterozygosity estimates, each dot represents a DAiT marker. The red lines represent the 99% neutral confidence interval simulated using the program Dfdist [26]. Markers situated outside this interval diverge from neutral expectations and are thus potentially under selection. Here, the confidence interval is so large that it includes almost the entire range of possible  $F_{st}$  values.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S2.DOC>]

#### Additional file 3

*Outlier markers with a unique localization in the genome of Aedes aegypti. This table lists the 41 outlier markers with a unique localization in the genome of Aedes aegypti, as well as the numbers of annotated genes and candidate genes in the corresponding supercontigs.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S3.DOC>]

#### Additional file 4

*Primer pairs used for sequencing and real-time RT-PCR analyses. This table details the different primer pairs used in this study.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S4.DOC>]

### Acknowledgements

The authors would like to thank Sébastien Boyer for help with the insecticide selection and Andrzej Kilian for guidance on the DAiT technique. AB and LD were funded by the Région Rhône-Alpes (grants #0501553401 and #0501545401, respectively) and MP, JPD and LD benefited from a collaborative grant attributed by the Démoustication Rhône-Alpes. GT was supported by the French Ministry of Research.

### References

- Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F: **Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*).** *Mol Biol Evol* 2006, **23**:773-783.
- Meyer CL, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V: **Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal.** *Mol Ecol* 2009, **18**:2050-2062.
- Savolainen V, Anstett MC, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup MV, Powell MP, Springate D, Salamin N, Baker WJ: **Sympatric speciation in palms on an oceanic island.** *Nature* 2006, **441**:210-213.
- Nosil P, Egan SP, Funk DJ: **Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: "Isolation by adaptation" and multiple roles for divergent selection.** *Evolution* 2008, **62**:316-336.
- Emelianov I, Marec F, Mallet J: **Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth.** *P Roy Soc B-Biol Sci* 2004, **271**:97-105.
- Campbell D, Bernatchez L: **Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes.** *Mol Biol Evol* 2004, **21**:945-956.
- Galindo J, Morán P, Rolán-Alvarez E: **Comparing geographical genetic differentiation between candidate and noncandidate loci for adaptation strengthens support for parallel ecological divergence in the marine snail *Littorina saxatilis*.** *Molecular Ecology* 2009, **18**:919-930.
- Jump AS, Hunt JM, Martínez-Izquierdo JA, Peñuelas J: **Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*.** *Mol Ecol* 2006, **15**:3469-3480.
- Mealor BA, Hild AL: **Potential selection in native grass populations by exotic invasion.** *Mol Ecol* 2006, **15**:2291-2300.
- Bonin A: **Population genomics: a new generation of genome scans to bridge the gap with functional genomics.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3583-3584.
- Stinchcombe JR, Hoekstra HE: **Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits.** *Heredity* 2008, **100**:158-170.
- Luijckart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P: **The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**:981-994.

13. Wood HM, Grahame JW, Humphray S, Rogers J, Butlin RK: **Sequence differentiation in regions identified by a genome scan for local adaptation.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3123-3135.
14. Lacey LA: **Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control.** *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**:133-163.
15. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: **Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:775-806.
16. Bravo A, Gill SS, Soberón M: **Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon* 2007, **49**:423-435.
17. Pérez C, Fernandez LE, Sun JG, Folch JL, Gill SS, Soberón M, Bravo A: **Bacillus thuringiensis subsp. israelensis CytIAa synergizes CryIIAa toxin by functioning as a membrane-bound receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:18303-18308.
18. Poncet S, Delecluse A, Klier A, Rapoport G: **Evaluation of synergistic interactions among the CryIVa, CryIVb, and CryIVd toxic components of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis crystals.** *J Invertebr Pathol* 1995, **66**:131-135.
19. Georghiou GP, Wirth MC: **Influence of exposure to single versus multiple toxins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis on development of resistance in the mosquito Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae).** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:1095-1101.
20. Griffiths JS, Aroian RV: **Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins.** *Bioessays* 2005, **27**:614-624.
21. Boyer S, Tilquin M, Ravanel P: **Differential sensitivity to Bacillus thuringiensis var. israelensis and temephos in field mosquito populations of Ochlerotatus cataphylla (Diptera: Culicidae): toward resistance?** *Environ Toxicol Chem* 2007, **26**:157-162.
22. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG: **Insecticide resistance in Culex pipiens from New York.** *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21**:305-309.
23. Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM: **Resistance development in mosquito larvae Culex pipiens to the bacterial agent Bacillus thuringiensis var. israelensis.** *J Appl Entomol* 2003, **127**:29-32.
24. Casacuberta JM, Santiago N: **Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes.** *Gene* 2003, **311**:1-11.
25. Tu ZJ: **Molecular and evolutionary analysis of two divergent subfamilies of a novel miniature inverted repeat transposable element in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti.** *Mol Biol Evol* 2000, **17**:1313-1325.
26. Beaumont MA, Nichols RA: **Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure.** *P Roy Soc B-Biol Sci* 1996, **263**:1619-1626.
27. Pigott CR, Ellar DJ: **Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**:255-281.
28. Matsui M, Fowler JH, Walling LL: **Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function.** *Biol Chem* 2006, **387**:1535-1544.
29. Shi LM, Jones WD, Jensen RV, Harris SC, Perkins RG, Goodsaid FM, Guo L, Croner LJ, Boysen C, Fang H, et al.: **The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**(Suppl 9):10.
30. Ferré J, Van Rie J: **Biochemistry and genetics of insect resistance to Bacillus thuringiensis.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:501-533.
31. Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, Goot FG van der, Aroian RV: **Mitogen-activated protein kinase pathways defends against bacterial pore-forming toxins.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:10995-11000.
32. Barret P, Brinkman M, Beckert M: **A sequence related to rice Pong transposable element displays transcriptional activation by in vitro culture and reveals somaclonal variations in maize.** *Genome* 2006, **49**:1399-1407.
33. Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, Hirano HY: **The plant MITE mPing is mobilized in anther culture.** *Nature* 2003, **421**:167-170.
34. Benjak A, Boué S, Forneck A, Casacuberta JM: **Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (Vitis vinifera L.).** *Genome Biol Evol* 2009, **2009**:75-84.
35. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi ZY, Megy K, Grabherr M, et al.: **Genome sequence of Aedes aegypti, a major arbovirus vector.** *Science* 2007, **316**:1718-1723.
36. Przeworski M: **The signature of positive selection at randomly chosen loci.** *Genetics* 2002, **160**:1179-1189.
37. Storz JF: **Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence.** *Mol Ecol* 2005, **14**:671-688.
38. Nielsen R: **Molecular signatures of natural selection.** *Annu Rev Genet* 2005, **39**:197-218.
39. Akey JM, Eberle MA, Rieder MJ, Carlson CS, Shriver MD, Nickerson DA, Kruglyak L: **Population history and natural selection shape patterns of genetic variation in 132 genes.** *PLoS Biol* 2004, **2**:1591-1599.
40. Ford MJ: **Applications of selective neutrality tests to molecular ecology.** *Mol Ecol* 2002, **11**:1245-1262.
41. Otto SP: **Detecting the form of selection from DNA sequence data.** *Trends Genet* 2000, **16**:526-529.
42. Depaulis F, Mousset S, Veuille M: **Power of neutrality tests to detect bottlenecks and hitchhiking.** *J Mol Evol* 2003, **57**(Suppl 1):190-200.
43. Fu YX, Li WH: **Statistical tests of neutrality of mutations.** *Genetics* 1993, **133**:693-709.
44. Fay JC, Wu CI: **Hitchhiking under positive Darwinian selection.** *Genetics* 2000, **155**:1405-1413.
45. Fay JC, Wu CI: **A human population bottleneck can account for the discordance between patterns of mitochondrial versus nuclear DNA variation.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**:1003-1005.
46. Bel Y, Siqueira HAA, Siegfried BD, Ferré J, Escriche B: **Variability in the cadherin gene in an Ostrinia nubilalis strain selected for CryIAb resistance.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**:218-223.
47. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG: **Identification of a gene associated with Bt resistance in Heliothis virescens.** *Science* 2001, **293**:857-860.
48. Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, et al.: **Three cadherin alleles associated with resistance to Bacillus thuringiensis in pink bollworm.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:5004-5009.
49. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ: **Characterization of a CryIAC-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae.** *Eur J Biochem* 2004, **271**:3127-3135.
50. Kumaraswami NS, Maruyama T, Kurabe S, Kishimoto T, Mitsui T, Hori H: **Lipids of brush border membrane vesicles (BBMV) from Plutella xylostella resistant and susceptible to CryIAC d-endotoxin of Bacillus thuringiensis.** *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* 2001, **129**:173-183.
51. Rokas A, Abbot P: **Harnessing genomics for evolutionary insights.** *Trends Ecol Evol* 2009, **24**:192-200.
52. van Orsouw NJ, Hogers RCJ, Janssen A, Yalcin F, Snoeijers S, Verstege E, Schneiders H, Poel H van der, van Oeveren J, Versteegen H, van Eijk MJT: **Complexity reduction of polymorphic sequences (CRoPS): a novel approach for large-scale polymorphism discovery in complex genomes.** *PLoS ONE* 2007, **2**:e1172.
53. Namroud MC, Beaulieu J, Juge N, Laroche J, Bousquet J: **Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3599-3613.
54. Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P, Geremia RA, Gury J: **Long lasting persistence of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) in mosquito natural habitats.** *PLoS ONE* 2008, **3**:e3432.
55. Bonin A, Paris M, Després L, Tetreau G, David JP, Kilian A: **A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection.** *BMC Genomics* 2008, **9**:459.
56. Raymond M, Prato G, Ratsira D: **Probability analysis of mortality assays displaying quantal response, version 3.3.** Praxeme, Saint-Georges d'Orques, France; 1995.
57. Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinbols A, Kilian A: **Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9915-9920.
58. Zhivotovsky LA: **Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers.** *Mol Ecol* 1999, **8**:907-913.
59. Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I: **Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size.** *Mol Ecol* 2002, **11**:139-151.

60. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.
61. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N: **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** *Trends Genet* 2001, **17**:193-199.
62. Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH: **Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins.** *J Biol Chem* 1997, **272**:23473-23476.
63. Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M: **A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of CryIIAa toxin in *Aedes aegypti* larvae.** *Biochem J* 2006, **394**:77-84.
64. Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH: **Identification of a *Bacillus thuringiensis* CryIIIBa toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*.** *BMC Biochem* 2006, **7**:16.
65. Griffiths JS, Huffman DL, Whitacre JL, Barrows BD, Marroquin LD, Muller R, Brown JR, Hennes T, Esko JD, Aroian RV: **Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions.** *J Biol Chem* 2003, **278**:45594-45602.
66. Librado P, Rozas J: **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, **25**:1451-2.
67. Tajima F: **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism.** *Genetics* 1989, **123**:585-595.
68. Hudson RR: **Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation.** *Bioinformatics* 2002, **18**:337-338.
69. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.
70. Hudson RR: **Gene genealogies and the coalescent process.** *Oxf Surv Evol Biol* 1990, **7**:1-44.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)





## Article III

---

**Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes.**

PARIS, M., TETREAU, G., LAURENT, F., LELU, M., DESPRES, L., DAVID, J.-P.

*Pest Management Science*. 67, 122-128 (2011)



# Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes

Margot Paris, Guillaume Tetreau, Fabien Laurent, Maud Lelu, Laurence Despres and Jean-Philippe David\*

## Abstract

**BACKGROUND:** The simultaneous production of six different toxins by *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) is thought to delay the evolution of resistance in treated mosquito populations. Recent studies have shown that *Bti* can persist and proliferate in the environment, thereby imposing continuous selective pressure on mosquito populations, raising concerns about the long-term effectiveness of this bioinsecticide. In order to evaluate the effect of *Bti* persistence on the evolution of resistance, the authors selected a laboratory *Aedes aegypti* L. strain with field-collected leaf litter containing *Bti* toxins.

**RESULTS:** It is shown that resistance to each individual *Bti* toxin (up to 30-fold) can be obtained after only a few generations of selection. However, the resistance to commercial *Bti* and to environmental *Bti* remains low (twofold and 3.4-fold respectively) in the selected strain. Furthermore, some selected individuals exhibited resistance to Cry4B but not to Cry4A, suggesting that two distinct resistance mechanisms are involved in the resistance to these two toxins.

**CONCLUSION:** Considering that resistance to Cry toxins might act as a first step to resistance to a complete *Bti* toxin mixture, the present results highlight the importance of testing each toxin individually in order accurately to monitor *Bti* toxin resistance evolution in field populations.

© 2010 Society of Chemical Industry

**Keywords:** mosquitoes; *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; *Bti*; insecticide resistance; *Aedes aegypti*; Cry and Cyt toxins

## 1 INTRODUCTION

Mosquito control is a major public health concern, as mosquitoes transmit many severe human diseases such as malaria, filariasis, dengue fever, yellow fever, West Nile virus and the chikungunya virus.<sup>1</sup> Since the 1950s, the massive use of chemical insecticides has led to undesired toxicity on non-target organisms<sup>2,3</sup> and the selection of insecticide resistance mechanisms in mosquito populations.<sup>4,5</sup> A safe alternative to chemical insecticides is to use toxins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) as a larvicide.<sup>6,7</sup>

*Bti* bacteria produce a solid parasporal crystal composed of a mixture of four major insecticidal proteins: Cry4A, Cry4B, Cry11A and Cyt1A.<sup>8,9</sup> When ingested by mosquito larvae, the gut proteases solubilise and convert the inactive crystal into active toxins that interact with midgut cell membranes, leading to the formation of pores, cell lysis, septicemia and finally larva death.<sup>10,11</sup> One particularity of *Bti* toxins is that they interact synergistically, leading to high toxicity when used in combination.<sup>12–14</sup> Another advantage of *B. thuringiensis* toxins over chemical insecticides is their high specificity towards insect membrane receptors and their safety for non-target insects, vertebrates or mammals.<sup>2,3,15,16</sup> Consequently, *Bti* has been used in the French Rhône-Alpes region since 1990 for mosquito control. In 2007, bacterioinsecticides became the only insecticides authorised for mosquito larva control in metropolitan France and several other European countries.

While *B. thuringiensis* bacteria are usually described as poor colonists and non-remnant in the environment,<sup>17,18</sup> high concentrations of viable *B. thuringiensis* var. *israelensis* spores were found in decaying leaf litter collected from a mosquito breeding site in the French Rhône-Alpes region several months after it was treated with *Bti*.<sup>19,20</sup> At this study site, the persistence and proliferation of *Bti* bacteria progressively led to acute leaf litter toxicity for mosquito larvae. Prolonged exposure of mosquitoes to *Bti* toxins throughout their aquatic development is a direct consequence of *Bti* persistence, as organic detritus represents a major larval food source for mosquitoes.<sup>21</sup> Such situations may favour the appearance and spread of resistance in mosquito populations, compromising the long-term effectiveness of this bioinsecticide.

In natural mosquito populations, no consistent resistance has been detected even after long periods of repeated treatment with *Bti* toxins,<sup>22,23</sup> but recent studies have suggested that moderate *Bti* toxin resistance may occur locally.<sup>24–26</sup> Under laboratory conditions, only moderate resistance levels have been detected

\* Correspondence to: Jean-Philippe David, Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université de Grenoble, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France. E-mail: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 CNRS–Université de Grenoble, Grenoble, France

in the mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say after several generations of intense selection using the complete *Bti* toxin mixture.<sup>23,27,28</sup> However, laboratory selection using each *Bti* toxin separately made it possible to reach high resistance levels to individual toxins after a few generations.<sup>27</sup>

Although resistance mechanisms to *Bti* toxins have not been well characterised yet in Dipterans, resistances to other Cry toxins have been intensively studied in Lepidopterans resistant to transgenic crops producing *B. thuringiensis* Cry toxins.<sup>29,30</sup> To date, the decrease in the activity of the midgut proteases involved in toxin activation and modifications to specific membrane receptors are the two main mechanisms described for resistance to Cry toxins.<sup>31–33</sup> Cross-resistance mechanisms between different Cry toxins have been reported, presumably involving shared membrane receptors.<sup>34–36</sup>

In this context, the aim of the present study was to evaluate the effect of repeated contact between mosquito larvae and leaf litter containing *Bti* toxins on the evolution of resistance. *Aedes aegypti* larvae were selected in laboratory conditions with field-collected leaf litter containing *Bti* toxins. The resistance level was monitored over several generations. After 18 generations, the resistance levels of the selected and susceptible strains to (i) leaf litter containing *Bti* toxins, (ii) commercial complete *Bti* toxin mixture and (iii) each of the four main *Bti* toxins were compared in order to evaluate the impact of *Bti* persistence in the environment on the emergence of resistance mechanisms. These results will be discussed in the context of the potential massive and long-term use of *Bti* for mosquito control.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Toxic leaf litter containing *Bti* toxins

Leaf litter mainly composed of decayed *Alnus glutinosa* Gaertn., *Populus nigra* L. and *Quercus robur* L. leaves and containing large amounts of viable *B. thuringiensis* var. *israelensis* spores from previous mosquito control treatments was collected in August 1998 in the French Rhône-Alpes region.<sup>20</sup> This decayed leaf litter showed acute toxicity for mosquito larvae.<sup>19</sup> After collection, the leaf litter was air dried at 30 °C for 24 h, powdered on a 0.5 mm mesh, carefully homogenised and stored at –80 °C in sterile vials until used for mosquito larva selection and bioassays.

### 2.2 Mosquito strain selection

The *Ae. aegypti* laboratory strain Bora-Bora, susceptible to all insecticides, was used for selection with toxic leaf litter (LiTOX strain). Mosquitoes were reared in standard insectary conditions (27 °C, 8:12 h light:dark photoperiod, 80% relative humidity). Larvae were reared in tap water and fed with standard larval food (hay pellets), as described elsewhere,<sup>37–39</sup> until selection with toxic leaf litter. At each generation, 6000 third-instar larvae of the LiTOX strain were split into groups of 200 larvae and exposed to the toxic leaf litter in 200 mL of tap water. At each generation, the amount of leaf litter used for selection (from 10 to 500 mg L<sup>-1</sup>) was adapted to the LiTOX strain susceptibility in order to reach 70% larval mortality after 48 h of exposure. After selection, surviving larvae were transferred to tap water, fed with standard larval food and allowed to emerge as adults, reproduce, blood feed on mice and lay eggs for the next generation. An average introgression rate of 2.5% of susceptible Bora-Bora mosquitoes (adult males and females) at each generation was used in order to limit bottlenecks and genetic drift effects in the selected strain.

The average generation turnover was 45 days, and selection was carried out repeatedly for 18 generations.

### 2.3 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin production and purification

Recombinant *B. thuringiensis* var. *israelensis* strains transformed with the plasmids pHT606, pHT618, pHT652, pWF53 and pWF45 producing respectively the toxins Cry4A, Cry4B, Cry4A + Cry4B, Cry11 and Cyt1A were obtained from the Pasteur Institute, Paris, France,<sup>40,41</sup> or from Prof. B Federici.<sup>42,43</sup> Toxin suspensions were prepared in 100 mL sporulation medium under 200 rpm agitation at 30 °C for 72 h.<sup>44</sup> Spores and crystal inclusions were then harvested, washed with a solution of NaCl 1 M and EDTA 10 mM, washed again with distilled water, aliquoted and stored in water at –20 °C until use.

To check for the presence of recombinant plasmids and the absence of contaminants, all recombinant *B. thuringiensis* var. *israelensis* strain, sporulation medium culture and final toxin suspensions were tested by PCR amplification of genes encoding the toxins Cry4A, Cry4B, Cry11 and Cyt1A. PCR reactions were performed using 0.2 µM of the primers described in Tilquin *et al.*<sup>20</sup> under the following conditions: 95 °C for 10 min, 31 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 15 s, 72 °C for 45 s. Total genomic DNA was extracted from overnight culture of each recombinant strain using the DNeasy Tissue kit (Qiagen) according to the gram-positive bacteria protocol.

### 2.4 Bioassays

#### 2.4.1 Evolution of resistance to toxic leaf litter

To monitor the evolution of resistance to toxic leaf litter throughout the selection process, larval tolerance was monitored in six different generations as of the tenth generation for the LiTOX strain (generations 10, 12, 13, 15, 16 and 18) and in four generations for the susceptible Bora-Bora strain (generations 10, 12, 16 and 18). Larval tolerance was tested using the diagnostic dose of 30 mg L<sup>-1</sup> of toxic leaf litter according to the standard bioassay procedure described by the World Health Organisation.<sup>45</sup> Bioassays were performed in plastic cups containing 20 calibrated third- or early fourth-instar larvae in 50 mL of toxic leaf litter suspension or tap water for negative controls. All bioassays were performed at least in triplicate. The 'strain effect' (LiTOX or susceptible) and the 'generation number effect' (quantitative factor) on larval mortality were tested by means of a general linear model (GLM) with quasi-binomial error using R software v.2.5 (R Development Core Team, 2005).

#### 2.4.2 Differential resistance of the LiTOX strain to toxic leaf litter, commercial *Bti* mixture and individual *Bti* toxins

The relative resistance levels of the LiTOX strain to commercial *Bti* mixture (Vectobac WG<sup>®</sup>, 3500 ITU mg<sup>-1</sup>; International Toxic Units, Abbott Laboratories), toxic leaf litter and each separate *Bti* toxin, Cry4A, Cry4B, Cry4A + Cry4B, Cry11 and Cyt1A, were determined in comparison with the susceptible strain after 18 generations of selection using standard bioassays (see Section 2.4.1). A minimum of five concentrations producing a mortality rate from 0 to 100% after 24 h exposure were used. The lethal doses for 50 and 95% of individuals after 24 h exposure (LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub>) were calculated using the Log-Probit module of XLSTAT software (Addinsoft). The resistance ratio RR<sub>50</sub> (or RR<sub>95</sub>) of the LiTOX strain to each toxic mixture was calculated by dividing the LC<sub>50</sub> (or LC<sub>95</sub>) value obtained for the LiTOX strain by the LC<sub>50</sub> (or LC<sub>95</sub>) value obtained

for the Bora-Bora strain. The 95% confidence interval limits (95% CI) of  $RR_{50}$  (or  $RR_{95}$ ) were calculated by dividing the extreme 95% CI values of  $LC_{50}$  (or  $LC_{95}$ ) obtained for the LiTOX strain by those obtained for the Bora-Bora strain.

### 2.4.3 Interaction between leaf litter and Bti toxins

In order to determine the impact of possible interactions between leaf litter components and *Bti* toxins on larval mortality, the resistance levels of the LiTOX and Bora-Bora strains to *Bti* toxins were compared under four different dietary conditions: (1) toxic leaf litter; (2) commercial *Bti* mixture; (3) commercial *Bti* mixture mixed with non-toxic leaf litter; (4) commercial *Bti* mixture mixed with standard larval food (hay pellets). The non-toxic leaf litter was collected at a nearby untreated breeding site in the Rhône-Alpes region and was composed of similar leaf particles to the toxic leaf litter (identical tree leaf composition and decaying stage). In order to match the conditions experienced by larvae during artificial selection and bioassays with toxic leaf litter, a concentration of  $50 \text{ mg L}^{-1}$  of additional diet (non-toxic leaf litter or standard larval food) was added to the commercial *Bti* mixture. Bioassays with each type of diet were carried out simultaneously with at least four doses of commercial *Bti* mixture producing larval mortality ranging from 2.5 to 100% after 24 h exposure. Bioassays were replicated 4 times.

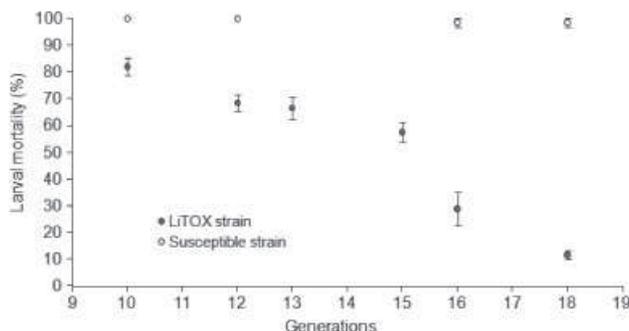
### 2.4.4 Phenotype modification associated with resistance to Bti toxins

During the LiTOX strain selection process, the authors identified a subset (approximately 25%) of LiTOX individuals exhibiting an increase of about 5 days in larval development time in comparison with other LiTOX individuals and the susceptible Bora-Bora strain. Slow-development LiTOX larvae were named LiTOX\_S. In previous bioassays, only normal LiTOX individuals were used and compared with the susceptible Bora-Bora strain. In order to evaluate the relation between this phenotypic trait (slow larval development) and resistance to *Bti* toxins, LiTOX\_S and normal LiTOX phenotype larvae were bioassayed comparatively with Bora-Bora larvae using the three Cry toxins for which the LiTOX strain showed significant resistance levels (Cry4A, Cry4B and Cry11A). Comparative bioassays were carried out as described above on third-stage larvae of similar body size (5 days older for LiTOX\_S). For each LiTOX phenotype, resistance ratios ( $RR_{50}$  and  $RR_{95}$ ) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated as described in Section 2.4.2.

## 3 RESULTS

### 3.1 Evolution of resistance to leaf litter containing Bti toxins

Larvae selected across successive generations with toxic leaf litter containing *Bti* toxins (LiTOX strain) acquired a significant level of resistance to this material over just a few generations (Fig. 1). The larval mortality of the selected LiTOX strain at the diagnostic dose of  $30 \text{ mg L}^{-1}$  of toxic leaf litter decreased from nearly 100% to 11.7% after only 18 generations of selection. Statistical analysis using a general linear model (GLM) revealed the significant effect of the strain ( $\chi^2 = 127.026$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) and of the generation number ( $\chi^2 = 63.382$ ,  $df = 5$ ,  $P < 0.001$ ) on larval mortality, confirming the progressive increase in resistance in the LiTOX strain. Even after 18 generations of selection, the increase in larval tolerance to the LiTOX strain to toxic leaf litter had not levelled off, suggesting that the selection of resistant allele(s) was incomplete and that a higher resistance level can be obtained over



**Figure 1.** Evolution of the resistance level of the LiTOX strain to toxic leaf litter during the selection process. Larval resistance was tested by comparative bioassays with fourth-stage larvae and a diagnostic dose of  $30 \text{ mg L}^{-1}$  toxic leaf litter. Mortality rates obtained for the Bora-Bora susceptible strain (white dots) and the LiTOX strain (grey dots) are indicated as mean  $\pm$  SE.

further generations of selection. After 18 generations of selection, the resistance ratio ( $RR_{50}$ ) of the LiTOX strain to toxic leaf litter was 3.4-fold higher than the resistance level of the susceptible strain Bora-Bora (Table 1).

### 3.2 Resistance to commercial Bti toxin mixture and to separate Bti toxins

After 18 generations of selection, the LiTOX strain exhibited a small but significant increase in resistance to commercial *Bti* toxin mixture (Table 1) with an  $RR_{50}$  of twofold. This resistance level was significantly lower than the resistance level measured for toxic leaf litter. The LiTOX strain was significantly resistant to all Cry toxins tested individually, with  $RR_{50}$  of 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold for Cry4A, Cry4B and Cry11 respectively. When Cry4A and Cry4B were tested in mixture, the resistance ratio of the LiTOX strain fell to sixfold and was significantly lower than the resistance ratio observed for Cry4A, but not significantly lower than that observed for Cry4B. Finally, a moderate but significant  $RR_{50}$  of threefold to Cyt1A was observed for the LiTOX strain compared with the susceptible Bora-Bora strain.

### 3.3 Impact of dietary particles on Bti resistance

The addition of either larval food or non-toxic leaf litter particles to commercial *Bti* toxin mixture for bioassays significantly reduced larval mortality in both strains (Table 2). However, none of the dietary particles had a significant effect on the resistance ratios observed between the LiTOX strain and the susceptible Bora-Bora strain, indicating that leaf litter has no specific effect on larval tolerance to *Bti*. Finally, the resistance level of the LiTOX strain to toxic leaf litter was slightly, but significantly, higher than for *Bti* alone or for *Bti* with additional diet particles, indicating that the relative amount of each *Bti* toxin may differ between the commercial *Bti* mixture and toxic leaf litter.

### 3.4 Impact of leaf litter selection on larval development time and resistance to Bti toxins

Resistance levels of LiTOX larvae exhibiting a slow larval development phenotype (LiTOX\_S larvae) to Cry toxins were compared with resistance levels obtained from normal LiTOX larvae (Fig. 2). Considering 95% confidence intervals of resistance ratios, no significant differences in resistance levels to Cry4B and Cry11A were found between the two LiTOX phenotypes. In

**Table 1.** Resistance level of the LiTOX strain to toxic leaf litter, *Bti* and individual *Bti* toxins<sup>a,b</sup>

	Susceptible LC <sub>50</sub> (95% CI)	LiTOX LC <sub>50</sub> (95% CI)	LiTOX RR <sub>50</sub> (95% CI)	Susceptible LC <sub>95</sub> (95% CI)	LiTOX LC <sub>95</sub> (95% CI)	LiTOX RR <sub>95</sub> (95% CI)
Toxic leaf litter	14.84 (13.73–16.01)	49.88 (46.38–53.77)	3.4 (2.9–3.9)	34.30 (30.30–40.22)	103.21 (91.39–120.78)	3.0 (2.2–4.0)
<i>Bti</i>	0.11 (0.10–0.12)	0.23 (0.21–0.25)	2.0 (1.8–2.3)	0.24 (0.22–0.27)	0.62 (0.53–0.77)	2.6 (1.9–3.5)
Cry4A	57.32 (41.60–82.93)	1731.93 (1039.30–3688.64)	30.2 (12.5–88.7)	1469.41 (745.29–3830.30)	88 395.51 (26187.23–674515.39)	60.2 (6.8–905.0)
Cry4B	4.39 (2.70–6.67)	60.03 (42.83–83.73)	13.7 (6.4–31.0)	604.49 (270.06–1956.16)	2394.33 (1253.47–5952.31)	4.0 (0.6–22.0)
Cry4A + B	1.37 (1.11–1.66)	8.28 (6.44–10.61)	6.0 (3.9–9.5)	12.28 (8.70–19.92)	209.30 (12.31–407.56)	17.0 (6.4–46.8)
Cry11	8.79 (7.31–11.08)	55.18 (48.29–63.87)	6.3 (4.4–8.7)	56.74 (36.30–112.05)	422.20 (308.047–636.39)	7.4 (2.7–17.5)
Cyt1A	118.07 (100.84–136.48)	359.65 (305.82–419.05)	3.0 (2.2–4.2)	573.50 (449.01–798.54)	2454.40 (1803.24–3772.12)	4.3 (2.3–8.4)

<sup>a</sup> Lethal concentrations LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> obtained for both strains simultaneously were used for calculating resistance ratios RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub> of the LiTOX Strain. LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> are expressed in mg L<sup>-1</sup> for toxic leaf litter and *Bti* and in µL per 50 mL for each individual toxin. 95% confidence interval (CI) limits of RR were calculated by dividing the extreme CI 95% values of lethal concentrations obtained for the LiTOX strain by those obtained for the susceptible strain.

<sup>b</sup> *Bti*: commercial *Bti* toxin mixture.

**Table 2.** Effect of dietary particles on resistance level of the LiTOX strain to *Bti*<sup>a,b</sup>

	Susceptible LC <sub>50</sub> (95% CI)	LiTOX LC <sub>50</sub> (95% CI)	LiTOX RR <sub>50</sub> (95% CI)	Susceptible LC <sub>95</sub> (95% CI)	LiTOX LC <sub>95</sub> (95% CI)	LiTOX RR <sub>95</sub> (95% CI)
Toxic leaf litter	7.97 (7.28–8.64)	28.10 (25.51–30.69)	3.5 (3.0–4.2)	15.96 (14.27–18.5)	64.69 (56.19–77.33)	4.1 (3.1–5.4)
<i>Bti</i>	0.10 (0.09–0.11)	0.20 (0.19–0.22)	2.0 (1.7–2.4)	0.32 (0.26–0.41)	0.58 (0.49–0.72)	1.8 (3.0–4.2)
<i>Bti</i> + non-toxic leaf litter	0.13 (0.12–0.15)	0.30 (0.28–0.33)	2.3 (1.9–2.8)	0.38 (0.32–0.48)	0.58 (0.50–0.72)	1.5 (1.9–2.8)
<i>Bti</i> + larval food	0.11 (0.11–0.12)	0.26 (0.24–0.28)	2.4 (2.0–2.5)	0.25 (0.22–0.29)	0.45 (0.41–0.52)	1.8 (2.0–2.5)

<sup>a</sup> Lethal concentrations LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> obtained for both strains simultaneously were used for calculating resistance ratios RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub> of the LiTOX Strain. LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> are expressed in mg L<sup>-1</sup>. 95% confidence interval (CI) limits of RR were calculated by dividing the extreme CI 95% values of lethal concentrations obtained for the LiTOX strain by those obtained for the susceptible strain.

<sup>b</sup> *Bti*: commercial *Bti* toxin mixture.

contrast, LiTOX\_S larvae were significantly less resistant to Cry4A than normal LiTOX larvae (1.6-fold versus 30.2-fold compared with the Bora-Bora strain), suggesting that the two LiTOX phenotypes have different genotypes regarding Cry4A resistance.

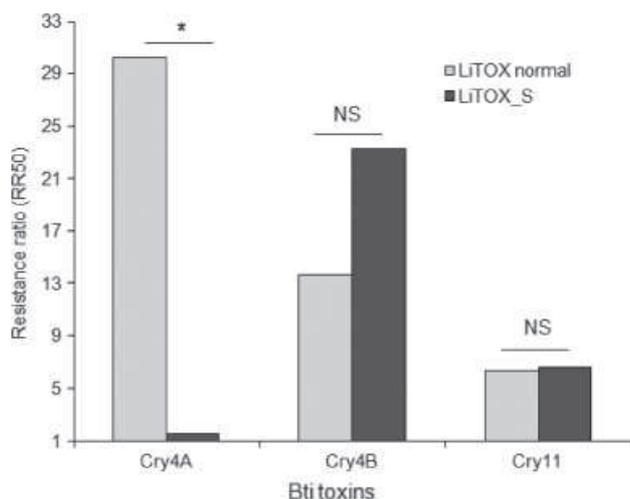
## 4 DISCUSSION

### 4.1 Selection of resistance to *Bti* toxins

Over the duration of the present controlled selection process, resistance of *Ae. aegypti* to *Bti* Cry toxins evolved after only a few generations of larval selection with toxic leaf litter containing *Bti* toxins. The LiTOX strain developed 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold resistance to Cry4A, Cry4B and Cry11 respectively.

The LiTOX strain developed resistance to distant Cry toxins: Cry4 and Cry11 toxins share less than 45% identity in amino acid sequences.<sup>10</sup> In addition, it developed a low but significant

resistance to Cyt1A toxin. To date, only low or unstable resistance to Cyt1A has been reported even after several generations of selection with *Bti*, and Cyt toxins are often considered to be the key proteins hindering the rapid development of resistance to full *Bti* mixture.<sup>14,27,46,47</sup> Cyt toxins can directly insert themselves into the midgut epithelium without binding to specific membrane receptors.<sup>48–50</sup> Furthermore, the Cyt1A loop β6-αE domain was described as a membrane-bound receptor to Cry11A, promoting the formation of a prepore oligomeric structure with Cry11A.<sup>12,51</sup> As a result, the binding of these two toxins together may (i) enhance the toxicity of Cry11A by multiplying the number of membrane receptors and (ii) reduce resistance linked to modifications in the sequence or the abundance of specific Cry11A receptors. Similar binding interactions are suspected between Cyt1A and Cry4 toxins, for which synergetic interactions have been observed.<sup>12</sup> Considering these synergistic interactions, it is



**Figure 2.** Resistance levels of LiTOX normal and LiTOX\_S larval phenotypes to the three Cry toxins. Lethal concentrations obtained for both phenotypes were used for calculating resistance ratios (RR<sub>50</sub>) compared with the susceptible strain. Resistance ratios of the two phenotypes to *Bti* toxins were considered significantly different (\*) when their respective 95% confidence intervals did not overlap. NS: not significantly different.

no surprise that the LiTOX strain showed higher resistance levels to separate Cry toxins compared with the commercial *Bti* mixture and toxic leaf litter, both likely to contain Cyt toxins. In this context, the LiTOX strain will constitute a significant biological resource for investigating molecular mechanisms and genes involved in resistance to *Bti* toxins in mosquitoes.<sup>52,53</sup>

#### 4.2 Interactions between Cry4A and Cry4B toxins

The LiTOX strain exhibited a higher resistance level to Cry4A (30.2-fold) than to Cry4B (13.7-fold), while its resistance level to Cry4A + Cry4B mixture decreased to sixfold, suggesting a synergism between Cry4A and Cry4B toxins. Synergic interactions between these two toxins have already been observed in *Ae. aegypti*, *Culex pipiens* L. and *Anopheles stephensi* Liston.<sup>13</sup> This study confirms that the mixture of the two Cry4 toxins lowers the expression of resistance of the LiTOX strain in comparison with individual Cry4 toxins.

About a quarter of the selected LiTOX strain individuals showed a slow larval development (LiTOX\_S) and exhibited resistance to Cry4B, but were not resistant to Cry4A. Several cross-resistance phenotypes to Cry toxins have been observed in insects.<sup>34,36,54</sup> A single autosomal recessive gene in the Lepidoptera *Plutella xylostella* L. confers resistance to three related Cry1A toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac).<sup>55</sup> Cross-resistance between even more distant Cry toxins has been described for the nematode *Caenorhabditis elegans* Maupas (Cry4B and Cry14A)<sup>34</sup> and the Lepidoptera *Heliothis virescens* F. (Cry1A and Cry2A).<sup>56</sup> In laboratory-selected strains of the mosquito *Cx. quinquefasciatus*, cross-resistance between Cry4A, Cry4B and cry4D was detected.<sup>57</sup> In the present study, no cross-resistance between Cry4A and Cry4B was observed for LiTOX\_S individuals, suggesting that two distinct resistance mechanisms are involved in the resistance of these individuals to these two toxins. Cross-resistance patterns between Cry toxins are complex and might be linked to the resistance mechanism involved. It has been suggested that a single modification in protease activities could confer cross-resistance to several Cry toxins.<sup>56,58</sup> Conversely, resistance linked

to modifications in binding sites appears to be more specific, and cross-resistance is therefore limited to closely related toxins.<sup>34,55,59,60</sup> In this context, the absence of cross-resistance between Cry4A and Cry4B observed in LiTOX\_S individuals may indicate that resistance to these two toxins is more likely to be linked to specific receptor binding than to protease activity.

In contrast, slow-developing LiTOX\_S larvae were as resistant to Cry11A as normal larvae, suggesting that no or limited cross-resistance occurs between Cry11A and Cry4A (Fig. 2). Cross-resistance between Cry4 and Cry11 toxins has been described in the mosquito *Cx. quinquefasciatus*.<sup>54</sup> Further experimental work is required to confirm these results and determine if cross-resistance between Cry4B and Cry11A occurs in the LiTOX strain.

#### 4.3 Monitoring *Bti* toxin resistance in natural populations

Resistances to Cry toxins are known to appear rapidly in Lepidopteran or Dipteran species when *Bt* treatments not containing Cyt toxins are applied.<sup>29,30</sup> In the present work it is shown that multiple resistances to Cry toxins in the mosquito *Ae. aegypti* can arise rapidly, even in the presence of Cyt toxins. In most studies investigating the emergence of resistance to *Bti* treatment in laboratory or under field conditions, only resistance to the complete *Bti* toxin mixture has been investigated.<sup>23–25,27</sup> The resistance ratio to commercial *Bti* observed in these studies is usually of the same order of magnitude as the RR<sub>50</sub> observed for the LiTOX strain (2–3-fold resistance),<sup>22,23,61</sup> suggesting that much higher resistance to individual toxins may have actually evolved in the populations tested. Considering that resistance to Cry toxins might act as a first step to resistance to full *Bti* toxin mixture, the present results highlight the importance of testing for each toxin individually in order accurately to monitor *Bti* toxin resistance evolution in field populations.

#### 4.4 Influence of leaf litter on *Bti* resistance

In the present study, the addition of larval food or leaf litter particles to *Bti* toxins for bioassays led to an increase in LC<sub>50</sub>, indicating a higher survival rate of larvae in the presence of dietary particles. Similarly, a decrease in *Bt* efficacy was found in the species *Choristoneura fumiferana* Clem. when larvae were given a high-quality diet rather than a poor-quality diet.<sup>62</sup> Indeed, larvae may compensate for the lower quality diet by increasing their food consumption and *Bt* toxin absorption.<sup>62</sup>

Furthermore, no variation in resistance level between the LiTOX and the susceptible strains was observed when larval food or non-toxic leaf litter was mixed with the commercial *Bti* toxin mixture. Many cases of insect–pathogen interactions influenced by plant compounds have been described.<sup>63</sup> For example, previous studies suggest that plant secondary compounds can affect the expression of resistance to *Btk* toxins in phytophagous insects.<sup>64–66</sup> Results suggest that in the present case there is no interaction between the toxicity of *Bti* toxins and leaf litter particles.

#### 4.5 Environmental consequences of *Bti* persistence

The *Ae. aegypti* LiTOX strain developed significant resistance to both Cry and Cyt toxins when using field-collected leaf litter containing *Bti* toxins as a selective agent, suggesting that both Cyt and Cry toxins are persistent in toxic leaf litter. However, the resistance level of the LiTOX strain to leaf litter was significantly higher than to the commercial *Bti* mixture, suggesting that the relative amount of each *Bti* toxin in the commercial *Bti* mixture compared with toxic leaf litter may differ. This is not surprising,

as the degradation of the different *Bti* toxins is likely to vary over time. Indeed, toxic leaf litter was collected several months after *Bti* treatment,<sup>19</sup> allowing sufficient time for toxins to exhibit differential persistence and degradation. A modification in toxin proportions could also lead to a decrease in their synergistic interactions. Furthermore, as the synergism between Cyt and Cry toxins is likely to circumvent resistance to Cry toxins,<sup>27,46,47</sup> a decrease in Cyt toxins in the environment may lead to the rapid emergence of resistance to Cry toxins. Although the emergence of multiple resistance mechanisms (i.e. several independent resistance mechanisms to different toxins) is considered likely to be delayed because all toxins are spread together,<sup>14,47,67</sup> the differential persistence of particular *Bti* toxins may favour the sequential selection of resistance to *Bti* toxins.

In this context it appears to be of primary importance to determine (i) the rate of occurrence of *Bti* persistence and proliferation in mosquito breeding sites, (ii) the specific biotic and abiotic conditions that allow these events to occur (substrate type, microflora, temperature and water-level variations, light exposure, etc.) and (iii) whether such events are specific to the forest breeding sites frequently found in the French Rhône-Alpes region or whether they may occur in other types of mosquito breeding site. Monitoring spatial and temporal variations in the quantity of *Bti* bacteria and its toxins in the environment together with resistance levels of mosquito populations will provide precious data to explain how resistance to this bacterial insecticide may emerge and evolve in natural conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Brian Federici for providing the *Bti* recombinant strains used in this work, and Joëlle Patoureau, Sébastien Boyer, Sophia Weeb, Marie Pireyre, Sylvie Veyrenc and Martin Paris for technical assistance. This study was supported by a grant from the French Rhône-Alpes region (grant 0501545401) and by the French National Research Agency (project ANR-08-CES-006-01 DIBBECO).

## REFERENCES

- Hemingway J and Ranson H, Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* **45**:371–391 (2000).
- Green M, Heumann M, Sokolow R, Foster LR, Bryant R and Skeels M, Public-health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis* – an epidemiologic study, Oregon, 1985–86. *Am J Public Health* **80**:848–852 (1990).
- Lacey LA and Siegel JP, Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria, in *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Applications*, ed. by Charles J-F, Delécluse A and Nielsen-LeRoux C. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 253–273 (2000).
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L and Ranson H, The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Ins Biochem Mol Biol* **34**:653–665 (2004).
- Nauen R, Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci* **63**:628–633 (2007).
- Lacey LA, *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Cont Assoc* **23**:133–163 (2007).
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C and Charles JF, Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol* **17**:377–380 (2001).
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, et al, Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:807 (1998).
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:775 (1998).
- de Maagd RA, Bravo A and Crickmore N, How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* **17**:193–199 (2001).
- Gill SS, Cowles EA and Pietrantonio PV, The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol* **37**:615–636 (1992).
- Perez C, Fernandez LE, Sun JG, Folch JL, Gill SS, Soberon M, et al, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:18 303–18 308 (2005).
- Poncet S, Delecluse A, Klier A and Rapoport G, Evaluation of synergistic interactions among the CryIva, CryIvb, and CryIvd toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J Invertebr Pathol* **66**:131–135 (1995).
- Wirth MC, Georghiou GP and Federici BA, CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:10 536–10 540 (1997).
- Charbonneau CS, Drobney RD and Rabeni CF, Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on nontarget benthic organisms in a lentic habitat and factors affecting the efficacy of the larvicide. *Environ Toxicol Chem* **13**:267–279 (1994).
- Thomas WE and Ellar DJ, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin – effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* **60**:181–197 (1983).
- De Respinis S, Demarta A, Patocchi N, Luthy P, Peduzzi R and Tonolla M, Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Lett Appl Microbiol* **43**:495–501 (2006).
- Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Orduz S and Lindow S, *B thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. *Microb Ecol* **55**:212–219 (2008).
- David JP, Rey D, Cuany A, Bride JM and Meyran JC, Larvicidal properties of decomposed leaf litter in the subalpine mosquito breeding sites. *Environ Toxicol Chem* **21**:62–66 (2002).
- Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P and Geremia R, Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE* **3**:e3432 (2008).
- Clements AN, *Biology of Mosquitoes*. Vol. 1. *Development, Nutrition, Reproduction*. Chapman and Hall, London/Glasgow/New York/Tokyo/Melbourne/Madras (1992).
- Becker N and Ludwig M, Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J Am Mosq Cont Assoc* **9**:221–224 (1993).
- Goldman IF, Arnold J and Carlton BC, Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Invertebr Pathol* **47**:317–324 (1986).
- Boyer S, Tilquin M and Ravanel P, Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? *Environ Toxicol Chem* **26**:157–162 (2007).
- Paris M, Boyer S, Bonin A, Collado A, David J and Despres L, Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection to insecticide treatment. *Molec Ecol* **19**:325–337 (2010).
- Paul A, Harrington LC, Zhang L and Scott JG, Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J Am Mosq Control Assoc* **21**:305–309 (2005).
- Georghiou GP and Wirth MC, Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl Environ Microbiol* **63**:1095–1101 (1997).
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL and Zahran HM, Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J Appl Entomol/Z Angew Entomol* **127**:29–32 (2003).
- Ferre J and Van Rie J, Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* **47**:501–533 (2002).
- Griffitts JS and Aroian RV, Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* **27**:614–624 (2005).
- Bravo A, Gill SS and Soberon M, Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol* **49**:423–435 (2007).

- 32 Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, et al, Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:5004–5009 (2003).
- 33 Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D and McGaughey WH, Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem* **272**:23 473–23 476 (1997).
- 34 Griffiths JS, Whitacre JL, Stevens DE and Aroian RV, Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* **293**:860–864 (2001).
- 35 Siqueira HAA, Moellenbeck D, Spencer T and Siegfried BD, Cross-resistance of CryIAb-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J Econ Entomol* **97**:1049–1057 (2004).
- 36 Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Cao J, Earle ED and Shelton AM, Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIc. *J Econ Entomol* **94**:1547–1552 (2001).
- 37 David J-P, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A, et al, Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* **11**:216 (2010).
- 38 Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J and David JP, Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Ins Biochem Mol Biol* **38**:540–551 (2008).
- 39 Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H and David JP, Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquat Toxicol* **93**:61–69 (2009).
- 40 Delecluse A, Poncet S, Klier A and Rapoport G, Expression of CryIva and CryIvb genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **59**:3922–3927 (1993).
- 41 Poncet S, Anello G, Delecluse A, Klier A and Rapoport G, Role of the CryIvd polypeptide in the overall toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **59**:3928–3930 (1993).
- 42 Wu D and Federici BA, A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **175**:5276–5280 (1993).
- 43 Wu D, Johnson JJ and Federici BA, Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIvd proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **13**:965–972 (1994).
- 44 Lecadet MM, Blondel MO and Ribier J, Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var *berliner*-1715 using bacteriophage-Cp-54ber. *J General Microbiol* **121**:203–212 (1980).
- 45 Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13, WHO, Geneva, Switzerland (2005).
- 46 Wirth MC, Park HW, Walton WE and Federici BA, Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol* **71**:185–189 (2005).
- 47 Wirth MC, Walton WE and Delecluse A, Deletion of the Cry11A or the Cyt1A toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*: effect on toxicity against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Inverteb Pathol* **82**:133–135 (2003).
- 48 Butko P, Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol* **69**:2415–2422 (2003).
- 49 Manceva SD, Pusztai-Carey M, Russo PS and Butko P, A detergent-like mechanism of action of the cytolitic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry* **44**:589–597 (2005).
- 50 Promdonkoy B and Ellar DJ, Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolitic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J* **374**:255–259 (2003).
- 51 Perez C, Munoz-Garay C, Portugal LC, Sanchez J, Gill SS, Soberon M, et al, *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* **9**:2931–2937 (2007).
- 52 Bonin A, Paris M, Despres L, Tetreau G, David JP and Kilian A, A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection. *BMC Genomics* **9**:459 (2008).
- 53 Bonin A, Paris M, Tetreau G, David JP and Despres L, Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations. *BMC Genomics*; **10**:551 (2009).
- 54 Wirth MC, Delecluse A, Federici BA and Walton WE, Variable cross-resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **64**:4174–4179 (1998).
- 55 Tabashnik BE, Liu YB, Finson N, Masson L and Heckel DG, One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:1640–1644 (1997).
- 56 Gould F, Martinezramirez A, Anderson A, Ferre J, Silva FJ and Moar WJ, Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:7986–7990 (1992).
- 57 Wirth MC and Georghiou GP, Cross-resistance among CryIV toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol* **90**:1471–1477 (1997).
- 58 Rukmini V, Reddy CY and Venkateswerlu G, *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**:109–116 (2000).
- 59 Abdullah MAF, Valaitis AP and Dean DH, Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem* **7**:16 (2006).
- 60 Pigott CR and Ellar DJ, Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:255–281 (2007).
- 61 Zhang HY, Yang CJ, Huang JY and Lu L, Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Biocont Sci Technol* **14**:321–325 (2004).
- 62 Bauce E, Bidon T and Berthiaume R, Effects of food nutritive quality and *Bacillus thuringiensis* on feeding behaviour, food utilization and larval growth of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) when exposed as fourth- and sixth-instar larvae. *Agric Forest Entomol* **4**:57–70 (2002).
- 63 Cory JS and Hoover K, Plant-mediated effects in insect–pathogen interactions. *Trends Ecol Evolut* **21**:278–286 (2006).
- 64 Janmaat AF and Myers JH, Host-plant effects the expression of resistance to *Bacillus thuringiensis kurstaki* in *Trichoplusia ni* (Hubner): an important factor in resistance evolution. *J Evol Biol* **20**:62–69 (2007).
- 65 Ludlum CT, Felton GW and Duffey SS, Plant defenses – chlorogenic acid and polyphenol oxidase enhance toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* to *Heliothis zea*. *J Chem Ecol* **17**:217–237 (1991).
- 66 Navon A, Hare JD and Federici BA, Interactions among *Heliothis virescens* larvae, cotton condensed tannin and the CryIa(C) delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Chem Ecol* **19**:2485–2499 (1993).
- 67 Zhao JZ, Cao J, Li YX, Collins HL, Roush RT, Earle ED, et al, Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnol* **21**:1493–1497 (2003).



## Article IV

---

**Transcription profiling of resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing.**

PARIS, M., MELODELIMA, C., COISSAC, E., TETREAU, G., REYNAUD, S., DAVID, J. P., DESPRES, L.

*Journal of Invertebrate Pathology*. 109:2, 201-208 (2012)





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)

## Transcription profiling of resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing <sup>☆</sup>

Margot Paris <sup>a,b</sup>, Christelle Melodelima <sup>a</sup>, Eric Coissac <sup>a</sup>, Guillaume Tetreau <sup>a</sup>, Stephane Reynaud <sup>a</sup>, Jean-Philippe David <sup>a</sup>, Laurence Despres <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR 5553 CNRS-Université de Grenoble, France

<sup>b</sup> Plant Ecological Genetics, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Switzerland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 September 2011

Accepted 5 November 2011

Available online 16 November 2011

## Keywords:

Mosquitoes

*Aedes aegypti**Bacillus thuringiensis* var. *israelensis**Bti*

Resistance

Insecticides

Toxins

Next-generation sequencing

## ABSTRACT

The control of mosquitoes transmitting infectious diseases relies mainly on the use of chemical insecticides. However, resistance to most chemical insecticides threatens mosquito control programs. In this context, the spraying of toxins produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in larval habitats represents an alternative to chemical insecticides and is now widely used for mosquito control. Recent studies suggest that resistance of mosquitoes to *Bti* toxin may occur locally but mechanisms have not been characterized so far. In the present study, we investigated gene transcription level variations associated with *Bti* toxin resistance in the mosquito *Aedes aegypti* using a next-generation sequencing approach. More than 6 million short cDNA tags were sequenced from larvae of two strains sharing the same genetic background: a *Bti* toxins-resistant strain and a susceptible strain. These cDNA tags were mapped with a high coverage (308 reads per position in average) to more than 6000 genes of *Ae. aegypti* genome and used to quantify and compare the transcription level of these genes between the two mosquito strains. Among them, 86 genes were significantly differentially transcribed more than 4-fold in the *Bti* toxins resistant strain comparatively to the susceptible strain. These included gene families previously associated with *Bti* toxins resistance such as serine proteases, alkaline phosphatase and alpha-amylase. These results are discussed in regards of potential *Bti* toxins resistance mechanisms in mosquitoes.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mosquito control represents a major public health challenge, as mosquitoes transmit several human diseases including malaria, filariasis and dengue fever. Since the fifties, the massive use of chemical insecticides has led to undesired toxicity on non-target organisms and the selection of insecticide resistance mechanisms in mosquito populations (Hemingway and Ranson, 2000; Nauen, 2007). The spraying of toxins produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito breeding sites represents a safe alternative to chemical insecticide and is now widely

used for mosquito control (Lacey, 2007; Regis et al., 2001). During sporulation, *Bti* bacteria produce a solid parasporal crystal composed of four main insecticidal toxins specific to dipterans: Cry4A, Cry4B, Cry11A and Cyt1A (Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998). When ingested by mosquito larvae, the crystal is first dissolved by the alkaline pH of insects gut. Then proteases convert the inactive crystal into active toxins which interact with midgut cell membranes leading to the formation of pores, cell lysis, septicemia and larvae death (de Maagd et al., 2001).

In natural mosquito populations, no consistent resistance has been detected even after long-lasting treatments with *Bti* toxins (Becker and Ludwig, 1993; Goldman et al., 1986). However recent studies suggest that *Bti* toxin resistance may occur locally (Boyer et al., 2007; Paris et al., 2010; Paul et al., 2005). Although resistance mechanisms to *Bti* toxins have not been well characterized yet in mosquitoes, resistance to Cry toxins has been intensively studied in lepidopteran insects resistant to transgenic crops producing *B. thuringiensis* Cry toxins. To date, the two main mechanisms described for resistance to Cry toxins are (i) a decreased activity of midgut proteases involved in toxin activation and (ii) modifications of membrane receptors of toxins, including cadherins, alkaline phosphatases and aminopeptidases (Bravo et al., 2007;

<sup>☆</sup> Data deposition: Next-generation sequencing data and cDNA library informations associated to the present study have been deposited at the EMBL-EBI European Read Archive (ERA) under accession number ERA000115 and are freely accessible at <ftp://ftp.era-xml.ebi.ac.uk/ERA000>. All gene accession numbers mentioned in the present manuscript are compatible with Ensembl, NCBI-GenBank and Vectorbase (<http://aaegypti.vectorbase.org>) genome databases.

\* Corresponding author. Address: Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR 5553 CNRS-Université de Grenoble, Domaine Universitaire de Saint-Martin d'Hères, 2233, rue de la piscine Bât D Biologie, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. Fax: +33 (0) 4 76 51 42 79.

E-mail address: [laurence.despres@ujf-grenoble.fr](mailto:laurence.despres@ujf-grenoble.fr) (L. Despres).

Gahan et al., 2001; Herrero et al., 2005; Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Morin et al., 2003). Other putative resistance mechanisms have been described in insects. Mitogen-activated protein kinase pathways and innate immunity responses have also been suggested to contribute to *B. thuringiensis* tolerance in mosquitoes, worms and moths (Dimopoulos et al., 2000; Huffman et al., 2004; Rahman et al., 2004).

Recently, a laboratory strain of the mosquito *Aedes aegypti* resistant to *Bti* Cry toxins has been obtained by feeding larvae with toxic leaf litter containing *Bti* toxins over several generations (Paris et al., 2011b). This strain, named LiTOX strain, represents valuable biological material for investigating resistance mechanisms of *Bti* toxins in mosquitoes (Bonin et al., 2009; Paris et al., 2011a). In this context, the present study aims at comparing the transcription profile of the LiTOX strain and its parental susceptible strain at the larval stage and identifying genes potentially involved in *Bti* toxins resistance. To achieve this, we opted for the digital gene expression tag profiling (DGETP), a method already successfully used for transcription profiling in human (Asmann et al., 2009) and in model and non-model species of plants or animals (Obermeier et al., 2009; David et al., 2010; Wang et al., 2010; Xiang et al., 2010; Xue et al., 2010). This approach is a combination of LongSAGE and Solexa/Illumina sequencing, leading to the sequencing of millions short cDNA tags on a defined region of genes and allowing to quantify the transcription level of genes. These results are then discussed in regards of potential resistance mechanism of mosquitoes to *Bti* toxins.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mosquito strains

The *Ae. aegypti* laboratory strain Bora–Bora susceptible to all insecticides was used for selection at the larval stage with leaf litter containing *Bti* toxins (LiTOX strain) as described in Paris et al. (2011b). At each generation, an average of 6000 larvae was exposed to toxic leaf litter with 70% average mortality rate after 48 h exposure. At each generation, an introgression of 2.5% Bora–Bora mosquitoes (adult males and females) was performed in order to limit bottlenecks and genetic drift effects in the selected strain. After 18 generations of selection, the LiTOX strain showed a significant elevated resistance to *Bti* toxins (Paris et al., 2011b). Larval bioassays revealed high resistance to all Cry toxins tested individually with resistance ratios at the LC<sub>50</sub> (RR<sub>50</sub>) of 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold for Cry4A, Cry4B and Cry11A respectively. The LiTOX strain also showed moderate resistance to the Cyt1A toxin and to the whole commercial *Bti* mixture with RR<sub>50</sub> of 3.0-fold and 2.0-fold respectively.

### 2.2. Sample preparation

Three independent batches of 100 larvae from each strain were reared in identical conditions as described above. After 5 days (4th instar larvae), 30 fresh larvae from each batch were used for total RNA extraction using the PicoPure™ RNA isolation kit according to manufacturer's instructions (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Total RNA quality and quantity were controlled on a Nanodrop ND1000 (LabTech, East Sussex, UK) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA USA) before dilution to 750 ng/μL in nuclease-free water. For each strain, total RNAs from the 3 biological replicates were then pooled together in equal proportions.

### 2.3. Preparation of double stranded cDNA tag libraries

One cDNA library for each strain was prepared from pools of total RNAs as described in David et al. (2010). Two μg total RNA were

used to isolate mRNAs by using magnetic oligo(dT) beads before cDNA synthesis using superscript II (Invitrogen) at 42 °C for 1 h. Second strand cDNAs were then synthesized and mRNAs were removed. Double stranded cDNAs were cleaved at DpnII restriction sites (5'–<sup>1</sup>GATC–3') and fragments attached to the oligo(dT) beads on their 3' end were purified. Gene expression (GEX) adapters 1 were ligated to the DpnII cleavage sites using T4 DNA ligase (Invitrogen). Double stranded cDNAs containing both GEX adapters 1 and oligo(dT) beads were then digested with Mmel for 1.5 h at 37 °C to generate 20 bp double stranded cDNA tags. These tags were purified before ligating GEX adapters 2 at the Mmel cleavage site using T4 DNA ligase. The adapter-ligated cDNA tag library was then enriched by PCR with two primers annealing to the end of GEX adapters and Phusion DNA polymerase (Finnzymes). PCR cycles were 30 s at 98 °C followed by 15 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 60 °C, 15 s at 72 °C and a final elongation step of 10 min at 72 °C. Enriched cDNA tag library was then gel-purified before quality control analysis on an Agilent 2100 Bioanalyzer.

### 2.4. Sequencing and mapping of cDNA tags to mosquito genome

Each cDNA tag library was sequenced as 20-mers on a separated flow cell lane using a Genome Analyzer I (Illumina Corporation, USA). Sequenced cDNA tags were mapped to the *Ae. aegypti* genome assembly (AeGL 1.1 annotation) using TagMatcher. TagMatcher is based on the short sequence mapping algorithm 'agrep' (Wu and Manber, 1992) and allows matching tags to a reference genome with errors and multiple matching loci (software is available on request to eric.coissac@inrialpes.fr). After mapping to *Ae. aegypti* genome, only tags without ambiguous nucleotides and mapped with 0 or 1 mismatch at a unique genomic location were kept for clustering and differential transcription analysis. To avoid possible bias due to incomplete 3' UTR annotation and because most cDNA tags were expected on the 3' side of genes (David et al., 2010), cDNA tags were considered to be 'within' a gene if located between the 5' boundary of a gene and its 3' boundary extended by 300 bp.

### 2.5. Clustering and differential transcription analysis

In order to collect transcription data from distinct tags matching to a unique transcript or a unique genomic locus without *a priori* knowledge of genome annotation, we clustered tags previously mapped to *Ae. aegypti* genome. Two distinct tags were assigned to a single cluster if (i) tags were found on the same DNA strand and genomic supercontig, (ii) tags were separated by less than 500 bp and (iii) the total number of reads across all conditions was higher for the tag located downstream (3' side) than for the tag located upstream (5' side). The later condition was adopted in order to take in account the effect of partial DpnII digestion of cDNAs during cDNA library preparation, leading to multiple tags located on a single transcript with decreasing number of reads toward the 5' direction (David et al., 2010).

Differential analysis of transcription levels between the susceptible Bora–Bora strain and the *Bti*-resistant LiTOX strain was performed at the gene level for cDNA tags mapped within predicted genes (i.e. gathering all tags mapped within each gene) and at the cluster level for cDNA tags not mapped within predicted genes (i.e. gathering all tags mapped within each cluster). Transcription ratios (TR) were calculated by dividing the number of reads per million (RPM) obtained from the LiTOX strain by the number of RPM obtained from the Bora–Bora strain following the formula:  $TR = [(RPM_{\text{treated}+x}) / (RPM_{\text{controls}+x})]$ , where  $x$  is a pseudocount equal to 0.2 (approximately 1 read per million per condition) introduced to allow estimating TRs for genes represented by reads in only one strain. Then, the probability of each gene or genomic cluster to be

differentially transcribed in either direction between LiTOX and Bora–Bora strains was computed from raw read counts, taking into account library size. This computation was performed using Fisher's noncentral hypergeometric distribution law to allow computation of  $P_{\text{value}}$  for a ratio different of one (Fisher, 1935) with the function `fisher.test` in R software version 2.5 (R Development Core Team, 2005). Holm correction was then applied to multiple test procedure. Only genes/clusters showing an adjusted  $P_{\text{value}} < 10^{-3}$  and a TR > 4-fold in either direction were considered differentially transcribed between the LiTOX strain and the susceptible strain Bora–Bora.

### 2.6. Identification of biological functions differentially transcribed in the LiTOX strain

Because the Gene Ontology (GO) annotation of *Ae. aegypti* genome is still incomplete (less than 9500 genes annotated with GO terms over 15,988 predicted genes), we manually annotated the 'biological function' of all genes detected in the present study. Genes were assigned to ten categories according to their putative function: proteases; kinases/phosphatases; other enzymes; receptors; transport; DNA interaction; cytoskeleton; ribosomal proteins; others and unknown function. For each category, the proportion of genes over- and under-transcribed was compared to the proportion of all detected genes.

## 3. Results

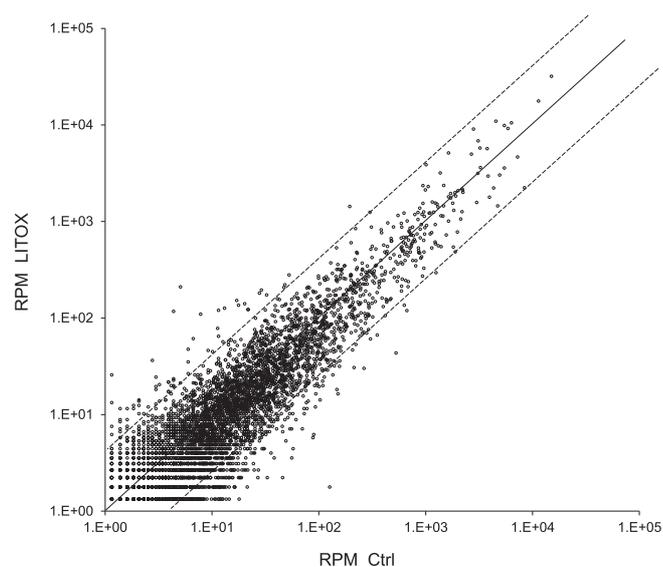
### 3.1. Sequencing, mapping and clustering of cDNA tags

By sequencing 2 cDNA tag libraries from 5 days old mosquito larvae of the susceptible strain Bora–Bora and the *Bti*-resistant strain LiTOX, a total of 6597,945 reads corresponding to 214,822 distinct 20-mer tags were obtained (Table 1). Among them, 16,734 distinct tags were successfully mapped onto the *Ae. aegypti* genome at a unique genomic location with 0 or 1 mismatch, representing 46.8% of all the reads. Only clusters represented by 5 or more tags were used for further analyses. Among them, 11,401 distinct tags were mapped to 6038 predicted genes, including 138 candidate genes for *Bti* toxin resistance: 101 serine proteases and 37 potential Cry toxin binding proteins (5 cadherins, 6 alkaline phosphatases, 15 aminopeptidases and 11 alpha-amylases). The remaining 5333 tags were mapped outside gene boundaries in 4278 genomic clusters. The coverage across genes and clusters was high (mean = 308) with 99% of genes/clusters being represented by 5–4700 reads (Fig. S1).

### 3.2. Global transcription profiling

Analysis of transcription levels in mosquito larvae of the *Bti*-resistant LiTOX strain and of the susceptible Bora–Bora strain was performed at the gene level for tags mapped within predicted genes by gathering all tags mapped within each gene. Comparing the number of reads per million (RPM) for each gene between the two strains revealed that most genes are represented by 10–350 RPM with several genes showing more than 2000 RPM (Fig. 1). Although transcription ratios of genes represented by few reads are more variable, normalization appeared accurate with most genes showing less than 4-fold difference of transcription level between the two strains.

Statistical analysis of transcription levels between the *Bti*-resistant LiTOX strain and the susceptible strain identified 86 genes significantly under- or over-transcribed more than 4-fold in the LiTOX strain (Table 2 and Table S1). When considering genes detected in both strains, transcription ratios (TRs) ranged from 40-fold



**Fig. 1.** Global distribution of reads between the two strains. Normalized read numbers are indicated for each gene as reads per million (RPM) for each strain (log scale). Solid line represents equal RPM between the two strains. Dashed lines represent a 4-fold RPM difference in either direction.

**Table 1**

Number of sequencing reads and distinct tags obtained from each strain.

Reads <sup>a</sup>	Ctrl ( $\times 10^6$ )	LiTOX ( $\times 10^6$ )	Mean ( $\times 10^6$ )	Total reads ( $\times 10^6$ )	% Total reads	Distinct tags	% Distinct tags
Sequenced	4.44	2.25	3.35	6.60	100	214822	100
Sequences containing N	0.00	0.01	0.01	0.02	0.3	7515	3.5
Filtered from background	4.14	2.13	3.14	6.28	93.8	34508	16.1
No match to <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> genome	0.29	0.14	0.22	0.43	6.4	8757	4.1
Match to several locations in the <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> genome	1.79	0.92	1.35	2.71	40.5	9017	4.2
Unambiguously mapped to the genome	2.06	1.07	1.57	3.13	46.8	16734	7.8
Mapped to genes	1.70	0.89	1.30	2.59	38.7	11401	5.3
Mapped out of genes	0.36	0.18	0.27	0.54	8.1	5333	2.5

<sup>a</sup> Reads filtered from background represent tags showing at least 5 reads across both libraries. Reads unambiguously mapped to genome represent tags mapped to a unique genomic location with 0 or 1 mismatch. Reads mapped to genes are represented by reads located between the 5' boundary of a gene and its 3' boundary extended by 300 bp.

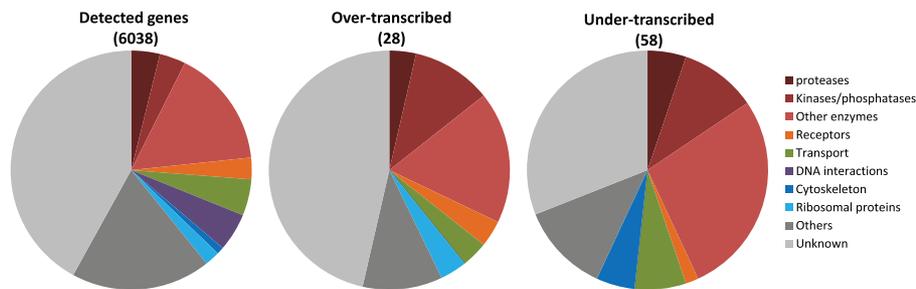
under-transcription to 115-fold over-transcription compared with controls. Allocating pseudoreads to the 6 genes represented by reads in only one strain (see methods) allowed estimating their TRs. This estimation led to high TR values ranging from 1366-fold under-transcription to 1789-fold over-transcription.

### 3.3. Biological functions differentially transcribed in the LiTOX strain

Functional analysis revealed that genes belonging to all the ten categories except the "DNA interactions" function were differentially transcribed in resistant compared to susceptible larvae (Fig. 2). Seven categories contained both over- and under-transcribed genes, while no ribosomal protein genes were under-transcribed, and no cytoskeleton genes were over-transcribed. Only few biological functions appeared over-represented by genes

**Table 2**  
Genes significantly differentially transcribed in the LiTOX strain.

Genes/clusters	N	% Total	Detected in both strains				Detected in one strain only			
			N	Mean TR	Mediane TR	Max TR	N	Mean TR	Mediane TR	Max TR
Total genes	6038									
Differentially transcribed genes	86	1.42	80	–	–	–	6	–	–	–
Over-transcribed genes	28	0.46	26	9.5	6.9	40.1	2	929.5	929.5	1789
Under-transcribed genes	58	0.96	54	10.4	6.0	114.7	4	441.2	156.9	1366



**Fig. 2.** Biological functions represented by genes differentially transcribed in the LiTOX strain. For each pie chart, the number of genes considered is indicated within brackets. Genes were assigned to 10 different categories according to their putative biological function: proteases (dark red), kinases/phosphatases (red), other enzymes (light red), receptors (orange), transport (green), DNA interactions (purple), cytoskeleton (dark blue), ribosomal proteins (light blue), others (dark grey) and unknown (light grey). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

significantly differentially transcribed in the LiTOX strain (Fig. 2). Among them, 31–46% of genes were not functionally annotated (unknown) and up to 12% were not allocated to any of our ten functional categories (others). Among annotated genes, kinases/phosphatases were slightly over-represented in both over- and under-transcribed genes (11% and 10% respectively compared to 3% in all detected genes). Enzymes other than proteases or phosphatases/kinases were strongly over-represented within under-transcribed genes (28% compared to 16%). Finally, genes encoding protein involved in cytoskeleton appeared slightly over-represented within under-transcribed genes (5% compared to 1% in all detected genes).

#### 3.4. Genes highly differentially transcribed in the LiTOX strain

Among the 28 genes significantly over-transcribed in the LiTOX strain compared to the susceptible strain, only 15 were assigned to a putative function (Table 3 and Table S1). All of them were detected in both strains allowing the calculation of true TR. Among them, the gene AEEL006542 encoding a serine carboxypeptidase showed the highest TR (14-fold). Two genes encoding two different serine/threonine kinases were also highly over-transcribed (AEEL002004 10-fold and AEEL002029 9.5-fold). Among other enzymes, the gene AEEL010694 encoding a cyclo-ligase showed a high TR (9-fold). Finally, other genes were highly over-transcribed in the LiTOX strain including the ubiquinone binding protein AEEL005143, the ATP synthase AEEL006509 and the cytoplasmic dynein AEEL012234 (from 6.5-fold to 7.4-fold).

Among the 58 genes significantly under-transcribed in the LiTOX strain, 40 were assigned to a putative function, including 3 proteases, 6 kinases/phosphatases, 16 other enzymes, 1 receptor, 4 transporters and 3 cytoskeleton proteins (Table 4 and Table S1). Among them, 3 genes encoding 2 enzymes and 1 cuticle protein were not detected in the LiTOX strain and therefore showed strong estimated TRs. Among genes detected in both strains, the serine/threonine kinase AEEL005711 showed the highest TR (–115-fold) followed by the microsomal glutathione S-transferase AEEL006829 (–21.5-fold), the serine/threonine kinase AEEL005710 (–15-fold) and the ribophorin AEEL013071 (–15-fold). Within proteases, the

serine-type endopeptidase AEEL008218 was highly under-transcribed (–12-fold). Among other enzymes, the aldehyde dehydrogenase AEEL010764, the peroxiredoxin AEEL007135, the glycogen synthase AEEL004221 and the chitinase AEEL008040 also showed high TRs (from –8.7-fold to –10.2-fold).

## 4. Discussion

### 4.1. Investigating transcriptome variations using digital gene expression tag profiling

By using the digital gene expression tag profiling method (DGETP), we sequenced 6.6 million 20-mer tags across two distinct cDNA libraries obtained from 3rd-stage larvae of two *Ae. aegypti* strains. This approach allowed us to detect a significant transcription signal for 6038 predicted genes representing 38% of annotated genes. Such moderate number of detected genes can be explained by several technical or biological causes. First, several genes may not be transcribed in 3rd-stage larvae, or may exhibit such low transcription levels that our transcriptome coverage was insufficient to distinguish them from background. Such aspect can be improved by replicating sequence libraries for each strain. Furthermore, replicating sequence libraries would allow assessing technical variation and limiting false positive detection (Auer and Doerge, 2010). Second, transcripts assayed by the DGETP method require the presence of a DpnII restriction site (5'-<sup>1</sup>GATC-3'), and transcripts not carrying this restriction site cannot be detected. Third, genome variations between the strains used in our study and the genome-sequenced strain (Liverpool strain) could decrease the number of tags successfully mapped to the reference genome. In our study, tags were mapped to the reference genome with a maximum of 1 mismatch. Allowing more mismatches in such short sequences resulted in the mapping of more tags in several genome locations which already represented more than 40% of our reads. Such limitation is now being tackled by more recent sequencing approaches based on longer reads such as RNA sequencing. Nonetheless, considering the cost of DGETP and the number of sequences obtained at the time of the study, the coverage appeared satisfactory. Among the 3.13 million cDNA tags successfully

**Table 3**  
Genes of known function significantly over-transcribed in the LiTOX strain.

Gene	Description	Ctrl RPM	LiTOX RPM	TR (fold)	Adjusted P value	TR type
<i>Proteases</i>						
AAEL006542	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	7.8	109.7	13.7	5.8E–36	True
<i>Kinases-phosphatases</i>						
AAEL002004	Protein serine/threonine kinase	11.5	120.4	10.3	1.0E–32	True
AAEL002029	Protein serine/threonine kinase	13.1	126.6	9.5	2.2E–32	True
AAEL014958	Galactokinase	12.7	56.9	4.4	8.0E–04	True
<i>Other enzymes</i>						
AAEL010694	5-Formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	6.7	61.3	9.0	7.0E–14	True
AAEL005647	Serine collagenase 1 precursor	29.0	195.5	6.7	7.1E–36	True
AAEL005610	Mitochondrial ATP synthase b chain	11.5	64.9	5.6	7.3E–08	True
AAEL002183	Oligosaccharyl transferase	32.4	173.7	5.3	8.2E–23	True
AAEL000044	Ornithine decarboxylase	52.7	279.5	5.3	2.3E–37	True
<i>Receptors</i>						
AAEL005143	Ubiquinone binding protein	194.2	1431.5	7.4	2.3E–303	True
<i>Transport</i>						
AAEL006509	Hydrogen-transporting ATP synthase	27.8	181.3	6.5	1.0E–31	True
<i>Ribosomal</i>						
AAEL006860	Ribosomal protein S28	9.2	46.2	4.9	9.3E–04	True
<i>Others</i>						
AAEL012234	Cytoplasmic dynein intermediate chain	11.3	78.2	6.8	1.6E–13	True
AAEL009367	Myelin proteolipid	46.9	207.0	4.4	4.8E–19	True
AAEL003239	Pupal cuticle protein	300.4	1247.1	4.1	2.4E–109	True

mapped to *Ae. aegypti* genome, 17% were not located within predicted gene boundaries. These tags could be gathered into 4278 genomic clusters with more than 16.7% of them showing a significant transcription signal of >100 reads (not shown). As suggested by David et al. (2010), these clusters may represent genes, exons or UTR extensions not predicted by automated annotation but also pseudogenes or non-coding RNAs with polyadenylated sequences.

Due to its high reproducibility and the possibility to detect low-abundance transcripts, RNA sequencing using next generation sequencing represents a powerful technology enabling extensive investigation of gene expression profiles in model and non-model species. A high reproducibility of the DGTEP results was observed in human between technical or biological replicates on the same or different flow cells runs with a correlations between technical replicates >0.97 (Asmann et al., 2009). The reliability of DGTEP results was also demonstrated using real time quantitative PCR (RT-qPCR) validation on plants (Obermeier et al., 2009), fishes (Xiang et al., 2010), insects (Xue et al., 2010; David et al., 2010), mammals (Wang et al., 2010) or humans (Asmann et al., 2009). Furthermore, a good correlation between the DGTEP method and RT-qPCR was observed in *Ae. aegypti* samples sequenced in the same flow cell run as our LiTOX strain and using the same susceptible strain as reference (David et al., 2010), underlying the accuracy of this method for the detection of differential gene expression linked to the resistance of *Bti* insecticide.

#### 4.2. Transcription variations associated with resistance to *Bti* toxins

The LiTOX strain was obtained after 18 generations of selection with natural leaf litter containing *Bti* toxins. This strain exhibits a moderate resistance to whole commercial *Bti* toxins mixture and Cyt1A toxin but a high resistance to all Cry toxins with RR<sub>50</sub> of 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold for Cry4A, Cry4B and Cry11A respectively (Paris et al., 2011b). Transcription level variations of 6038 genes were investigated by the DGTEP method between the LiTOX strain and the susceptible strain in 3rd-stage larvae. This global screening approach identified 86 genes over- or under-transcribed more than 4-fold in either direction in the LiTOX strain. Among them, enzymes belonging to different families and proteins involved in cytoskeleton were over-represented compared to their proportion in all detected genes. This analysis allowed the

comparison of the transcription level of 138 candidate genes for *Bti* toxin resistance including 37 potential Cry toxin binding proteins and 101 serine proteases. Among them, two potential *Bti* receptors and one serine protease were significantly differentially transcribed in the resistant LiTOX strain.

The gene AAEL003298 coding for an alkaline phosphatase showed a 5.2-fold under-transcription in the LiTOX strain. Alkaline phosphatases were previously identified as putative Cry1Ac receptors in the lepidopterans *Manduca sexta* (McNall and Adang, 2003) and *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes and Adang, 2004). In the mosquito *Ae. aegypti*, an alkaline phosphatase was also identified as a receptor for Cry11A and Cry4B (Bayyareddy et al., 2009; Fernandez et al., 2006). A reduced expression of toxin receptors can cause resistance to Cry toxin (Barrows et al., 2006; Griffiths et al., 2005; Jurat-Fuentes et al., 2011). For example, the under-expression of alkaline phosphatases was correlated with resistance to Cry toxins in the lepidopterans *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera frugiperda* (Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Jurat-Fuentes et al., 2011). The high specificity of membrane receptors usually limits their binding to very closely related toxins (Abdullah et al., 2006; Griffiths and Aroian, 2005; Pigott and Ellar, 2007). However, the alkaline phosphatase identified in *Ae. aegypti* by Fernandez et al., 2006 was able to bind to both Cry4B and Cry11A toxins. As the LiTOX strain exhibits 13.3 and 6.3-fold resistance to Cry4B and Cry11A toxins respectively, the alkaline phosphatase AAEL003298 appeared as a good candidate for resistance to multiple Cry toxins.

The gene AAEL010537 coding for an alpha-amylase was 6.9-fold under-transcribed in the LiTOX strain. An alpha-amylase was recently described as a new receptor for Cry4B and Cry11A in the species *Anopheles albimanus* (Fernandez-Luna et al., 2010). The gene AAEL010537 exhibited more than 98% similarity to the alpha-amylase identified in *An. albimanus*, therefore representing a good candidate for *Bti* resistance in the LiTOX strain.

Among the 37 putative *Bti* receptors expressed in larval mid-guts, only two were found under-expressed more than four times in the LiTOX strains. This does not mean that the other putative receptors are not involved in resistance. Indeed, toxin resistance often involves receptor modification at the sequence level altering the binding of toxins, rather than under expression of the receptor (Gahan et al., 2001; Xie et al., 2005; Darboux et al., 2007). A previous genome scan performed on the same mosquito LiTOX and

**Table 4**  
Genes of known function significantly under-transcribed in the LiTOX strain.

Gene	Description	Ctrl RPM	LiTOX RPM	TR (Fold)	Adjusted <i>P</i> value	TR type
<i>Proteases</i>						
AAEL012351	Prolylcarboxypeptidase	207.0	46.6	−4.4	5.0E−14	True
AAEL007926	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	77.5	11.6	−6.6	9.1E−09	True
AAEL008218	Serine-type endopeptidase	528.2	43.5	−12.1	1.8E−117	True
<i>Kinases-phosphatases</i>						
AAEL002015	Protein serine/threonine kinase	630.1	135.9	−4.6	4.6E−51	True
AAEL003298	Alkaline phosphatase	135.0	25.8	−5.2	8.2E−12	True
AAEL005238	mck1	109.0	20.0	−5.4	8.9E−10	True
AAEL003193	Inorganic pyrophosphatase	53.6	7.1	−7.4	2.9E−06	True
AAEL005710	Protein serine/threonine kinase	88.1	5.8	−14.8	3.4E−20	True
AAEL005711	Protein serine/threonine kinase	124.7	0.9	−114.7	2.6E−47	True
<i>Other enzymes</i>						
AAEL008848	ATP synthase gamma subunit	95.9	23.5	−4.0	4.6E−04	True
AAEL012994	Glucose-6-phosphate isomerase	96.4	20.0	−4.8	1.5E−06	True
AAEL012062	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase alpha subunit	100.5	19.5	−5.1	6.4E−08	True
AAEL007633	Dihydropyrimidinase	79.4	13.8	−5.7	3.7E−07	True
AAEL008701	Myo-inositol oxygenase	72.9	11.6	−6.2	2.0E−07	True
AAEL014609	Cytochrome P450	46.0	6.7	−6.7	2.0E−04	True
AAEL010537	Alpha-amylase	213.9	30.7	−6.9	1.8E−29	True
AAEL005181	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	73.2	10.2	−7.0	7.3E−09	True
AAEL008040	Brain chitinase and chia	264.5	30.2	−8.7	6.6E−46	True
AAEL004221	Glycogen synthase	49.2	5.3	−8.9	5.2E−07	True
AAEL007135	Peroxiredoxin 5, prdx5	150.9	16.4	−9.1	2.8E−26	True
AAEL010764	Aldehyde dehydrogenase	38.2	3.6	−10.2	1.1E−05	True
AAEL006829	Microsomal glutathione s-transferase	23.2	0.9	−21.5	1.2E−04	True
AAEL009111	Sphingomyelin phosphodiesterase	17.7	0.0	−89.6	1.3E−04	Estim
AAEL010204	Dihydropyrimidine dehydrogenase	44.6	0.0	−224.1	2.6E−16	Estim
AAEL010991	Long-chain-fatty-acid coa ligase	280.2	69.8	−4.0	1.2E−15	True
<i>Receptors</i>						
AAEL013136	Chromodomain helicase DNA binding protein	92.7	12.0	−7.6	6.3E−13	True
<i>Transport</i>						
AAEL001421	High density lipoprotein binding protein	120.8	28.9	−4.2	3.5E−06	True
AAEL006582	Calcium-transporting ATPase	1249.8	295.0	−4.2	1.8E−86	True
AAEL010159	Importin beta-3	157.1	36.0	−4.3	9.9E−10	True
AAEL012655	Sugar transporter	57.0	10.2	−5.5	3.4E−04	True
<i>Cytoskeleton</i>						
AAEL002565	Titin	108.3	22.2	−4.8	7.9E−08	True
AAEL002851	Tubulin beta chain	352.0	66.6	−5.3	1.1E−34	True
AAEL006242	beta chain spectrin	102.8	14.2	−7.1	1.5E−13	True
<i>Others</i>						
AAEL011604	Perlecan	127.2	31.5	−4.0	5.8E−06	True
AAEL013520	Pupal cuticle protein	146.1	34.7	−4.2	4.0E−08	True
AAEL005187	Laminin gamma 1 chain	91.3	20.0	−4.5	2.6E−05	True
AAEL003049	Pupal cuticle protein 78E	667.3	119.5	−5.6	2.6E−73	True
AAEL008461	Surfeit locus protein	55.7	7.1	−7.6	6.4E−07	True
AAEL013071	Ribophorin	55.9	3.6	−14.9	4.1E−12	True
AAEL009001	Adult cuticle protein	16.8	0.0	−85.0	3.2E−04	Estim

susceptible strains as studied herein allowed identifying two candidate genes, the cadherin AAEL001196 and the leucine aminopeptidase AAEL001649, located in genomic regions exhibiting higher than expected genetic differentiation between the two strains (Bonin et al., 2009). Among them, only the cadherin displayed a positive signature of selection at the sequence level. Using RT-qPCR we showed that these genes were moderately under-expressed in the LiTOX strain with 2.2-fold and 1.7-fold respectively. The present study confirmed the under-transcription of the leucine aminopeptidase AAEL001649 in the LiTOX strain (2-fold, see Table S1). By contrast, the cadherin AAEL001196 could not be detected in the present study, probably due to its very low expression level.

The gene AAEL008218 coding for a serine protease 12.1-fold under-transcribed in the LiTOX strain. This protein contains predicted N-terminus signal peptide cleavage sites. Serine proteases are involved in the activation of Cry protoxins by the proteolytic removal of peptide fragments (de Maagd et al., 2001). Changes in the pattern of midgut proteases have been found in *Bt* resistant lepidopteran (Forcada et al., 1999; Griffiths and Aroian, 2005; Khajuria

et al., 2009; Oppert et al., 1997; Rodriguez-Cabrera et al., 2010). The strong under-transcription of this serine protease suggests that alteration of protoxins activation could contribute to the resistance to Cry toxins in the LiTOX strain.

Other proteins may be involved in *Bti* toxin resistance in mosquitoes. Several genes encoding protein kinases were found differentially transcribed in the LiTOX strain. Three of them were under-transcribed 114.7, 14.8 and 4.6-fold (AAEL005711, AAEL005710 and AAEL002015 respectively) while two were over-transcribed 9.5 and 10.3-fold (AAEL002029 and AAEL002004 respectively). Zhang et al. (2005) suggested that cell death occasioned by Cry toxins after binding to membrane receptors is a more complex cellular response than the simply osmotic lysis previously accepted. They described a pathway involving G proteins, adenylyl cyclase and adenosine monophosphate resulting in the activation of protein kinases and initiating membrane blebbing, cell swelling and cell lysis (Zhang et al., 2006). They also reported the crucial role of protein kinases in this cell death pathway, as an inhibition of these proteins can protect the cells from the toxicity of Cry toxins. Therefore, the altered

transcription of several protein kinases in the LiTOX strain might contribute to *Bti* toxins resistance by controlling cell apoptosis.

Finally, the gene AEEL006509 coding for a hydrogen ATPase was found over-transcribed 6.5-fold in the LiTOX strain. Hydrogen ATPases were previously described as putative binding proteins for Cry4B toxin in *Ae. aegypti* (Bayyareddy et al., 2009) and for other Cry toxins in *H. virescens* (Krishnamoorthy et al., 2007; McNall and Adang, 2003), *Plodia interpunctella* (Candas et al., 2003) and *Helicoverpa armigera* (Chen et al., 2010). Hydrogen ATPases are located in the plasma membranes of insect epithelia, where they represent the primary energy source for secretion and absorption by serving as an H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporter across the insect midgut epithelium (Wieczorek et al., 2000). They are abundant in the apical membrane of the posterior midgut of *Ae. aegypti* larvae (Patrick et al., 2006). The binding of Cry toxins to hydrogen ATPases could interfere with the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transport and destabilize electrochemical balance. An over-expression of hydrogen ATPases was observed in a resistant strain of the moth *P. interpunctella* (Candas et al., 2003). In this study, the authors suggested that this increase may reflect a compensatory response to help overcoming the toxic effect of Cry binding on ATPase function (Candas et al., 2003).

The present study represents the first transcriptomic dataset related to resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Ae. aegypti*. By using a next-generation sequencing approach, several genes putatively involved in *Bti* toxins resistance were identified. Among them, several genes belong to families previously associated with *Bt* toxin resistance mechanisms in insects. Although further functional validation is required, this study provides a first step to identify genes involved in *Bti* toxins resistance mechanisms in mosquitoes. In the long term, such research will facilitate developing simple molecular tools to early detect resistance in natural mosquito populations.

## Acknowledgments

The present research project was supported by grants obtained from the French Rhône-Alpes region (Grant #0501545401) and the French National Research Agency (Grant ANR-08-CES-006-01 DIBB-ECO). We are grateful to J. Patouraux and S. Veyrenc for technical help.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jip.2011.11.004.

## References

- Abdullah, M.A.F., Valaitis, A.P., Dean, D.H., 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem.* 7, 16.
- Asmann, Y., Klee, E., Thompson, E.A., Perez, E., Middha, S., Oberg, A., Therneau, T., Smith, D., Poland, G., Wieben, E., Kocher, J.P., 2009. 3' Tag digital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer. *BMC Genomics* 10, 531.
- Auer, P.L., Doerge, R.W., 2010. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics* 185, 405–432.
- Barrows, B.D., Griffiths, J.S., Aroian, R.V., 2006. *Caenorhabditis elegans* carbohydrates in bacterial toxin resistance. In: *Functional Glycomics*. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, pp. 340–358.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* *Linnaeus* (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 39, 279–286.
- Becker, N., Ludwig, M., 1993. Investigation of possible resistance in *Aedes-vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 221–224.
- Bonin, A., Paris, M., Tetreau, G., David, J.P., Despres, L., 2009. Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations. *BMC Genomics* 10, 551.
- Boyer, S., Tilquin, M., Ravanel, P., 2007. Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): Toward resistance? *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 157–162.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol.* 49, 423–435.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bulla, L.A., 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* – alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell. Prot.* 2, 19–28.
- Chen, L.Z., Liang, G.M., Zhang, J., Wu, K.M., Guo, Y.Y., Rector, B.G., 2010. Proteomic analysis of novel Cry1AC binding proteins in *Helicoverpa armigera* (HUBNER). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 73, 61–73.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807.
- Darboux, I., Charles, J.F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* 9 (8), 2022–2029.
- David, J.P., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M.A., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 11, 216.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193–199.
- Dimopoulos, G., Casavant, T.L., Chang, S.R., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Schultz, J., Benes, V., Bork, P., Ansorge, W., Soares, M.B., Kafatos, F.C., 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: Identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immunocompetent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6619–6624.
- Fernandez, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M., 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77–84.
- Fernandez-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M., Miranda-Rios, J., 2010. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ. Microbiol.* 12, 746–757.
- Fisher, R.A., 1935. The logic of inductive inference. *J. Roy. Statist. Soc. A* 98, 39–54.
- Forcada, C., Alcaccer, E., Garcera, M.D., Tato, A., Martinez, R., 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 42, 51–63.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857–860.
- Goldman, I.F., Arnold, J., Carlton, B.C., 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 317–324.
- Griffitts, J.S., Aroian, R.V., 2005. Many roads to resistance. How invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* 27, 614–624.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T.L., Garczyński, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J., Aroian, R.V., 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* 307, 922–925.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann. Rev. Entomol.* 45, 371–391.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J., de Maagd, R.A., 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase *N* genes. *BMC Genomics* 6, 96.
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F.G., Aroian, R.V., 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defends against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10995–11000.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271, 3127–3135.
- Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R.K., Ning, C.M., Liu, C.X., Wu, K.M., Jackson, J., Gould, F., Blanco, C., Portilla, M., Perera, O., Adang, M., 2011. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to Lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One* 6, e17606.
- Khajuria, C., Zhu, Y.C., Chen, M.S., Buschman, L.L., Higgins, R.A., Yao, J.X., Crespo, A.L.B., Siegfried, B.D., Muthukrishnan, S., Zhu, K.Y., 2009. Expressed sequence tags from larval gut of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*): Exploring candidate genes potentially involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity and resistance. *BMC Genomics* 10, 286.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J.L., McNall, R.J., Andacht, T., Adang, M.J., 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 37, 189–201.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 133–163.
- McNall, R.J., Adang, M.J., 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33, 999–1010.
- Morin, S., Biggs, R.W., Sisterson, M.S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E., 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5004–5009.

- Nauen, R., 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag. Sci.* 63, 628–633.
- Obermeier, C., Hosseini, B., Friedt, W., Snowdon, R., 2009. Gene expression profiling via LongSAGE in a non-model plant species: a case study in seeds of *Brassica napus*. *BMC Genomics* 10, 295.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H., 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272, 23473–23476.
- Paris, M., Boyer, S., Bonin, A., Collado, A., David, J.P., Despres, L., 2010. Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. *Mol. Ecol.* 19, 325–337.
- Paris, M., David, J., Despres, L., 2011a. Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* 20, 1184–1194.
- Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., David, J., 2011b. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Manag. Sci.* 67, 122–128.
- Patrick, M.L., Aimanova, K., Sanders, H.R., Gill, S.S., 2006. P-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and V-type H<sup>+</sup>-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 209, 4638–4651.
- Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, L., Scott, J.G., 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 305–309.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255.
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN:3-900051-900007-900050, <<http://www.Rproject.org>>.
- Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O., 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2696–2699.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol.* 17, 377–380.
- Rodríguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D.J., Ayra-Pardo, C., 2010. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environ. Microbiol.* 12, 2894–2903.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775.
- Wang, Z., Dong, D., Ru, B.H., Young, R.L., Han, N.J., Guo, T.T., Zhang, S.Y., 2010. Digital gene expression tag profiling of bat digits provides robust candidates contributing to wing formation. *BMC Genomics* 11, 619.
- Wieczorek, H., Gruber, G., Harvey, W.R., Huss, M., Merzendorfer, H., Zeiske, W., 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane H<sup>+</sup>V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203, 127–135.
- Wu, S., Manber, U., 1992. Agrep – a fast approximate pattern-matching tool. In: Proceedings of the Winter USENIX Conference, San Francisco, USA, 20–24 Jan. Berkeley, USA, pp. 153–162.
- Xiang, L., He, D., Dong, W., Zhang, Y., Shao, J., 2010. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of bacteria-challenged *Lateolabrax japonicus* reveals insight into the immune-relevant genes in marine fish. *BMC Genomics* 11, 472.
- Xie, R.Y., Zhuang, M.B., Ross, L.S., Gomez, I., Oltean, D.I., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S.S., 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 280, 8416–8425.
- Xue, J.A., Bao, Y.Y., Li, B.L., Cheng, Y.B., Peng, Z.Y., Liu, H., Xu, H.J., Zhu, Z.R., Lou, Y.G., Cheng, J.A., Zhang, C.X., 2010. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *PLoS One* 5 (12).
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L., Bulla, L.A., 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R-1 expressed in insect cells. *Cell. Death Differ.* 12, 1407–1416.
- Zhang, X.B., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla, L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9897–9902.

# Article V

---

**Larval Midgut Modifications Associated with *Bti* Resistance in the Yellow Fever Mosquito using Proteomic and Transcriptomic Approaches.**

TETREAU, G., BAYYAREDDY, K., JONES, C. M., STALINSKI, R., RIAZ, M. A., PARIS, M., DAVID, J. P., ADANG, M. J., DESPRES, L.

*BMC Genomics*. 13:248 (2012)



# Larval midgut modifications associated with *Bti* resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches

Guillaume Tetreau<sup>1\*</sup>

\* Corresponding author

Email: guillaume.tetreau@gmail.com

Krishnareddy Bayyareddy<sup>2</sup>

Email: kreddy@uga.edu

Christopher M Jones<sup>3</sup>

Email: c.m.jones@liverpool.ac.uk

Renaud Stalinski<sup>1</sup>

Email: renaud.stalinski@gmail.com

Muhammad A Riaz<sup>1</sup>

Email: asam\_ua@yahoo.com

Margot Paris<sup>1</sup>

Email: margotparis1@gmail.com

Jean-Philippe David<sup>1</sup>

Email: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

Michael J Adang<sup>2,4</sup>

Email: adang@uga.edu

Laurence Després<sup>1</sup>

Email: laurence.despres@ujf-grenoble.fr

<sup>1</sup> Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grenoble 1, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

<sup>2</sup> Department of Entomology, University of Georgia, Athens, GA 30602-2603, USA

<sup>3</sup> Vector Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool L3 5QA, UK

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia, Athens, GA 30602-2603, USA

Guillaume Tetreau Krishnareddy Bayyareddy has equal contributions

## Abstract

### Background

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) is a natural larval mosquito pathogen producing pore-forming toxins targeting the midgut of Diptera larvae. It is used worldwide for mosquito control. Resistance mechanisms of an *Aedes aegypti* laboratory strain selected for 30 generations with field-collected leaf litter containing *Bti* toxins were investigated in larval midguts at two levels: 1. gene transcription using DNA microarray and RT-qPCR and 2. differential expression of brush border membrane proteins using DIGE (Differential In Gel Electrophoresis).

### Results

Several *Bti* Cry toxin receptors including alkaline phosphatases and N-aminopeptidases and toxin-binding V-ATPases exhibited altered expression levels in the resistant strain. The under-expression of putative *Bti*-receptors is consistent with *Bt*-resistance mechanisms previously described in Lepidoptera. Four soluble metalloproteinases were found under-transcribed together with a drastic decrease of metalloproteinases activity in the resistant strain, suggesting a role in resistance by decreasing the amount of activated Cry toxins in the larval midgut.

### Conclusions

By combining transcriptomic and proteomic approaches, we detected expression changes at nearly each step of the ingestion-to-infection process, providing a short list of genes and proteins potentially involved in *Bti*-resistance whose implication needs to be validated. Collectively, these results open the way to further functional analyses to better characterize *Bti*-resistance mechanisms in mosquitoes.

## Keywords

*Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis israelensis*, DIGE, Microarray, RT-qPCR, Resistance, Transcriptomics, Proteomics, Midgut, Mosquito, Candidate genes

## Background

Mosquito control represents a major public health concern as mosquitoes transmit many pathogens causing fatal human diseases including malaria, filariasis, dengue, yellow fever, and Chikungunya [1]. Vector borne diseases represent a major health threat and economic burden in disease-endemic countries and are currently expanding worldwide [2,3]. As no specific treatment exists for most of these diseases, the most effective way of reducing the incidence of these diseases is to control the vector mosquitoes [4,5]. Chemical insecticides still used in endemic countries have shown their limits as resistance has evolved in all target species together with environmental concerns due to their high persistence and toxicity for non-target organisms, including humans [6].

The bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) produces a mosquitocidal toxic crystal during sporulation and represents the best alternative to chemical insecticides for mosquito larval control due to its high potency and specificity [7]. The action of *Bti* begins when larvae ingest *Bti* spores and toxic crystals. In susceptible larvae, the toxic crystal is dissolved in the alkaline pH of the midgut, protoxins are then activated by digestive proteases to activated-toxins that bind to specific membrane receptors, form pores, disrupt the midgut epithelium, allowing spore penetration and bacterial proliferation in the host tissues [7,8]. The receptors for mosquitocidal *Bti* Cry toxins are similar to the lepidopteran-active Cry toxins which utilize N-aminopeptidase, alkaline phosphatase and cadherin proteins as midgut receptors [9].

In contrast to *Bacillus thuringiensis* subspecies active against lepidopteran and coleopteran species where cases of insect resistance in the field have been reported [10-13], only one study reported *Bti* resistance in field mosquitoes [14]. However, subsequent confirmations of this case have not been reported. The delay in the evolution of resistance to *Bti* is believed to be due to its composite toxic crystal containing four major toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa) [7]. Cyt toxins are known to largely enhance Cry toxins activity due to synergic effects and to drastically decrease resistance development [8,15]. Although *Bti* is known to have a low persistence in the environment, recent studies suggest that it can persist and possibly proliferate in specific conditions [16-18]. In the French Rhône-Alpes region, decaying leaf litters collected in mosquito breeding sites several months after a *Bti* treatment revealed a high toxicity against mosquito larvae due to the presence of large amounts of *Bti* [16]. This toxic leaf litter was used to select an *Aedes aegypti* strain in laboratory conditions. After 18 generations, the selected strain (named LiTOX) was only moderately resistant to the whole *Bti* toxins mixture, but up to 30 fold resistant to individual Cry toxins [19]. Although resistance to *Bti* has already been selected in laboratory conditions [20,21], this is the only reported case of resistance obtained by using field-collected material containing residual *Bti* toxins. Therefore, this *Bti*-resistant LiTOX strain provides a unique opportunity to better understand the mode of action of *Bti* toxins and to elucidate the mechanisms of resistance developed by mosquitoes exposed to field residual *Bti* toxins.

To identify the resistance mechanisms developed by the LiTOX strain, a genome scan and a transcriptome scan were previously performed on whole larvae twelve generations ago [22,23]. The main bias of these whole-larvae approaches is that many genes are identified that may not be directly related to *Bti* resistance. Indeed, selection was shown to have induced many changes in the LiTOX strain, including decreased egg survival to desiccation, longer larval development time and decreased female fecundity [24], reflecting the evolution of resistance costs that are not directly involved in resistance to *Bti* toxins. Because insect midgut is the primary target site for *Bti* toxins our aim in the present work is to focus on constitutive expression changes in midgut proteins of resistant versus susceptible larvae. For that purpose, we combine a comparative analysis of brush border membrane proteins using 2D-DIGE (2-Dimensional Differential in Gel Electrophoresis) with a midgut transcriptome profiling using DNA microarrays. In addition, altered gene expression of known *Bti* Cry toxins receptors (i.e. alkaline phosphatases, cadherins, N-aminopeptidases) between the two strains were investigated using RT-qPCR. Finally, because the DiGE didn't allow detecting proteins with high molecular size such as cadherins, we performed Western blots with anti-cadherins antibodies.

## Results

### Resistance levels to *Bti* toxins in the LiTOX strain

After 30 generations of selection with leaf litter containing *Bti*, bioassays indicated that the LiTOX strain exhibited a moderate 3.5-fold resistance to commercial *Bti* mixture Vectobac® WG compared to the susceptible strain at the larval stage (Table 1). When *Bti* Cry toxins were tested separately, the LiTOX strain showed an increased resistance of 68-fold, 9-fold and 9-fold to Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa protoxins respectively. The relatively important variability observed for the LC<sub>50</sub> for Cry4Aa toxin of the LiTOX strain is mainly due to a higher variability in larval mortality in the replicates than for the susceptible strain and for the other toxins. As resistance is not fixed yet in the LiTOX strain [24], this variability between replicates might reflect a large range of different combinations of Cry4A resistance alleles between individuals.

**Table 1 Lethal concentrations and resistance ratio for the LiTOX and susceptible strains for *Bti* and Cry toxins. Lethal concentrations 50% (LC<sub>50</sub>) of the resistant (LiTOX) and the susceptible strain for the three Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa) and for the commercial *Bti* at 24 h. Resistance ratios 50 (RR<sub>50</sub>) are calculated for each product as LC<sub>50</sub> of LiTOX divided by LC<sub>50</sub> of Bora- Bora strain. LC<sub>50</sub> are expressed in ng/mL**

Toxins	Strain	LC <sub>50</sub> in ng/mL (95% CI)	RR <sub>50</sub>
Cry4Aa	Susceptible	646.28 (514.20–826.93)	/
	LiTOX	43873.12 (28396.11–78207.31)	<b>67.9 fold</b>
Cry4Ba	Susceptible	322.27 (228.39–468.57)	/
	LiTOX	2922.26 (1924.95–4168.76)	<b>9.1 fold</b>
Cry11Aa	Susceptible	156.14 (112.86–219.46)	/
	LiTOX	1434.81 (1146.52–1774.22)	<b>9.2 fold</b>
<i>Bti</i> Vectobac WG	Susceptible	90.6 (79.89–101.12)	/
	LiTOX	312.6 (277.27–359.49)	<b>3.5 fold</b>

### Midgut transcriptome profiling

Comparative transcriptome profiling between total mRNAs extracted from midguts of larvae from the LiTOX and the susceptible strains was performed using a DNA microarray representing 14204 of the more than 17000 *Ae. aegypti* transcripts identified in Vectorbase. A total of 3512 transcripts were detected in at least 5 hybridizations out of 6 [ArrayExpress: E-MTAB-1094] (Additional file 1). Among them, 24 and 46 genes were significantly over- and under-transcribed respectively in the LiTOX strain ( $\geq 3$ -fold and corrected P-value  $< 0.01$ ) (Additional file 2). Distribution of transcription ratios was well balanced between over and under-transcription ranging from 20.9-fold under-expression to 18.9-fold over-expression (Figure 1). RT-qPCR validation of transcription ratios for 15 selected genes revealed a good correspondence between the two techniques, supporting the reliability of microarray data (Additional file 3).

**Figure 1 Volcano plot of differentially-transcribed genes identified by microarray analysis.** The Benjamini-Hochberg P-values were plotted against the fold change in gene expression for all genes. The horizontal lines in the plot represent the statistical test

significance 0.01 and the vertical bars represent the genes at least three-fold up- or down-regulated in LiTOX *Bti*-resistant strain compared to Bora-Bora susceptible strain

Differentially transcribed genes were further analyzed according to their biological function by classifying them into 13 different categories (Figure 2). Genes of unknown function represented 34% of detected transcripts while genes not assigned to any category (other functions) represented 17%. Enzymes represented 30% of detected transcripts and were strongly over-represented among under- and over-transcribed genes (55% and 60% respectively) (Figure 2B & C). Proteases were equally represented in over- and under-expressed genes, while detoxification enzymes were more often under- than over-transcribed (7 under-transcribed versus 2 over-transcribed genes). Transaminases, represented by only 11 genes in the *Ae. aegypti* genome, were over-represented in under- and over-transcribed genes while dehydrogenases were strongly over-represented only in over-transcribed genes (23% of enzymes compared to 10% overall).

**Figure 2 Functional analyses of all the genes detected and genes differentially expressed in the resistant strain.** Circle charts of the biological functions of all the genes detected (A), those under-expressed (B) and over-expressed (C) in the LiTOX strain compared to the susceptible Bora-Bora strain. Genes are classified into 13 categories: receptors (orange), transport (green), DNA interaction (purple), cytoskeleton (dark blue), ribosomal proteins (light blue), proteases (black), detoxification enzymes (brown), kinases/phosphatases (orange), transaminases (red), dehydrogenases (dark pink), other enzymes (pink), other functions (dark grey) and unknown functions (light grey)

### Midgut differential proteomics

Midgut membrane proteins were compared between larvae of the LiTOX and susceptible strains using 2D-DIGE (Figure 3). Dye-swapping for each biological sample showed no dye-dependent spot changes on the gels (Additional file 4). Spot locations were reproducible between the biological replicates, but the signal intensity was higher for the second replicate, revealing additional spots differing between the two strains (Additional file 4). A total of 56 distinct protein spots differently expressed between the two strains were processed and 35 unique proteins were identified (Figure 3B, Additional file 5). The MS/MS analyses gave the same protein identifications between biological replicates for spots 2, 8, 20, 21 and 24 with high Mascot scores (from 110 to 249) while spots 14, 42 and 49, showing Mascot scores lower than 100, were assigned to different proteins (Additional file 5). Indeed, none of the spots with low Mascot scores were considered for further analyses. Different spots yielded the same identified protein for 10 proteins, with a maximum of six spots for AAEL005798 (V-ATP synthase subunit beta).

**Figure 3 2D-DIGE gel and corresponding picked silver stained gel.** BBMV proteins were prepared from resistant and susceptible *Aedes aegypti* larval midguts and separated using 2D-DIGE. The spots appear in yellow when corresponding to proteins present at approximately equal amounts in both resistant and susceptible BBMV samples, green for those only present in the susceptible BBMV labeled with Cy3, and red for those only present in the resistant BBMV labeled with Cy5. The x-axis shows pI values from 4 to 7 and the y-axis shows apparent molecular weight in kilodaltons (kDa). Panel A. Overlay of Cy3 and Cy5, and Panel B. Gel co-run stained with deep purple. All the 56 spots picked either on the first, the second or both the two gels, corresponding to the two biological replicates, are noted on this gel

## **Genes and proteins differentially expressed in the LiTOX strain**

Proteome analysis identified two N-aminopeptidase proteins (APN, annotated as ‘protease m1 zinc metalloprotease’) differentially expressed in the LiTOX strain (Table 2): two spots matching APN AAEL012774 were up-regulated and two of the three spots matching APN AAEL012776 were down-regulated in the LiTOX strain. Transcriptomic approach detected thirteen APN (including AAEL012774 and AAEL012776) with transcription level ranging from  $-1.82$  to  $+1.96$  fold changes (Additional file 1) but none was significant.

**Table 2 Protein identification of 30 spots with highest Mascot scores picked on deep purple stained 2D-gel. Proteins are classified according to their putative function using the same 13 categories as for transcriptomic data. When different spots pointed to the same protein, they were differentiated using letters after the access number. For each identification, the predicted pI, the predicted mass in kiloDaltons (kDa), the percentage of sequence coverage and the species and database matched are indicated**

Spot Nb	Fold changes	Vectorbase access number	Mascot score	Top ranking match	Predicted PI	Predicted mass (kDa)	% sequence coverage	Species
<i>Proteases</i>								
2	-	1.88 AAEL015386_a	249	dipeptidyl-peptidase	4.91	84.9	42	<i>Ae. aegypti</i>
3	-	2.77 AAEL015386_b	149	dipeptidyl-peptidase	4.91	84.9	22	<i>Ae. aegypti</i>
4	+	1.81 AAEL012774_a	237	protease m1 zinc metalloprotease	4.81	102.5	41	<i>Ae. aegypti</i>
5	+	2.34 AAEL012774_b	162	protease m1 zinc metalloprotease	4.81	86.7	42	<i>Ae. aegypti</i>
20	+	1.81 AAEL012776_a	135	protease m1 zinc metalloprotease	5.19	103.3	30	<i>Ae. aegypti</i>
21	-	2.74 AAEL012776_b	146	protease m1 zinc metalloprotease	5.19	103.3	27	<i>Ae. aegypti</i>
19	-	3.81 AAEL012776_c	136	protease m1 zinc metalloprotease	5.19	103.3	22	<i>Ae. aegypti</i>
<i>Detoxification enzymes</i>								
45	+	3.01 CPIJ019700	119	cytochrome P450	7.6	58.4	41	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Kinases-Phosphatases</i>								
22	-	1.58 AAEL003313	62	alkaline phosphatase	5.46	61.0	23	<i>Ae. aegypti</i>
24	-	1.92 AAEL003298_a	186	alkaline phosphatase	5.28	58.8	39	<i>Ae. aegypti</i>
25	-	1.16 AAEL003298_b	194	alkaline phosphatase	5.23	58.3	39	<i>Ae. aegypti</i>
<i>Other enzymes</i>								
6	+	1.78 AAEL010532	146	alpha-amylase	4.82	68.9	37	<i>Ae. aegypti</i>
13	-	1.27 AAEL004580	129	beta-galactosidase	4.87	74.1	34	<i>Ae. aegypti</i>

11	-	2.06	AAEL002827_a	61	ATP synthase beta subunit	5.03	53.9	32	<i>Ae. aegypti</i>
23	-	2.29	AAEL002827_b	152	ATP synthase beta subunit	5.03	53.9	55	<i>Ae. aegypti</i>
16	-	2.06	AAEL008787_a	162	V-ATP synthase subunit alpha	5.26	68.5	31	<i>Ae. aegypti</i>
17	-	2.19	AAEL008787_b	231	V-ATP synthase subunit alpha	5.26	68.5	42	<i>Ae. aegypti</i>
18	-	1.82	AAEL008787_c	132	V-ATP synthase subunit alpha	5.26	68.5	30	<i>Ae. aegypti</i>
27	-	1.51	AAEL005798_a	200	V-ATP synthase subunit beta	5.31	54.8	49	<i>Ae. aegypti</i>
28	-	1.69	AAEL005798_b	177	V-ATP synthase subunit beta	5.31	54.8	44	<i>Ae. aegypti</i>
29	-	1.72	AAEL005798_c	187	V-ATP synthase subunit beta	5.31	55.4	53	<i>Ae. aegypti</i>
30	-	2.06	AAEL005798_d	229	V-ATP synthase subunit beta	5.38	55.5	52	<i>Ae. aegypti</i>
31	-	2.39	AAEL005798_e	197	V-ATP synthase subunit beta	5.38	55.4	48	<i>Ae. aegypti</i>
32	-	1.89	AAEL005798_f	181	V-ATP synthase subunit beta	5.38	55.4	56	<i>Ae. aegypti</i>
52	-	2.14	AAEL012035_a	93	V-ATP synthase subunit E	5.91	25.7	35	<i>Ae. aegypti</i>
53	-	2.21	AAEL012035_b	88	V-ATP synthase subunit E	5.91	25.7	38	<i>Ae. aegypti</i>
<i>Other functions</i>									
8	+	10.74	AAEL001005_a	195	calreticulin	4.42	47.0	43	<i>Ae. aegypti</i>
8	-	2.56	AAEL001005_a	226	calreticulin	4.42	47.0	49	<i>Ae. aegypti</i>
9	+	3.14	AAEL001005_b	210	calreticulin	4.42	47.0	49	<i>Ae. aegypti</i>
10	+	2.75	AAEL001005_c	158	calreticulin	4.42	47.0	48	<i>Ae. aegypti</i>
12	+	3.01	AAEL001005_d	93	calreticulin	4.42	46.7	35	<i>Ae. aegypti</i>

Two alkaline phosphatases (ALP) proteins, matching AAEL003313 and AAEL003298, were under-expressed in the LiTOX strain while transcriptomics identified two other ALP genes (AAEL011175 and AAEL015070) significantly over-transcribed in the LiTOX strain with transcription ratios of +4.63 and +3.95 fold respectively. All ALPs but AAEL003298 have predicted glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor domains allowing them to tether to the epithelial membrane and be potential membrane-bound Cry toxin receptors (Additional file 6).

Four proteins matching ATP synthase subunits alpha, beta and epsilon, with two to seven different spots for the same protein, had levels from  $-1.51$  to  $-2.39$  lower in the LiTOX strain. This tendency was consistent with microarray data for AAEL008787-RA ( $-1.19$  fold), AAEL005798 ( $-1.37$  fold) and AAEL012035 ( $-1.19$  fold) although P values were not significant.

A unique calreticulin protein was picked and identified from DIGE gels. Initially detected as only one big spot with +10.74 fold change, the second biological replicate allowed clearly identifying four different spots respectively  $-2.56$ , +2.75, +3.01 and +3.14 fold differentially expressed in the LiTOX strain. In microarray experiment, no significant differential transcription of this gene was found in the LiTOX strain.

Using BLASTP software, we managed to identify putative functions for the 15 transcripts of unknown function differentially transcribed in the LiTOX strain with protein identities ranging from 25 to 99% (Additional file 2). Among them, two were strongly over-transcribed in the resistant strain (AAEL013584 19-fold and AAEL010435 9.6-fold) and matched to a putative G<sub>12</sub> protein in *Ae. aegypti* (77% protein identity, Additional file 2).

Among the five cytochrome P450 monooxygenase transcripts identified by microarray analyses, *CYP4D24* was over-transcribed while the others (*CYP6N9*, *CYP6Z7*, *CYP6Z8* and *CYP9M9*) were under-transcribed in the LiTOX strain. DIGE experiments identified one protein matching to a cytochrome P450 3-fold over-expressed in the LiTOX strain.

Transcriptomic data detected four metalloproteinases significantly under-transcribed from  $-3.16$  to  $-5.29$  fold (Additional file 2). The presence of conserved domains of soluble astacin-like metalloproteinases together with the absence of detected GPI-anchor domain (Additional file 6) suggests that these four metalloproteinases are probably secreted extracellular enzymes, explaining why they were not identified in the BBMV by the DIGE analysis.

## **Global and specific proteolytic activities**

To determine if the modifications in protease transcription levels observed in the resistant strain result in changes in gut proteolytic activities, we compared the protease activities of secreted proteins from larval midgut of each strain using azocasein as substrate. Total proteolytic activity was 8.5% higher in the resistant strain compared to the susceptible strain (Table 3). The use of specific protease inhibitors revealed that more than 90% of the total proteolytic activity is due to serine protease for both strains. Among them, chymotrypsins and trypsin represented respectively more than 40% and 20% of the total activity in both strains. The use of the metalloproteinase inhibitor EDTA showed that 12% of the total proteolytic activity was due to metalloproteinases in the susceptible strain whereas no inhibition was

measured in the resistant strain (Wilcoxon test; P-value <0.05), suggesting a strong reduction of metalloproteinase activity in the LiTOX strain.

**Table 3 Total enzymatic activity and effect of protease inhibitors on the azocaseinolytic activity of midgut extract. All values are given as mean  $\pm$  SEM**

Strain	Total enzymatic activity (OD at 440 nm)	Percentage of inhibition of total activity (%)			
		PMSF	TLCK	TPCK	EDTA
Susceptible	0.328 $\pm$ 0.009	92.98 $\pm$ 0.57	46.82 $\pm$ 1.02	23.42 $\pm$ 2.24	12.18 $\pm$ 1.74
LiTOX	0.356 $\pm$ 0.010	92.31 $\pm$ 0.23	42.01 $\pm$ 2.29	20.87 $\pm$ 1.64	-1.74 $\pm$ 4.55
Wilcoxon test	*	NS	NS	NS	*

## Discussion

### Resistance levels to *Bti* toxins in the LiTOX strain

After 30 generations of selection, resistance to Cry4Aa in the LiTOX strain has more than doubled as compared to twelve generations ago, while resistance ratios did not change for Cry4Ba and Cry11Aa [19,22]. Resistance to *Bti* is moderate (3.5 fold) but higher than at generation 18 (2-fold), indicating that resistance alleles are not all fixed yet. These results are consistent with previous attempts to select *Ae. aegypti*, *Culex pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* with *Bti* which obtained moderate resistance (2 to 3 fold) after 20 to 30 generations [20,21,25,26]. The increased *Bti* resistance observed may be due to the increase in Cry4Aa resistance, and most changes observed in the present study may be related to Cry4Aa resistance. The discrepancy between *Bti* and Cry4Aa increased resistances is likely to be due to the presence of Cyt toxin in *Bti*, known to overcome Cry resistance in insects [15].

### Midgut transcriptome and proteome analyses

Our comparison of midgut transcripts and brush border proteins between the susceptible and LiTOX strains revealed an overlapping but distinct set of transcripts/proteins differentially expressed. Transcriptome profiling with a microarray representing more than 81% of known *Ae. aegypti* transcripts lead to the detection of 3512 transcripts of which 70 were differentially transcribed in the LiTOX strain. This relatively low number of transcripts detected (about 25%) is probably due to the low transcription level or absence of transcription of several genes in this particular organ—the larval midgut. Little overlap was observed between the previous transcriptomic analysis, performed on whole larvae 12 generations ago using a DGETP approach [23], and the present study, focusing on midgut gene expression using microarrays. This is possibly due to the technical differences between the two studies and to the fact that no resistance gene is fixed yet in the LiTOX strain, indicated by the still increasing resistance to *Bti* and to Cry toxins [19]. Moreover, as genes conferring resistance to *Bti* toxins are likely to be expressed in larval midgut, focusing on midguts rather than on whole larvae allows to considerably reduce the candidate gene dataset, and to consider only genes likely to be directly involved in resistance, rather than those only indirectly affected by selection side-effects (genetic drift) or compensatory mechanisms (resistance costs) [24]. The 2D-DIGE analysis resolved about 400 distinct proteins in larval BBMV fractions, 56 spots were picked of which 50 differed by more than 2-fold between the two strains. The difference between the number of spots picked (56) and the number of unique identified proteins (35) is

due to different spots for the same protein, as for example up to six spots observed for one V-ATPase. The multiple spots for the same protein are most likely due to post-translational modifications (glycosylation, phosphorylation) that cause shift in protein mobility. Eight spots common to the replicated DIGE experiments were picked and identified twice. Among them all but one, calreticulin (AAEL01005), showed similar levels of differential expression supporting the consistency of biological replicates (Additional file 4). Both transcriptomic and proteomic data identified more under than over-expressed genes/proteins in the LiTOX strain, which is congruent with a previous transcriptome analysis performed on whole larvae 12 generations ago [23]. Such asymmetry is not surprising considering that mechanisms of resistance to *Bt* can involve a decreased activation of protoxins or a decreased toxin-binding to the epithelium membrane [27].

Little overlap was found between data obtained by transcriptomic and proteomic approaches. This could be explained by both biological processes and technical limitations inherent to each method. Regarding DIGE, BBMV were used, which are enriched for proteins attached to apical brush border midgut membrane via scaffolding and proteins attached to the inner membrane leaflet via acylation. Therefore, except few soluble proteins trapped in re-folded membranes, soluble intracellular proteins and proteins excreted inside the gut lumen are typically absent in BBMV preparations [28,29]. In contrast, mRNAs extracted from whole larval midguts should be representative of all transcripts present in midgut cells. Another factor limiting overlapping data may be the consequence of the relatively stringent filtering of the microarrays dataset (3-fold threshold). Several studies also showed that mRNA transcription profiles fit poorly with protein levels because of numerous post-transcriptional regulatory activities and post-translational events [30-32]. Such events generate a high diversity of proteins while gene expression remains unchanged, and this source of variation is so far under-explored in studies on fast adaptive changes like the evolution of insecticide resistance. It is likely that the two complementary approaches used in the present work detected distinct mechanisms of resistance acting at different steps in the mode of action of *Bti* (i.e. crystal solubilization, toxin activation and binding to receptors).

### **Altered expression and activities of proteases from the LiTOX strain**

Four soluble astacin-like metalloproteinases were found significantly under-transcribed in the LiTOX strain. This observation was correlated with a strong decrease of metalloproteinases activity among the enzymes secreted in the midgut lumen of larvae from the resistant strain. To our knowledge, this is the first time astacin-like metalloproteinases are associated to *Bt* resistance. The observed decrease in metalloproteinases in the resistant strain might reflect an alteration in *Bti* Cry toxins activation in the gut lumen of LiTOX larvae. Further experiments based on measuring proteolytic activities and performing bioassays with activated toxins will clarify the potential role that alteration of protoxins processing, notably for Cry4Aa, could play in the resistance phenotype.

### **Altered expression of known *Bti*-binding proteins in the LiTOX strain**

To validate the expression alteration of putative *Bti*-receptors observed in microarrays and DIGE approaches, RT-qPCR analyses were performed on five N-aminopeptidases (APN1 to 5), two cadherins (Cad1 and Cad2) and three alkaline phosphatases (ALP1 to 3) previously described as binding proteins for Cry4Ba [29] or Cry11Aa [33-36] (Table 4).

**Table 4 Altered expression of known *Bti* Cry-binding proteins detected by transcriptomic and proteomic approaches. Given values indicate the level of expression in the LiTOX strain compared to the susceptible strain detected in microarrays, RT-qPCR and DIGE experiments. ND, Non detected in at least 5 of the 6 microarray hybridizations; NI, Non identified as differentially expressed between the two strains and therefore non-picked for MS/MS identification; UD, Undetectable in 2D-DIGE due to their high molecular weight and their low amount in BBMV**

Gene	Accession number	Microarrays	RT-qPCR	2D-DIGE	Binding protein	Ref
Alkaline phosphatase (ALP1)	AAEL000931	ND	+11.40	NI	Cry11Aa	[33]
Alkaline phosphatase (ALP2)	AAEL003298	-1.57	-1.56	-1.92; -1.16	Cry4Ba	[29]
Alkaline phosphatase (ALP3)	AAEL003313	+1.15	+1.52	-1.58	Cry4Ba	[29]
Alkaline phosphatase (ALP4)	AAEL009077	ND	+1.15	NI	Cry11Aa	[36]
Alkaline phosphatase (ALP5)	AAEL015070	+3.95	+7.69	NI	Cry4Ba	[29]
Cadherin (Cad1)	AAEL007478	ND	-1.11	UD	Cry11Aa	[34]
Cadherin (Cad2)	AAEL007488	-1.47	-1.46	UD	Cry11Aa	[34]
N-Aminopeptidase (APN1)	AAEL012774	+1.44	+1.26	+1.80; +2.34	Cry11Aa	[35]
N-Aminopeptidase (APN2)	AAEL012776	-1.34	-1.62	+1.81; -2.74; -3.81	Cry4Ba	[29]
N-Aminopeptidase (APN3)	AAEL012778	-1.04	+1.20	NI	Cry11Aa	[35]

The cadherin described as a Cry11Aa-receptor in *Ae. aegypti* (AAEL007488) [34] was found 1.47 fold under-transcribed in both microarrays and RT-qPCR experiments. However, no cadherin was detected by DIGE approach. The inability to detect cadherin in the DIGE analysis is not surprising as they are large proteins (>170 kDa) present in low amounts in insect brush border membranes [37]. Blotting of BBMV using two anti-cadherin antibodies showed that most of the cadherins were degraded, even in a freshly prepared UGAL *Aedes* BBMV preparation, confirming that cadherins in BBMV are very unstable (Additional file 7). Western blots showed that cadherin(s), notably a ~32 kDa fragment, is strongly over-represented in the LiTOX strain compared to the susceptible strain (Additional file 7). Further analyses of the toxins-binding properties of the detected cadherin(s) are needed to better understand the role they could play in the resistance phenotype.

Alkaline phosphatases (ALPs), typically anchored by GPI-moieties, are known to be Cry toxin receptors in Lepidoptera [38,39] and mosquitoes [36,40]. Recently, a decrease in ALP amounts and activities were linked to Cry-resistance of larvae from three lepidopteran genera [41]. The ALPs detected as over-transcribed in the LiTOX strain by the two transcriptomic approaches were either not identified as differentially expressed (AAEL000931, AAEL009077 and AAEL015070) or identified as under-expressed (AAEL003313) by DIGE approach. These results suggest that the lower ALP protein abundance in the epithelium membrane might rather be due to post-translational events than under-expression. Indeed, our DIGE analyses identified three ALPs showing a decreased expression in the LiTOX strain (AAEL003313 and two spots of AAEL003298). Moreover, the ALP AAEL003298 was also detected as under-transcribed in microarrays, RT-qPCR and in a previous transcriptomic study [23]. These two ALP have already been described as Cry4Ba-binding proteins [29]. The reduction of potential Cry-receptor ALPs proteins on the brush border of LiTOX larvae is consistent with the resistant phenotype.

N-Aminopeptidases (APNs) are a third major class of Cry toxin receptors in Lepidoptera [42] and mosquitoes [43,44] and their alteration correlates with Cry1A-resistance in *Helicoverpa armigera* [45] and *Trichoplusia ni* [46]. DIGE experiments revealed two spots of APN AAEL012776 being under-expressed, congruent with transcriptomic data, while another spot was over-expressed in the LiTOX strain. Two spots matching APN AAEL012774 were over-expressed in the LiTOX strain, as also found by transcriptomic approaches. These two ALP proteins have been previously described as potential receptors for Cry11Aa in *Ae. aegypti* [35] but it is still unclear how their altered expression could lead to a higher *Bti*-resistance.

In general, *Bt* resistance involves changes in the Cry receptors structure rather than in their expression [27,47], although some cases of differential expression of cadherin and aminopeptidase have been reported in resistant strains [48-50]. These changes in expression can be the result of diverse genetic mechanisms including mutations in regulatory regions or even genome rearrangements that can drive rapid adaptation to new environmental pressures such as an insecticide treatment. Moreover, in the case of *Bti*, the presence of Cyt toxins, known to act as Cry receptors [51], might contribute to overcome receptor alterations in the LiTOX strain. Further analysis of the binding capacities of Cry toxins to the putative receptors found differentially expressed here will contribute to evaluate their relative roles in *Bti* resistance. Only few studies have focused on Cry4Aa toxin binding to our knowledge [52,53] and nothing is known about its potential membrane receptors. Such experiments will determine if its receptors are highly specific, explaining the high differences in the resistance ratio between Cry4Aa and the other Cry toxins in the LiTOX strain, or if Cry4Aa shares all or a part of its receptors with Cry4Ba and Cry11Aa that could lead to cross-resistance.

### **Other mechanisms potentially involved in the resistance**

All the spots of the four ATP synthases detected by our proteomic approach showed an under-expression pattern in the LiTOX strain. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases (V-ATPase) subunits B to E are known to bind Cry4Ba [29] and subunits A and B have been described to bind for Cry1Ac in *Heliothis virescens* [54] and *Helicoverpa armigera* [55]. Moreover, V-ATPases are localized in the posterior midgut of mosquito larvae [56], where Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa toxins exhibit the highest affinity to the epithelium membrane [52,53,57,58]. Nevertheless, their role as *Bti* toxins receptors has not been demonstrated yet. V-ATPases are strongly implicated in the alkalization of the midgut pH by establishing a proton motive force by transporting proton across membranes leading to a pH gradient and transmembrane voltage [59-61]. Onken *et al.* (2008) inhibited all the proteins implicated in the alkalization process in the midgut of *Ae. aegypti* larvae and they showed that only the inhibition of V-ATPases induced a strong acidification of the midgut pH [62]. As pH affects numerous aspects of toxin action like *Bt* crystal solubility [7], toxin conformation [63,64], gut enzymes activity [65] and pore formation [66,67], an alteration of gut pH could have a general effect on reducing *Bti* toxicity. Comparing internal larval midgut pH between resistant and susceptible strains will allow to confirm/infirm if the observed ATPases decreased expression induce an acidification of the gut lumen.

Multiple detoxification enzymes were found under-transcribed in the resistant strain. Such enzymes are often involved in the degradation of small chemicals such as insecticides and plant allelochemicals [68,69], but they are unlikely to process large proteins such as *Bti* toxins. Synthesis of detoxification enzymes represents an important energetic cost for the insect [70]. Moreover, several detoxification genes found under-transcribed in our dataset, were found over-transcribed in *Ae. aegypti* larvae submitted to a chemical challenge [71].

Although the over-expression of particular detoxification genes in the resistant strain can be linked to larval response to tannins contained in the toxic leaf litter [72], the frequent under-expression of these enzymes in the resistant strain may reflect compensatory mechanisms.

## Conclusion

*Bti* has evolved to infect Diptera such as mosquitoes and blackflies through a sequential mechanism. The multi-step mode of action of *Bti* and its toxins from ingestion to spore germination and proliferation offers many resistance ways for mosquito larvae. By combining transcriptomic and proteomic approaches, we detected expression alteration at nearly each step of the ingestion-to-infection process. Our study paves the way to further functional studies to characterize resistance mechanisms to this bioinsecticide. This information will be of extreme value as this environmentally safe bioinsecticide is increasingly used for vector control worldwide with virtually no knowledge and no suspicion so far about how mosquitoes can develop resistance in the field.

## Methods

### Mosquito strains

The *Ae. aegypti* laboratory strain *Bora-Bora*, susceptible to all insecticides, was used for selection with field-collected leaf litter containing *Bti* spores and toxins [16]. This material, highly toxic after ingestion by mosquito larvae, was used for laboratory selection during 30 generations to obtain the LiTOX strain. Selection consisted in exposing 6000 third instar larvae to toxic leaf litter to obtain about 70% of larval mortality after 48 h exposure [19]. Both susceptible and resistant strains were reared in standard insectary conditions (27°C, 14/10 h light/dark period, 80% relative humidity). Larvae were reared in tap water and fed with standard amount of larval food [19,73].

### Production of individual *Bti* Cry toxins

To produce *Bti* Cry toxins separately, we used a crystal negative strain of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (4Q2-81) transformed with the plasmids pHT606, pHT618 or pWF53 producing respectively Cry4A, Cry4B and Cry11 toxins obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) or from Prof. B. Federici (University of Riverside, USA). Transformed *Bti* bacteria were grown on Nutrient Agar solid medium (Sigma Aldrich) supplemented with erythromycin antibiotic (25 µg/mL). Spores and crystals were recovered using cell scrapers (BD Falcon) after 7 days at 30°C and purified as previously described [19]. This protocol ensures producing large amount of high quality toxin. Toxins were run on SDS-PAGE with BSA at five concentrations (from 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL). Intensity of each band was estimated and toxin concentration was calculated using BSA as standard using ImageJ software v.1.41o [74].

### Bioassays

Comparative bioassays between the LiTOX and the susceptible *Bora-Bora* strains were conducted after 30 generations of laboratory selection. Larvae from each strain were exposed to 6 concentrations of Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and commercial *Bti* (Vectobac WG, 3500 ITU/mg) for 24 h to obtain 5% to 95% mortality. Bioassays were performed in triplicate on

20 third-instar larvae in 50 mL of insecticide solution or tap water (control) according to the standard bioassay procedure described by the World Health Organisation [75].  $LC_{50}$  (lethal concentration for 50% individuals) were calculated for each strain and each toxin using a probit statistical model with the module 'dose' of XLSTAT v.2009.4.06 (Addinsoft). For each toxin, resistance ratios ( $RR_{50}$ ) were calculated by dividing  $LC_{50}$  of the LiTOX strain by  $LC_{50}$  of the susceptible strain.

### **Larval midgut RNA extraction**

For each strain, three biological replicates of 150 dissected midguts from early fourth instar larvae were prepared and conserved overnight at 4°C in RNA*later*® (Ambion). After a brief centrifugation, supernatant was discarded and total RNA was extracted using RNAqueous®-4PCR kit (Ambion) following manufacturer's instructions. Quantity and quality of RNA were assessed by spectrophotometry (Nanodrop ND-1000 spectrophotometer). To digest remaining genomic DNA, RNA samples were treated with DNaseI (Ambion) following manufacturer's instructions. RNA were then concentrated using ammonium acetate and linear acrylamide to obtain at least 70 ng/μL of total RNA for each sample. Because the LiTOX strain was selected from the Bora-Bora strain, they share the same genetic background, and both were bred together in the same insectarium standard conditions, so that any constitutive change in gene expression between these strains is likely to result from *Bti* selection.

### **Larval midguts transcriptome profiling by DNA microarray**

Low Input Quick Amp Labeling Kit, two-color (Agilent), containing Cy5 and Cy3 fluorescent dyes, was used to amplify and label messenger RNA. Labeled RNAs were then purified using Absolutely RNA® Nanoprep Kit (Stratagene) following manufacturer's instructions with two elution steps in a final volume of 25 μL. Quantity and quality of RNA and labeling efficiency were assessed using Nanodrop spectrophotometer and Bioanalyzer® (Agilent).

Microarray hybridizations were performed with the 15 K Agilent '*Aedes detox chip plus*' DNA microarray (ArrayExpress accession number A-MEXP-1966), containing eight replicated arrays of 60-mers oligo-probes representing 14204 different *Ae. aegypti* transcripts and several control probes. For each biological replicate, two hybridizations were performed in which the Cy3 and Cy5 labels were swapped between samples for a total of six hybridizations. For each hybridization, 300 ng of labeled mRNA were used. After 17 h hybridization, non-specific probes were washed off according to manufacturer's instructions. Slides were scanned with an Agilent G2205B microarray scanner. Spot finding and signal quantification were performed using the Agilent Feature Extraction software (Agilent Technologies).

Data were analyzed using GeneSpring GX v9.0 software (Agilent). Only transcripts present in at least 5 hybridizations out of 6 were kept for further analyses. Transcripts exhibiting more than 3-fold transcription and a Benjamini-Hochberg [76] corrected P-value <0.01 were considered significantly differentially transcribed between the LiTOX and the susceptible strain. Midgut transcripts detected by microarrays were then classified into thirteen different categories based on their putative biological functions: receptors, transport, DNA interaction, cytoskeleton, ribosomal proteins, proteases, detoxification enzymes, kinases-phosphatases, transaminases, dehydrogenases, other enzymes, other function and unknown function. For

genes of ‘unknown function’, the putative function was further investigated using BLASTP software, but they were not considered for functional analysis.

## **Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) validation of microarray data**

Transcription levels of 15 genes detected differentially transcribed with the microarray approach were validated by RT-qPCR using the same RNA extracts used in microarrays. In addition, transcription levels of two more genes (ALP1 and Cad1) encoding known *Bti* Cry toxins binding proteins were also compared between both strains by RT-qPCR. Three technical replicates were performed for each of the three biological replicates. Specific primers were designed for each gene using Beacon Designer v.5.10 software (Premier Biosoft International) (Additional file 8). Their specificity to the target gene was verified by BLAST analysis against *Ae. aegypti* genome. First-strand cDNA synthesis was obtained from 4 µg RNA by incubating them at 50°C for 1 h with SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase, oligo-dT<sub>20</sub> primers (2.5 µM), dNTPs (0.5 mM each), DTT (5 mM) and RNase Out (40 U, Invitrogen). Real-time quantitative PCR reaction was performed in 25 µL total reaction volume with specific primers (0.3 µM each), 12.5 µL iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) and 5 µL diluted cDNA on an iQ5 system (Bio-Rad). After an initial denaturing step at 95°C for 3 min, 40 cycles were performed each consisting in a denaturing step 15 s at 95°C and an annealing step 30 s at the optimal temperature of each primers couple (Additional file 8) [22,71]. Specificity of DNA amplification was assessed by performing a melt curve analysis and verifying PCR product T<sub>m</sub>. To check for any contamination, “no template controls” (NTC) were added in each PCR plate.

For each gene analyzed, a serial dilution of pooled cDNA from both strains was used to estimate PCR efficiency. Genes encoding ribosomal proteins RPL8 and RPS7 (housekeeping genes) were used for gene expression normalization taking into account PCR efficiency using  $\Delta\Delta C_T$  method, calculated using the iQ5 software (Bio-Rad) [77,78]. Mean transcription ratios are expressed for the resistant strain relative to the susceptible strain.

## **GPI-anchor domain detection**

To see whether some midgut enzymes detected with DNA microarrays were membrane-bound, we looked for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor domains using four complementary GPI domains predictors: big-PI Predictor v.3.0 ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html)) [79], PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>) [80], FragAnchor (<http://navet.ics.hawaii.edu/~fraganchor/NNHMM/NNHMM.html>) [81] and GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) [82].

## **Brush border membrane vesicles (BBMV) preparation**

For each strain, two independent biological replicates were prepared. The day before midgut dissection, water was changed and food discarded. Early fourth instar larvae were chilled on ice for at least 20 min. Larvae were then dried on a clean paper. Midguts were dissected and mixed together in MET buffer (300 mM Mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM TrisHCl, pH 7.5) with Complete Protease Inhibitor (Roche) to be conserved at -80°C until use. About 1500 larvae were dissected for each larval strain and biological replicate. 500 µg of midguts were centrifuged 5 min at 12,000 g to discard the old buffer, resuspended in ice-cold fresh MET buffer containing 1 mM PMSF and homogenized with 30 strokes of a glass-teflon

homogenizer. BBMV were prepared following magnesium precipitation method as previously described [83]. BBMV protein concentration was determined by a Bradford assay using BSA as standard [84]. About 600 dissected guts yielded 500 µg of BBMV based on protein amount. Quality of BBMV was assessed by measuring the enrichment of two brush border enzymes: alkaline phosphatases (ALP) and aminopeptidases (APN). ALP and APN activities were measured using 4-nitrophenyl phosphate disodium and L-leucine-p-nitroanilide as substrates, respectively [85,86]. APN and ALP enrichments are obtained by dividing the activity in the final BBMV preparation by the activity in the initial midgut homogenate (Table 5).

**Table 5 APN and ALP enrichments in final BBMV preparation relative to the initial midgut homogenate. Enrichments are given for each of the two biological replicates for each strain**

Strain	Biological Replicate	APN enrichment	ALP enrichment
Susceptible	First	4.4 fold	6.1 fold
	Second	5.3 fold	1.6 fold
LiTOX	First	5.0 fold	7.1 fold
	Second	4.8 fold	3.2 fold

## 2D-DIGE

150 µg of BBMV proteins from each strain were used for each 2D-DIGE experiment and were purified using 2D-clean up kit (Amersham Bioscience) as described by the manufacturer. 100 µg of proteins were labeled with either Cy3 or Cy5 and the remaining 50 µg of proteins from the each strain were pooled and labeled with Cy2 as an internal standard. A dye swap was performed to be sure that the observed differences between the two strains were not due to different efficiencies of the dyes to label different proteins. The CyDye minimal labeling of the purified proteins was performed following manufacturer's instructions (GE Healthcare). Labeled proteins were then mixed together and diluted to a final volume of 340 µL with rehydration buffer (2 M Thiourea, 7 M Urea, 3% CHAPS, 1% SB3-10, 13 mM DTT, 1% Immobilized pH Gradient (IPG) buffer pH 4–7, 0.002% Bromophenol blue (w/v)) and loaded on an IPG strip (pH 4–7 nonlinear, 18 cm) overlaid with 2 mL of plus-one IPG strip cover fluid (GE Healthcare). After 17 h of passive rehydration, the first dimension was run on a Multiphor-II flatbed system (GE Healthcare) at 20°C with the following program: 15 min at 300 V, 15 min at 500 V, and 9 h at 3500 V. This step allows proteins to migrate on the strip till a region in which pH is equal to their pI (isoelectric point).

After the Isoelectric Focusing, strips were reduced in equilibration buffer (6 M Urea, 75 mM Tris pH 8.8, 2%SDS, 29.3% Glycerol (v/v), 0.002% Bromophenol blue (w/v)) containing 1% of DTT (w/v) for 15 min and then alkylated in equilibration buffer with 2.5% of Iodoacetamide for 15 min. The IPG strip was then transferred on a pre-casted 12.5% SDS-PAGE gel (GE Healthcare) and second dimensional electrophoresis, separating proteins in function of their molecular size, was run at 22°C for 1 h at 2.5 W/gel followed by 5 h at 17 W/gel on an Ettan DALTsix vertical electrophoresis system (GE Healthcare). DIGE Gels were scanned using a Typhoon 9400 imager (GE Healthcare). As CyDye labeling induces a size modification of 1–2% of the amount of all the proteins that could bias the protein identification, non-labeled proteins were also prepared in parallel following the same protocol (except CyDye labeling) for mass spectra analyses and regular gels were co-run with DIGE

gels to avoid modification in spot patterns due to different migrations. Regular gels were stained with Deep Purple stain (GE Healthcare), scanned using 532/610 nm excitation/emission wavelengths and used for spot picking.

### **Protein identification**

2D-DIGE gels were analyzed using Decyder v7.0 software (GE Healthcare). The Decyder detection algorithm 5.0 was used to generate a list of spots with their coordinates and level of expression in the resistant strain relative to the susceptible strain. Only spots showing at least 1.5 fold differences between the two strains were considered for further analyses. 29 spots were picked from the first biological replicate and 35 from the second one, with 8 spots shared between them. Excised spots were digested with trypsin before subjecting peptides fragments to MALDI-ToF/ToF (time-of-flight) [29]. To increase the likelihood of protein identification, each protein was identified by searching MS/MS data against an *Ae. aegypti* local database or other dipteran database when no significant match was obtained. To ensure accurate protein identification, we compared observed and expected pI values, molecular size, percentage of amino acid coverage and Mascot scores for Mascot search engine ([http://www.matrixscience.com/search\\_intro.html](http://www.matrixscience.com/search_intro.html)) or z-scores for ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu>).

### **Cadherin detection by immunoblotting**

20 µg of proteins from BBMV prepared from the susceptible Bora-Bora strain, the LiTOX strain and the UGAL strain were separated by SDS-PAGE on 4–20% gradient TGX gels (Biorad). BBMV from the UGAL strain were prepared a few days before the experiments to compare the cadherin conservation in those fresh BBMV to the previously prepared BBMV from the two other strains. Proteins were either stained with coomassie blue to control that equal amount of proteins were stained from all the strains, or electroblotted to polyvinylidene fluoride (PVDF) filters for immunoblotting. Filters were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBST (PBS + 0.1% Tween20) for 1 h at room temperature and then probed with  $\alpha$ -AgCad1 antibodies (1:5000 dilution) [87],  $\alpha$ -AgCad2 antibodies (1:500 dilution) or with pre-immune serum from the AgCad2 rabbit in PBST-0.1% BSA for 2 h.  $\alpha$ -AgCad2 antibodies were prepared against an *E. coli* expressed cadherin peptide AgCad2 (Hua *et al.*, unpublished work). Filters were then washed and detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (1:25000 dilution) in PBST-0.1% BSA for 1 h at room temperature. Filters were developed with an ECL kit (GE Healthcare) and chemiluminescence was detected with a ChemImager (Alpha Innotech). All the Western blots were performed in duplicate.

### **Larval midgut proteolytic activities**

For each strain, three biological replicates of soluble protein extracted from midgut juice were prepared. 20 midguts of early fourth instars were extracted and placed into 50 µL of distilled water and homogenized using a vortex for 30 s. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. All the supernatants from larvae of the same biological replicate were mixed together, protein concentration was quantified by a Bradford assay using BSA as standard [84] and aliquots were conserved at –20°C until use. Total protease activity was measured using azocasein as substrate (Sigma Aldrich) as described in [88]. All activities were normalized according to the amount of total protein from each replicate. For each biological replicate, six technical replicates were performed and absorbance was measured at 440 nm. Percentages of protease activity due to serine proteases, chymotrypsins, trypsin and

metallo-enzymes were measured using respectively PMSF (30 mM), TPCK (1.5 mM), TLCK (1.5 mM) and EDTA (1 mM) (Sigma Aldrich) [88]. Statistical differences between the two strains were measured by a Wilcoxon test performed with R 2.8.1 software [89].

## Abbreviations

ALP, Alkaline phosphatase; APN, N-aminopeptidase; BBMV, Brush border membrane vesicles; DIGE, Differential in gel electrophoresis; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; GPI, Glycosylphosphatidylinositol; MS/MS, Tandem mass spectrometry; PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF, Polyvinylidene fluoride; TLCK, N<sub>α</sub>-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride; TPCK, N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone

## Competing interests

The authors declare that no competing interests exist.

## Authors' contributions

J. P.D., M.J.A. and L.D. designed research; G.T. and K.B. performed DiGE experiments; K.B. did Western blot experiments; G.T., K.B. and M.J.A. analyzed proteomic data; G.T. and M.A.R. prepared mRNA samples for microarrays and did gene expression analyses; C.M.J. performed microarray experiment; G.T. performed RT-qPCR experiments; G.T. and J.P.D. analyzed transcriptomic data; G.T. and R.S. did enzymatic experiments; G.T. and M.P. performed the selection and rearing of the LiTOX strain; G.T. wrote the paper; K.B., R.S., J.P.D., M.J.A. and L.D. reviewed and helped improving the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## Authors' information

G.T. performed this study during his Ph.D. at the Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), University of Grenoble. His research interests goes from the understanding of the fate of pesticides in the field to the adaptive strategies of target insects. K.B. worked on this study during his Ph.D. tenure in the Dept. of Entomology, University of Georgia. Currently, he is a Postdoctoral Research Associate in the Dept. of Microbiology, UGA. His research interest is Oxidative protein damage and protein repair in *Helicobacter pylori*. C.M.J. is a post-doctoral researcher in the Vector Group of the LSTM where his current interests lie in vector biology and genetics with a strong emphasis on insecticide resistance. R.S. participated to this study during his Master internship at the LECA. He is interested in molecular ecology and agricultural science. M.P. participated to this study during her Ph.D. She is now a post-doc in Zurich, and is interested in population genetics, molecular adaptation and evolution. J.P.D. is a senior CNRS researcher having a strong experience in vector control and adaptive mechanisms developed by insects to insecticides, pollutants and toxins. M.J.A., a professor at the University of Georgia and CSO of InsectiGen, investigates *Bt* toxins and their action in pest insects. L.D. is a Professor at University of Grenoble. Her main research interests are in adaptive patterns in natural populations and underlying evolutionary processes.

## Acknowledgments

The authors would like to thank B. Federici for providing recombinant *Bt* strains. They also thank E. Bianco, A. Bonin and A. Proust for their help for larval midgut dissections. They thank S. Veyrenc and T. Gaude for technical assistance with mosquito breeding and insectary maintenance. They thank Dr. B. MacCallum for useful help with microarray data deposition in Vectorbase. This study was founded by the French National Research Agency (ANR, project ANR-08-CES-006-01 DIBBECO). Guillaume Tetreau was supported by the French Ministry of Research.

## References

1. Hemingway J, Ranson H: **Insecticide resistance in insect vectors of human disease.** *Annu Rev Entomol* 2000, **45**:371–391.
2. Thai KTD, Anders KL: **The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue.** *Exp Biol Med* 2011, **236**(8):944–954.
3. Weaver SC, Reisen WK: **Present and future arboviral threats.** *Antivir Res* 2010, **85**(2):328–345.
4. Kyle JL, Harris E: **Global spread and persistence of dengue.** *Annu Rev Microbiol* 2008, **62**:71–92.
5. Tomori O: **Yellow fever: the recurring plague.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004, **41**(4):391–427.
6. van den Berg H: **Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease.** *Cienc Saude Coletiva* 2011, **16**(2):575–590.
7. Lacey LA: ***Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control.** *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**(2):133–163.
8. Bravo A, Gill SS, Soberon M: **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon* 2007, **49**(4):423–435.
9. Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberon M: ***Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide.** *Insect Biochem Mol Biol* 2011, **41**(7):423–431.
10. Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, Dunbar MW: **Field-evolved resistance to *Bt* maize by Western corn rootworm.** *PLoS One* 2011, **6**(7):e22629.
11. Dhurua S, Gujar GT: **Field-evolved resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India.** *Pest Manag Sci* 2011, **67**(8):898–903.
12. Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carriere Y: **Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data.** *J Econ Entomol* 2009, **102**(6):2011–2025.

13. Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM: **Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico.** *J Econ Entomol* 2010, **103**(4):1031–1038.
14. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG: **Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York.** *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21**(3):305–309.
15. Wirth MC, Park HW, Walton WE, Federici BA: **Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(1):185–189.
16. Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P, Geremia RA, Gury J: **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats.** *PLoS One* 2008, **3**(10).
17. de Melo-Santos MAV, de Araujo AP, Rios EMM, Regis L: **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling.** *Biol Control* 2009, **49**(2):186–191.
18. Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M: **Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks.** *Food Microbiol* 2010, **27**(3):347–355.
19. Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J-P: **Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes.** *Pest Manag Sci* 2011, **67**:122–128.
20. Goldman IF, Arnold J, Carlton BC: **Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*.** *J Invertebr Pathol* 1986, **47**(3):317–324.
21. Mittal PK, Adak T, Subbarao SK: **Laboratory selection to investigate the development of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae).** *Natl Acad Sci Lett-India* 2005, **28**(7-8):281–283.
22. Bonin A, Paris M, Tetreau G, David JP, Despres L: **Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations.** *BMC Genomics* 2009 **10**.
23. Paris M, Melodelima C, Coissac E, Tetreau G, Reynaud S, David JP, Despres L: **Transcription profiling of resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing.** *J Invertebr Pathol* 2012, **109**(2):201–208.
24. Paris M, David JP, Despres L: **Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*.** *Ecotoxicology* 2011.
25. Georghiou GP, Wirth MC: **Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito**

*Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**(3):1095–1101.

26. Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM: **Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.** *J Appl Entomol-Zeitschrift Fur Angew Entomol* 2003, **127**(1):29–32.

27. Griffiths JS, Aroian RV: **Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins.** *BioEssays* 2005, **27**(6):614–624.

28. Popova-Butler A, Dean DH: **Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles.** *J Insect Physiol* 2009, **55**(3):264–272.

29. Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ: **Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**(4):279–286.

30. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R: **Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):1720–1730.

31. De Wit M, Keil D, van der Ven K, Vandamme S, Witters E, De Coen W: **An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 alpha-ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*).** *Gen Comp Endocrinol* 2010, **167**(2):190–201.

32. Foss EJ, Radulovic D, Shaffer SA, Goodlett DR, Kruglyak L, Bedalov A: **Genetic variation shapes protein networks mainly through non-transcriptional mechanisms.** *PLoS Biol* 2011, **9**(9):e1001144.

33. Likitvivatanavong S, Chen JW, Evans AM, Bravo A, Soberon M, Gill SS: **Multiple receptors as targets of cry toxins in mosquitoes.** *J Agric Food Chem* 2011, **59**(7):2829–2838.

34. Chen JW, Aimanova KG, Fernandez LE, Bravo A, Soberon M, Gill SS: ***Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*.** *Biochem J* 2009, **424**:191–200.

35. Chen JW, Aimanova KG, Pan SQ, Gill SS: **Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**(10):688–696.

36. Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberon M: **A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae.** *Biochem J* 2006, **394**:77–84.

37. McNall RJ, Adang MJ: **Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis.** *Insect Biochem Mol Biol* 2003, **33**(10):999–1010.

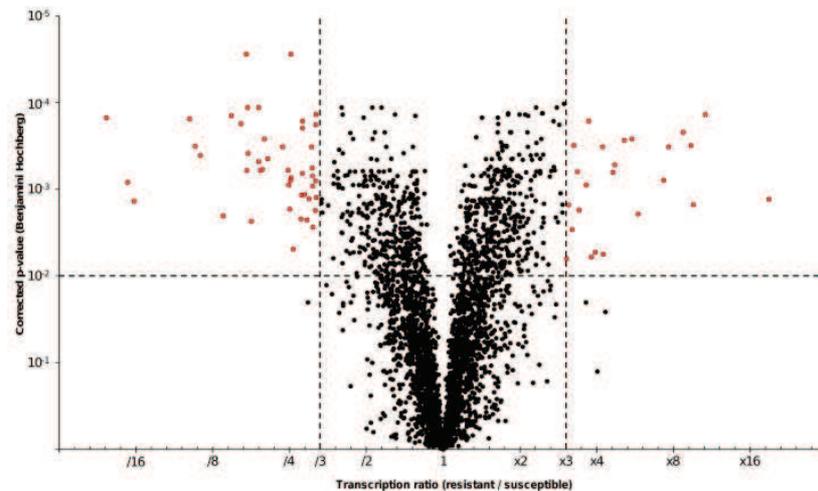
38. Arenas I, Bravo A, Soberon M, Gomez I: **Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin.** *J Biol Chem* 2010, **285**(17):12497–12503.
39. Martins ES, Monnerat RG, Queiroz PR, Dumas VF, Braz SV, Aguiar RWD, Gomes A, Sanchez J, Bravo A, Ribeiro BM: **Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2010, **40**(2):138–145.
40. Hua G, Zhang R, Bayyareddy K, Adang MJ: ***Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* jegathesan Cry11Ba toxin.** *Biochemistry* 2009, **48**(41):9785–9793.
41. Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning CM, Liu CX, Wu KM, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, *et al*: **Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to Lepidopteran strains resistant to cry toxins from *Bacillus thuringiensis*.** *PLoS One* 2011, **6**(3).
42. Pigott CR, Ellar DJ: **Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**(2):255.
43. Abdullah MAF, Moussa S, Taylor MD, Adang MJ: ***Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*.** *Pest Manag Sci* 2009, **65**(10):1097–1103.
44. Saengwiman S, Aroonkesorn A, Dedvisitsakul P, Sakdee S, Leetachewa S, Angsuthanasombat C, Pootanakit K: **In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **407**(4):708–713.
45. Zhang SP, Cheng HM, Gao YL, Wang GR, Liang GM, Wu KM: **Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**(7):421–429.
46. Tiewisiri K, Wang P: **Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(34):14037–14042.
47. Ferre J, Escrache B, Bel Y, Vanrie J: **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus-thuringiensis* insecticidal crystal proteins.** *FEMS Microbiol Lett* 1995, **132**(1–2):1–7.
48. Yang YL, Zhu YC, Ottea J, Husseneder C, Leonard BR, Abel C, Luttrell R, Huang FN: **Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*.** *PLoS One* 2011, **6**(10):e25783.

49. Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA: ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes.** *BMC Genomics* 2005, **6**.
50. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ: **Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae.** *Eur J Biochem* 2004, **271**(15):3127–3135.
51. Perez C, Fernandez LE, Sun JG, Folch JL, Gill SS, Soberon M, Bravo A: ***Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(51):18303–18308.
52. Ravoahangimalala O, Charles JF: ***In-vitro* binding of *Bacillus-thuringiensis* var *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles-gambiae* larvae (Diptera, Culicidae).** *FEBS Lett* 1995, **362**(2):111–115.
53. Yamagiwa M, Kamauchi S, Okegawa T, Esaki M, Otake K, Amachi T, Komano T, Sakai H: **Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical microvilli of larval midgut of *Culex pipiens*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2001, **65**(11):2419–2427.
54. Krishnamoorthy M, Jurat-Fuentes JL, McNall RJ, Andacht T, Adang MJ: **Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses.** *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**(3):189–201.
55. Chen LZ, Liang GM, Zhang J, Wu KM, Guo YY, Rector BG: **Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hubner).** *Arch Insect Biochem Physiol* 2010, **73**(2):61–73.
56. Harvey WR, Okech BA, Linser PJ, Becnel JJ, Ahearn GA, Sterling KM: **H<sup>+</sup> V-ATPase-energized transporters in brush border membrane vesicles from whole larvae of *Aedes aegypti*.** *J Insect Physiol* 2010, **56**(10):1377–1389.
57. Ravoahangimalala O, Charles JF, Schoellerraccaud J: **Immunological localization of *Bacillus-thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles-gambiae* larvae (Diptera, Culicidae).** *Res Microbiol* 1993, **144**(4):271–278.
58. Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S: ***In vivo* binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae).** *Memorias Do Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**(1):73–79.
59. Onken H, Moffett DF: **Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalinization in the anterior midgut of larval mosquitoes.** *J Exp Biol* 2009, **212**(3):373–377.
60. Boudko DY, Moroz LL, Linser PJ, Trimarchi JR, Smith PJS, Harvey WR: **In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using noninvasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes.** *J Exp Biol* 2001, **204**(4):691–699.
61. Beyenbach KW, Wiczorek H: **The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation.** *J Exp Biol* 2006, **209**(4):577–589.

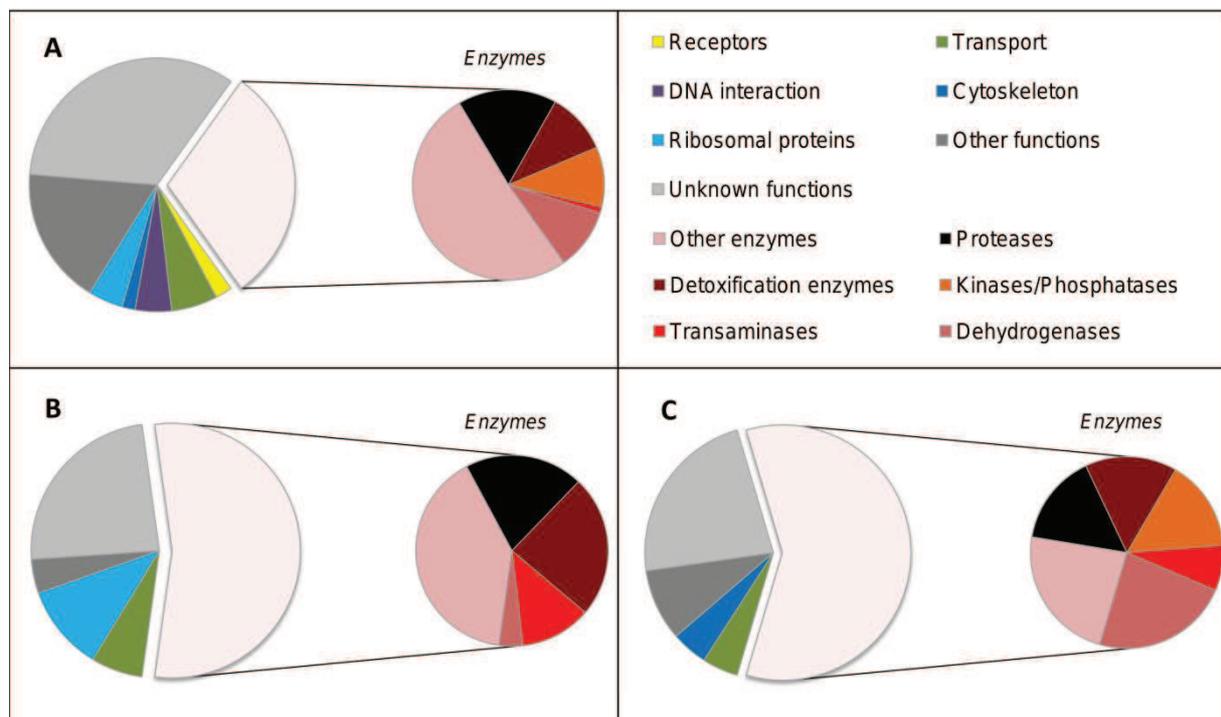
62. Onken H, Moffett SB, Moffett DF: **Alkalinization in the isolated and perfused anterior midgut of the larval mosquito, *Aedes aegypti*.** *J Insect Sci (Online)* 2008, **8**:1–20.
63. Feng Q, Becktel WJ: **pH-induced conformational transitions of Cry IA(a), Cry IA(c), and Cry IIIA delta-endotoxins in *Bacillus-thuringiensis*.** *Biochemistry* 1994, **33**(28):8521–8526.
64. Venugopal MG, Wolfersberger MG, Wallace BA: **Effects of pH on conformational properties related to the toxicity of *Bacillus-thuringiensis* delta-endotoxin.** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1159**(2):185–192.
65. Karumbaiah L, Oppert B, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ: **Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* 2007, **146**(1):139–146.
66. Tran LB, Vachon V, Schwartz JL, Laprade R: **Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(10):4488–4494.
67. Fortier M, Vachon V, Kirouac M, Schwartz JL, Laprade R: **Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins.** *J Membr Biol* 2005, **208**(1):77–87.
68. Despres L, David JP, Gallet C: **The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals.** *Trends Ecol Evol* 2007, **22**(6):298–307.
69. Feyereisen R: **Insect CYP genes and P450 enzymes.** In *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Edited by Gilbert LI.; 2011:236–316.
70. Zeng RS, Wen Z, Niu G, Schuler MA, Berenbaum MR: **Enhanced toxicity and induction of cytochrome P450s suggest a cost of “eavesdropping” in a multitrophic interaction.** *J Chem Ecol* 2009, **35**(5):526–532.
71. Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP: **Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(5):540–551.
72. David JP, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H, Dauphin-Villemant C: **Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics.** *Insect Biochem Mol Biol* 2006, **36**(5):410–420.
73. Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David JP: **Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics.** *Aquat Toxicol* 2009, **93**(1):61–69.
74. Girish V, Vijayalakshmi A: **Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ.** *Indian J Cancer* 2004, **41**(1):47.

75. WHO: *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. Geneva: World Health Organization; 2005. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
76. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing**. *J R Stat Soc Ser B-Methodol* 1995, **57**(1):289–300.
77. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9).
78. Poupardin R, Riaz MA, Vontas J, David JP, Reynaud S: **Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti***. *Insect Mol Biol* 2010, **19**(2):185–193.
79. Eisenhaber B, Bork P, Yuan YP, Löffler G, Eisenhaber F: **Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C-elegans***. *Trends in Biochem Sci* 2000, **25**(7):340–341.
80. Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R: **PredGPI: a GPI-anchor predictor**. *BMC Bioinforma* 2008, **9**.
81. Poisson G, Chauve C, Chen X, Bergeron A: **FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring**. *Genomics, Proteomics bioinforma / Beijing Genomics Inst* 2007, **5**(2):121–130.
82. Fankhauser N, Maser P: **Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map**. *Bioinformatics* 2005, **21**(9):1846–1852.
83. Abdul-Rauf M, Ellar DJ: **Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from whole *Aedes aegypti* larvae**. *J Invertebr Pathol* 1999, **73**(1):45–51.
84. Bradford MM: **Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem* 1976, **72**(1–2):248–254.
85. Terra WR, Ferreira C: **Insect digestive enzymes—properties, compartmentalization and function**. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* 1994, **109**(1):1–62.
86. Hernandez-Martinez P, Navarro-Cerrillo G, Caccia S, de Maagd RA, Moar WJ, Ferre J, Escrache B, Herrero S: **Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in *Bt*-resistant *Spodoptera exigua***. *PLoS One* 2010, **5**(9).
87. Hua G, Zhang R, Abdullah MAF, Adang MJ: ***Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity**. *Biochemistry* 2008, **47**(18):5101–5110.
88. Hosseiniaveh V, Bandani A, Azmayeshfard P, Hosseinkhani S, Kazzazi M: **Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera)**. *J Stored Prod Res* 2007, **43**:515–522.
89. R Development Core Team: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2007. <http://www.R-project.org>.

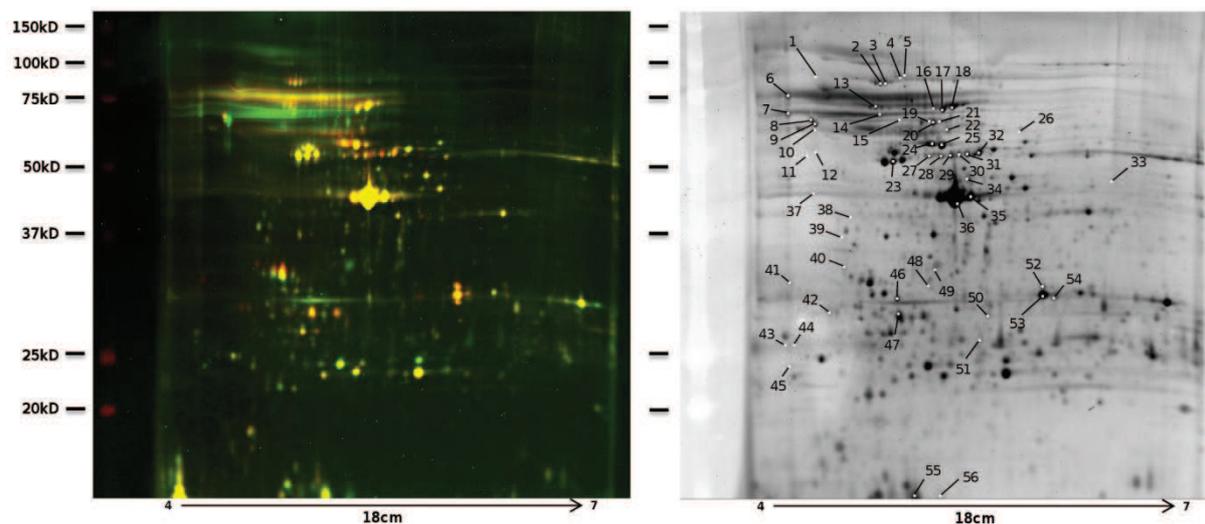
## Figures



**Figure 1. Volcano plot of differentially-transcribed genes identified by microarray analysis.** The Benjamini-Hochberg P-values were plotted against the fold change in gene expression for all genes. The horizontal lines in the plot represent the statistical test significance 0.01 and the vertical bars represent the genes at least three-fold up- or down-regulated in LiTOX *Bti*-resistant strain compared to Bora-Bora susceptible strain.



**Figure 2. Functional analyses of all the genes detected and genes differentially expressed in the resistant strain.** Circle charts of the biological functions of all the genes detected (A), those under-expressed (B) and over-expressed (C) in the LiTOX strain compared to the susceptible Bora-Bora strain. Genes are classified into 13 categories: receptors (orange), transport (green), DNA interaction (purple), cytoskeleton (dark blue), ribosomal proteins (light blue), proteases (black), detoxification enzymes (brown), kinases/phosphatases (orange), transaminases (red), dehydrogenases (dark pink), other enzymes (pink), other functions (dark grey) and unknown functions (light grey).

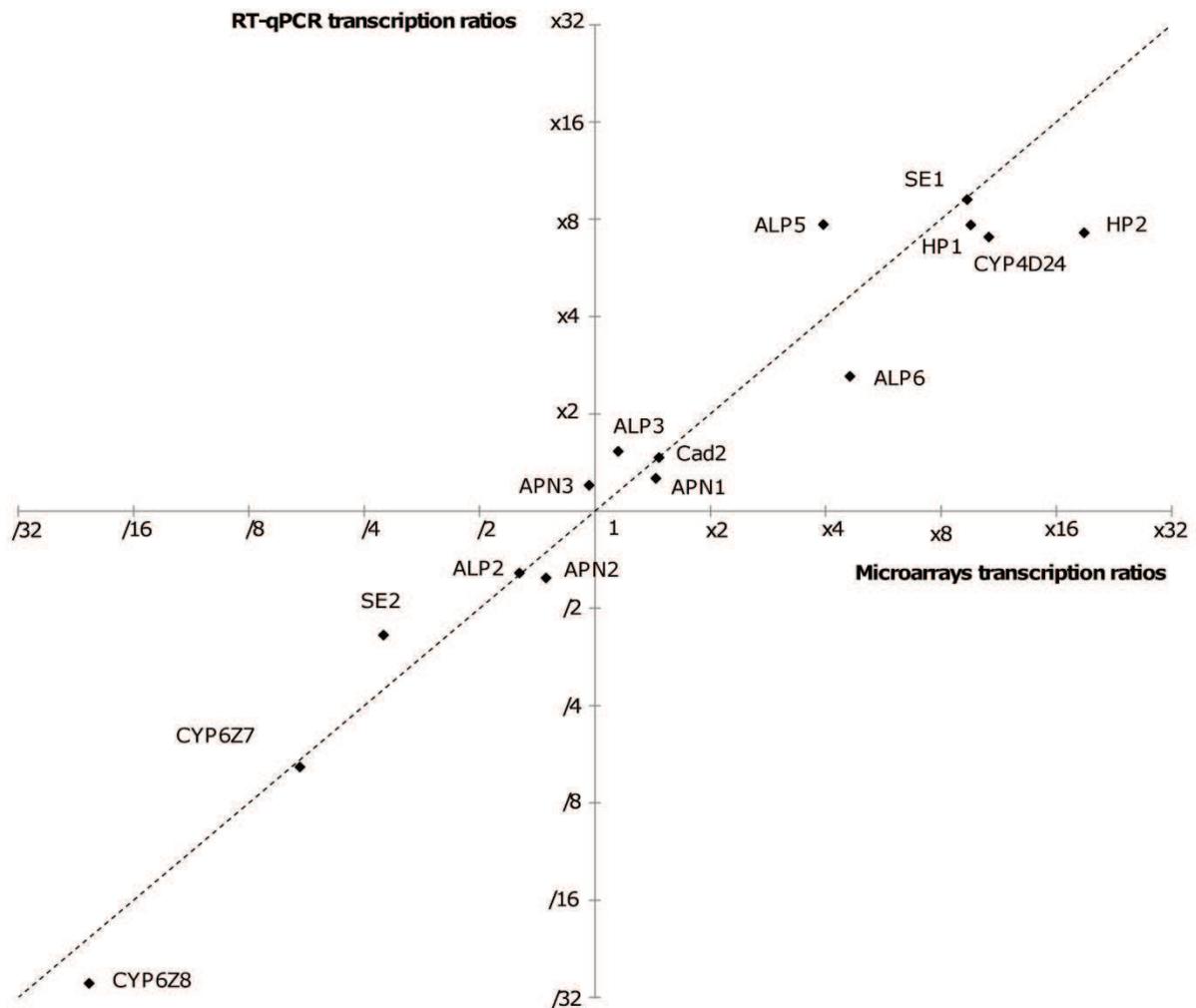


**Figure 3. 2D-DIGE gel and corresponding picked silver stained gel.** BBMV proteins were prepared from resistant and susceptible *Aedes aegypti* larval midguts and separated using 2D-DIGE. The spots appear in yellow when corresponding to proteins present at approximately equal amounts in both resistant and susceptible BBMV samples, green for those only present in the susceptible BBMV labeled with Cy3, and red for those only present in the resistant BBMV labeled with Cy5. The x-axis shows pI values from 4 to 7 and the y-axis shows apparent molecular weight in kilodaltons (kDa). Panel A. Overlay of Cy3 and Cy5, and Panel B. Gel co-run stained with deep purple. All the 56 spots picked either on the first, the second or both the two gels, corresponding to the two biological replicates, are noted on this gel.

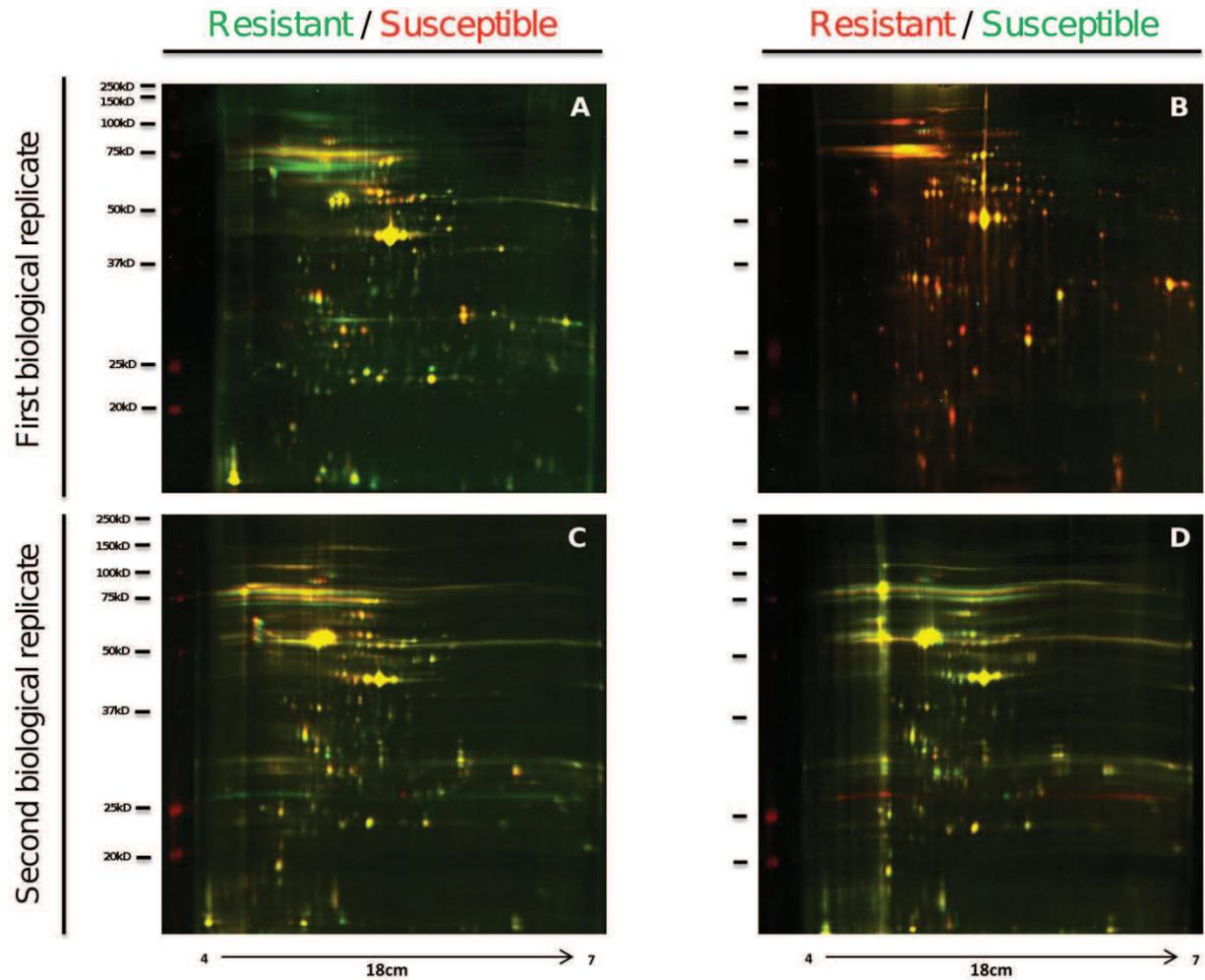
## Additional Files

### Additional file 3. Validation of microarray data by RT-qPCR on fifteen selected genes.

Both experiments were performed on the same mRNA extracted from dissected larval midguts. ALP2, Alkaline phosphatase AAEL003298; ALP3, AAEL003313; ALP5, AAEL015070; ALP6, AAEL011175; APN1, N-Aminopeptidase AAEL012774; APN2, AAEL012776; APN3, AAEL012778; Cad2, Cadherin AAEL007488; HP1, Conserved hypothetical protein AAEL010435; HP2, AAEL013584; SE1, Serine-type endopeptidase AAEL007938; SE2, Serine-type endopeptidase AAEL011917; Cytochrome P450: *CYP6Z7*, AAEL009130; *CYP6Z8*, AAEL009131 and *CYP4D24*, AAEL007815.



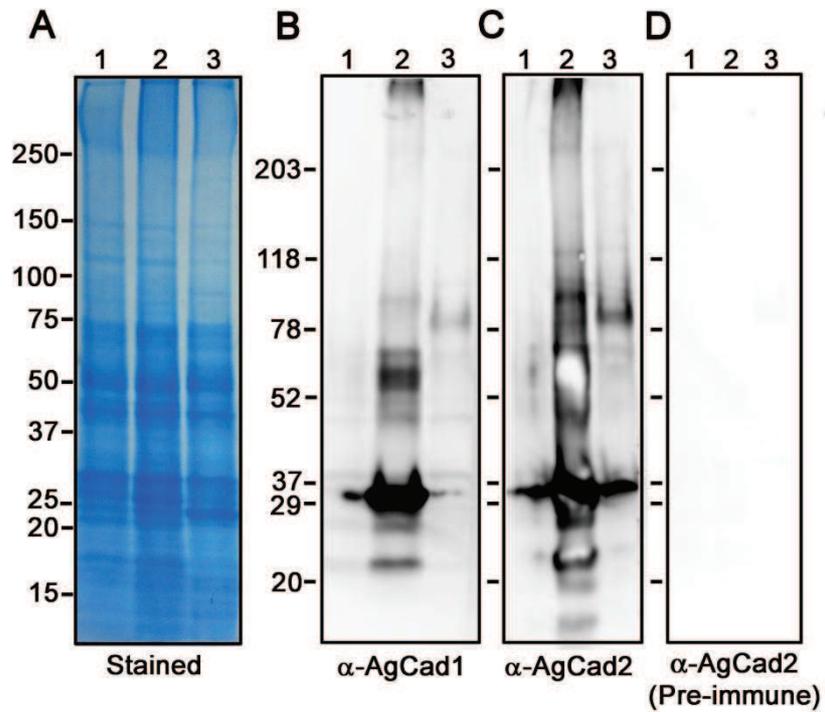
**Additional file 4. 2D-DIGE gels from the two biological replicates and dye-swapping.** BBMV prepared from first (A and B) and second (C and D) biological replicate are separated in function of their size (kDa) and their isoelectric point (pI). BBMV from *Bti* resistant strain are labeled with Cy3 and susceptible strain with Cy5 (A and C) or resistant strain with Cy5 and susceptible with Cy3 (B and D).



**Additional file 6. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor domains detection by four predictive computational programs.** For each gene and protein, their accession number, the transcript and protein sizes are indicated. Results from the big-GPI and GPI-SOM softwares are indicated as 'YES' when they found a potential GPI-domain and 'NO' when no GPI-domain was determined. For PredGPI, presence is indicated by 'Highly probable', 'Weakly probable' or 'Probable' and absence by 'NO'. For FragAnchor, presence of GPI domain is indicated by 'Highly probable' or 'Probable', absence by 'NO' and when prediction is uncertain by 'Potential false positive'.

Description	Evidence level	Transcript size (bp)	Protein size (aa)	GPI-anchor detection			
				big-GPI	PredGPI	FragAnchor	GPI-SOM
alkaline phosphatase	protein	1 841	556	YES	Highly Probable	Potential False Positive	YES
alkaline phosphatase	protein	1 695	520	NO	NO	NO	YES
alkaline phosphatase	transcript	1 091	297	YES	Probable	Highly probable	YES
alkaline phosphatase	transcript	1 628	535	YES	Probable	Highly probable	YES
metalloproteinase, putative	transcript	834	277	NO	NO	NO	YES
metalloproteinase, putative	transcript	834	277	NO	NO	NO	YES
metalloproteinase, putative	transcript	834	277	NO	NO	NO	NO
metalloproteinase, putative	transcript	834	277	NO	NO	NO	YES
serine-type endopeptidase	transcript	907	256	NO	NO	NO	YES
serine-type endopeptidase	transcript	918	254	NO	NO	NO	NO
trypsin	transcript	886	271	NO	NO	NO	YES

**Additional file 7. Cadherin detection by immunoblotting.** BBMV proteins from the susceptible Bora-Bora strain (lane 1), LiTOX strain (lane 2) and the UGAL Aedes strain (lane 3) were separated in SDS-PAGE and stained with coomassie blue (panel A) or probed with  $\alpha$ -AgCad1 antibodies (panel B),  $\alpha$ -AgCad2 antibodies (panel C) or with pre-immune serum from  $\alpha$ -AgCad2 rabbit (panel D).



**Additional file 8. Primer pairs used for RT-qPCR analyses.** For each primer pair, sequence, corresponding gene name and accession number, product length, T<sub>m</sub> and optimal annealing temperature used in PCR program are indicated. PCR efficiency and different parameters of the calibration curves (R<sup>2</sup>, slope and y-intercept) are also indicated. Specificity of each primer pair was first assessed by BLAST analysis against *Ae. aegypti* genome and then verified by performing a melt curve analysis. A high specificity is indicated as “YES” when the primer pair matched to a unique position in the *Ae. aegypti* genome and when PCR product T<sub>m</sub> was correct.

Gene	Vectorbase Access Number	Sequence Forward Primer (5' - 3')	Sequence Reverse Primer (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Calibration curves			Specificity (melt curve & BLAST)	
					PCR Efficiency	R <sup>2</sup>	Slope		y-intercept
Alkaline phosphatase (ALP1)	AAEL000931	GCTGAGGGAGGTCGTTGAACTG	TGATGAGCGGTGTCGTCCAAGTC	56	102.00%	0.998	-3.274	18.917	YES
Alkaline phosphatase (ALP2)	AAEL003298	GACCCACGGAGGAGAGGATG	CTCCAACACATAGAGCGTAGGC	57	99.60%	0.995	-3.332	14.833	YES
Alkaline phosphatase (ALP3)	AAEL003313	GCGTTTGGCACTGGAAGAGAC	TCCGTTGTAGGTGTCATCGTGTGG	56	97.40%	0.998	-3.385	15.329	YES
Alkaline phosphatase (ALP4)	AAEL009077	TTCTTGGAGTCAGTGGGTGTCATC	TGTTGGTCAGCATCTCTTCGG	56	100.20%	0.997	-3.317	17.473	YES
Alkaline phosphatase (ALP5)	AAEL015070	ACCTTAGTCTTGCTTACGGCTAC	CCTCGCTCATTGGAACGG	56	100.10%	0.998	-3.320	17.519	YES
Alkaline phosphatase (ALP6)	AAEL011175	AGCATTCTGGTCGGTGATATTCG	GGCAAATATAAGCAGCAGGGTTC	59	93.30%	0.993	-3.495	27.369	YES
Cadherin (Cad1)	AAEL007478	CGAGACGCTGTTCCCTCACG	ACGAACCGATCTACTTCCAACG	56	98.60%	0.998	-3.356	17.271	YES
Cadherin (Cad2)	AAEL007488	CACAAAAGGACGATGGGCTTAG	GCGGGAATTCGGGCTTCG	56	104.30%	0.997	-3.223	19.023	YES
Conserved hypothetical protein (HP1)	AAEL010435	TGGTCGGTGTAGCAATTCGTTAC	AAGAACTCTTGGAACTCCTTGTCG	60	96.10%	0.999	-3.418	17.225	YES
Conserved hypothetical protein (HP2)	AAEL013584	CAAGCATCAGATACATCACAAATCG	GGACGGCTGAGGCGGTAG	58	100.80%	0.999	-3.304	20.367	YES
Cytochrome P450 - CYP4D24	AAEL007815	CGAATTGGGCTGCTTTGGAG	CGTGCCGGAATCAAGAGTTTG	60	98.20%	0.998	-3.365	17.374	YES
Cytochrome P450 - CYP6Z7	AAEL009130	CGATTTGTTGAGTACACGATTC	TGTAGAGTCTTGCGGGGAAG	53	93.20%	0.998	-3.495	21.379	YES
Cytochrome P450 - CYP6Z8	AAEL009131	ACCATTACGCCCATCTCTG	AGGTTGTGATCCCATTCG	53	92.40%	0.998	-3.517	20.776	YES

Gene	Vectorbase Access Number	Sequence Forward Primer (5' - 3')	Sequence Reverse Primer (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Calibration curves			Specificity (melt curve & BLAST)	
					PCR Efficiency	R <sup>2</sup>	Slope		y-intercept
N-Aminopeptidase (APN1)	AAEL012774	AGTCTGCTGCCAAGGAAG	AATGCTGCTGTCTGAATACG	56	98.60%	0.998	-3.356	14.186	YES
N-Aminopeptidase (APN2)	AAEL012776	CCTGCTTGCCACTTATGGTCTC	TGGGCTGCTTCCGCTTGG	57	92.80%	1.000	-3.509	15.214	YES
N-Aminopeptidase (APN3)	AAEL012778	CGGCGAGATTAAGTGGACTGC	TCCTTGACGGTGACTCCTTCTG	56	93.20%	1.000	-3.497	12.259	YES
Ribosomal Protein L8 (RPL8)	AAEL000987	CTGAAGGGAACCGTCAAGCAA	TCGGCGGCAATGAACAACCT	55.5	94.80%	0.998	-3.452	12.286	YES
Ribosomal Protein S7 (RPS7)	AAEL009496	GTTGGAGATGAACTCGGACCTG	GCCTTCTTGCTGTTGAACTCG	55.5	96.30%	0.993	-3.415	17.478	YES
Serine-type endopeptidase (SE1)	AAEL007938	CGTCTCGTGGGGCATTCC	GCATCAAGGGCTCGTTATACCG	57.5	93.90%	0.999	-3.477	16.350	YES
Serine-type endopeptidase (SE2)	AAEL011917	TTAAGACGAGTCATCTGTGGAG	AGAGACGATAACATGCGGGCTAC	57.5	92.20%	0.997	-3.525	17.922	YES

# Article VI

---

**Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter.**

TETREAU, G., STALINSKI, R., KERSUSAN, D., VEYRENC, S., DAVID, J. P., REYNAUD, S., DESPRES, L.

*Applied and Environmental Microbiology* 78:15 (2012)



## Decreased Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquito Larvae after Contact with Leaf Litter

AQ: A

 AQ: au **Guillaume Tetreau, Renaud Stalinski, Dylann Kersusan, Sylvie Veyrenc, Jean-Philippe David, Stéphane Reynaud, and Laurence Després**

Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grenoble, Grenoble, France

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is a bacterium producing crystals containing Cry and Cyt proteins, which are toxic for mosquito larvae. Nothing is known about the interaction between crystal toxins and decaying leaf litter, which is a major component of several mosquito breeding sites and represents an important food source. In the present work, we investigated the behavior of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxic crystals sprayed on leaf litter. In the presence of leaf litter, a 60% decrease in the amount of Cyt toxin detectable by immunology (enzyme-linked immunosorbent assays [ELISAs]) was observed, while the respective proportions of Cry toxins were not affected. The toxicity of Cry toxins toward *Aedes aegypti* larvae was not affected by leaf litter, while the synergistic effect of Cyt toxins on all *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins was decreased by about 20% when mixed with leaf litter. The toxicity of two commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strains (VectoBac WG and VectoBac 12AS) and a laboratory-produced *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain decreased by about 70% when mixed with leaf litter. Taken together, these results suggest that Cyt toxins interact with leaf litter, resulting in a decreased toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* in litter-rich environments and thereby dramatically reducing the efficiency of mosquitocidal treatments.

AQ: B

The bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is increasingly used worldwide for mosquito control as an environmentally safe alternative to chemicals. Its toxicity to mosquito larvae is due to a composite crystal produced during the sporulation of the bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (23). This toxic crystal contains four major toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa) assembled in three different inclusion types held together by a lamellar envelope (13). Cry toxins are able to spontaneously form spherical (Cry4Aa and Cry4Ba) or rhomboidal (Cry11Aa) crystals, while the crystallization of Cyt toxins requires the presence of accessory proteins (35). Commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulations are mixtures of cells, spores, and parasporal crystals that are sprayed in mosquito breeding sites. After ingestion by mosquito larvae, crystals are solubilized in the alkaline pH of the gut and soluble toxins are activated by gut enzymes. Cry toxins then bind to specific membrane receptors, oligomerize, and perforate the intestinal membrane, leading to larval death, while Cyt toxins do not need receptors to perforate the membrane (4, 5).

Despite an intensive use of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* for years, no firm case of resistance has been described in the field (23, 25). This is imputed to Cyt toxins, which are known to synergize Cry toxin activity, leading to drastically decreased resistance development (4, 46). Cyt toxins are also able to synergize and overcome resistance to other insecticides, such as *Bacillus sphaericus*, in *Culex quinquefasciatus* (43, 47). Developments of new insecticides aim to combine toxins from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. sphaericus*, and *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* to obtain more-toxic bioinsecticides (11, 28). Cyt toxins are key proteins in these recombinants, promising to enable a long-term use of these new insecticides by decreasing the possibility of resistance development in field mosquito populations (12, 28). Even if the precise mechanism of synergism remains mostly unknown, it has been suggested that Cyt toxins enhance Cry toxin oligomerization and fixation to the intestinal membrane, notably by acting as a "recep-

AQ: C

tor" after its nonspecific insertion into the intestinal membrane (7, 31, 32).

*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* is often said to have low persistence in the field because of a rapid decrease of toxicity and of the amount of spores recovered a few weeks after spraying (17, 18). This lack of residual activity is due mainly to the low stability of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins under field conditions, notably in organic enriched habitats and when exposed to UV light, heat, changes in pH, or bacterial degradation (21, 23). Recently, an increasing number of studies have shown that *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* can persist and even proliferate in the field (9, 36, 38). In the laboratory, the selection of *Aedes aegypti* larvae with field-persistent *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* present in decaying leaf litter induced multiple resistances to *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins, suggesting a differential persistence of the toxins (29). To our knowledge, there is no study on the behavior of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins in leaf litter, which is one of the main constituents of several mosquito breeding sites and mosquitoes' main food source. Some publications showed that activated *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins can rapidly be adsorbed on clay (in a few hours), which increases their persistence and conserves their toxicity to mosquito larvae (16, 24). The persistence in soil of Cry toxins produced by other *B. thuringiensis* strains active against lepidopteran and coleopteran larvae is also well documented, with the *B. thuringiensis* Cry toxins exhibiting the same pattern of rapid adsorption as the

Received 20 March 2012 Accepted 8 May 2012

Published ahead of print ●●●

Address correspondence to Guillaume Tetreau, guillaume.tetreau@gmail.com.

 Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00903-12

*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins (19, 20). Nevertheless, all these studies have been performed on solubilized and activated toxins. In contrast, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, and also some formulations of other *B. thuringiensis* subspecies, are sprayed in the field as a mixture of crystals and spores. To our knowledge, only one study has evaluated the persistence of crystal Cry toxins sprayed with commercial *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, which is used to protect cork oak stands in Sardinia (Italy): the toxin can persist up to 28 months after being sprayed into soils (40). Nothing is known about the behavior in the field of the four main *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins in their crystal forms.

Here we characterized the behavior of individual and composite *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin crystals in water alone and in contact with leaf litter during 7 days. We show that the Cyt toxin amount detectable rapidly decreases (by 60%) when in contact with leaf litter and that its synergistic effect on each individual Cry toxin also decreases (by about 20%). Furthermore, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* composite crystals show a decrease in toxicity by about 70% when in contact with leaf litter. All these results shed light on differential *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin persistence in the field and suggest that *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* treatment efficiency is strongly related to environmental characteristics of the mosquito breeding sites.

## MATERIALS AND METHODS

**Mosquito strains.** An *Aedes aegypti* Bora-Bora laboratory strain, susceptible to all insecticides, was used for the bioassays. Larvae were reared in tap water and fed with standard amounts of larval food in standard insectary conditions (27°C, 14-h-light/10-h-dark periods, 80% relative humidity).

**Bacterial strains and toxin production.** Protoxins were produced separately using a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (4Q2-81) transformed with the plasmids pHT606, pHT618, pWF53, and pWF45 for Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa, respectively (10, 30, 48). These strains were obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) or from B. Federici (University of California, Riverside). Spores and crystal suspensions were produced as previously described (29) and conserved in water at -20°C until use. Toxins were quantified on SDS-PAGE using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The intensity of each band was estimated, and toxin concentrations were calculated using ImageJ software v.1.41o (15). The same protocol was used to produce wild-type *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* inclusion bodies after having isolated spores from the commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* VectoBac WG strain in order to remove the commercial formulation effect.

***B. thuringiensis* subsp. *israelensis* extraction and detection by ELISA.** Crystal toxins were solubilized using an alkaline buffer (pH 10.8) containing Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mM) and dithiothreitol (DTT) (10 mM) and were incubated at 60°C for 1 h. Solubilized toxins were then purified using the ion-exchange column HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Biosciences) and desalted using the HiPrep 26/10 desalting column (Amersham Biosciences). Toxins were lyophilized and conserved at -20°C until use. Before use, lyophilized toxins were resuspended into distilled water and toxin concentrations were determined by a Bradford assay using BSA as a standard (3). Two aliquots were then used in duplicate as standards for each enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at concentrations ranging from 2 to 500 ng/ml.

Leaf litters were collected in mosquito breeding sites never treated with *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* in the French Rhône-Alpes region. They were constituted of leaves mainly of *Quercus* sp. and some of *Alnus glutinosa*, and their pH was nearly neutral (6.8). The litters were contaminated with commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (VectoBac WG,

3,500 international toxic units [ITU] · mg<sup>-1</sup>) and left to dry overnight at room temperature in order to be able to powder them, a necessary step for subsequent reproducible toxin extraction. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins were then extracted using the extraction procedure described in French patent no. FR1160365. This extraction procedure is highly reproducible for each toxin (see Fig. S1 in the supplemental material) and for a large range of concentrations, suggesting that the extraction procedure in itself has no impact on the integrity of the toxins. The detection of toxins was performed by sandwich ELISAs using anti-Cry4 (Cry4Aa and Cry4Ba), anti-Cry11 (Cry11Aa), and anti-Cyt (Cyt1Aa) antibodies as described in reference 27, with slight modifications. Goat anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase (CliniSciences) were used to detect anti-toxin antibodies. One hundred microliters of Ultra-TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (Thermo Scientific) was added, and the reaction was stopped by adding sulfuric acid 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) after 3 min (Cry4) or 5 min (Cry11 and Cyt) of the reaction. Optical densities were measured at 450 nm.

To calculate the amounts of the toxins that bound to the litter, their initial proportions in commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* were estimated by solubilizing commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* with the same alkaline buffer as the one described above and using it on the same ELISA. The proportion of each toxin in the commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain was also determined by SDS-PAGE by measuring the intensity of each band using ImageJ software v.1.41o (15). The intensity of bands stained with Coomassie blue is proportional to the size of the molecule. To have unbiased intensity values per toxin, we divided the intensities measured on the gel by the sizes of the corresponding toxins, i.e., 130 kDa for Cry4Aa and Cry4Ba, 70 kDa for Cry11Aa, and 28 kDa for Cyt1Aa (23), before calculating the proportion of each toxin among Cry toxins and among all *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins. As the Cry4Aa and Cry4Ba toxins have very similar molecular masses, they cannot be easily distinguished on the gels and were grouped together for proportion estimations.

**Effect of litter on Cry toxins and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxicity to mosquito larvae.** Concentrations of crystal Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa were chosen in order to obtain about 70% larval mortality after 24 h (5.20, 3.13, and 0.97 µg/ml, respectively). Bioassays were performed for nine replicates on 20 third-instar larvae in 50 ml of tap water in plastic cups according to the standard bioassay procedure described by the World Health Organization (41). For each Cry toxin, either the toxin was added to a plastic cup already containing 50 mg of noncontaminated powdered litter (Fig. 1A, unbound toxin) or 50 mg of powdered litter contaminated as previously described (left to dry 3 h and powdered; bound toxin) was added (Fig. 1B). The same protocol was used for two commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* mixtures: the dry-powder-formulated VectoBac WG strain (319 ng of formulated product per ml) and the liquid-formulated VectoBac 12AS strain (6.4 × 10<sup>-4</sup> µl/ml). To test for the effect of the insecticide formulation, we also tested a nonformulated *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain produced in the laboratory using spores isolated from VectoBac (1.7 ng/ml) as previously described (29). Larval mortality was monitored after 24 h. The effect of treatment (contaminated versus noncontaminated) on larval mortality was tested by a linear model performed with R 2.8.1 software (33).

**Effect of litter on the Cyt synergistic effect on Cry toxins.** Taken separately, Cyt toxins are only a little toxic for mosquitoes, but they are powerful synergists of Cry toxicity. The most convenient way to measure the impact of litter on Cyt1Aa bioavailability was to measure Cyt1Aa's synergistic effect on Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa instead of its direct toxicity to mosquito larvae. The concentration of each Cry toxin was chosen in order to have less than 10% larval mortality after 24 h (585.74, 47.01, and 22.75 ng/ml for Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa, respectively). The concentration of Cyt toxin added to each Cry toxin was chosen in order to obtain about 70% mortality after 24 h (4.23 ng/ml for synergy with Cry4Aa and 21.15 ng/ml for synergy with Cry4Ba and Cry11Aa). Bioassays were performed for nine replicates on 20 larvae in 50 ml of tap

AQ: D

AQ: E

FI

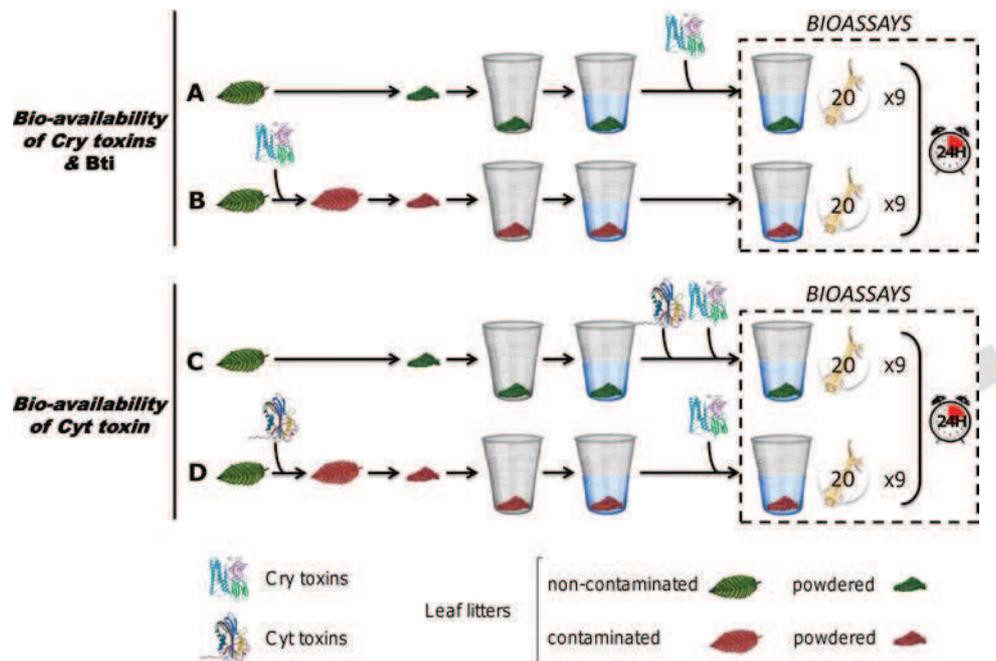


FIG 1 Illustration of the experimental design for the measurement of the effect of leaf litter on the bioavailability of Cry toxins and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) (A and B) and Cyt toxins (C and D). First protocol: Cry toxins added directly into plastic cups containing noncontaminated powdered leaf litter (A) are compared to Cry-contaminated powdered leaf litter (B) in a bioassay (20 larvae per cup, 9 replicates, mortality monitored after 24 h). The same protocol was followed for commercial and laboratory-produced *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulations. Second protocol: Cyt and Cry toxins added directly into plastic cups containing noncontaminated leaf litter (C) are compared with Cry toxins added in plastic cups containing Cyt-contaminated leaf litter (D) in a bioassay. The statistical differences between the two conditions (contaminated versus noncontaminated) for each toxin (represented in the same dotted square) were tested after 24 h of larval exposure using a linear model (Cry toxins) or a generalized linear model (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and Cyt toxins).

water in plastic cups. In this test, the Cyt1Aa toxin was added first either directly into a plastic cup containing 50 mg of noncontaminated powdered litter (Fig. 1C) or bound to 50 mg of litter that was contaminated 3 h, 1 day, 2 days, or 7 days before the bioassay and powdered (Fig. 1D). Larval mortality was monitored after 24 h. The effect of treatment (contaminated versus noncontaminated) on larval mortality was tested by a linear model followed by multiple pairwise comparisons of means (Tukey's honestly significant difference test) performed on R 2.8.1 software (33).

**Effect of the time on toxin stability and toxicity without litter.** To test whether *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins progressively solubilize, degrade, and/or lose their toxicity for mosquito larvae without being in contact with leaf litters, we left aliquots of Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa toxins for 7 days at room temperature or at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The toxicity of the Cry toxins and the synergism of the Cyt1Aa toxin were measured in the presence of litter in a plastic cup as previously described (Fig. 1A and C). Partial solubilization and/or degradation were estimated by centrifuging toxins at  $16,000 \times g$  for 15 min and analyzing the content

of the supernatant with SDS-PAGE (presence of bands corresponding to protoxins and/or degraded toxins) and in ELISAs.

## RESULTS

Quantification by SDS-PAGE indicated that the Cyt1Aa toxin represents about 80% of the total amount of toxins present in the commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulation (Table 1). Among Cry toxins, about 85% were Cry11Aa and 15% were Cry4Aa and Cry4Ba toxins. Quantification of toxins in the commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain by ELISAs showed nearly the same proportions of toxins (Table 1). ELISAs showed that the proportion of Cyt toxins after *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* extraction from leaf litters decreased by about 60% compared to that in the commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulation, while the proportions of Cry4Aa/Cry4Ba and Cry11Aa among Cry toxins remained unchanged (Table 1).

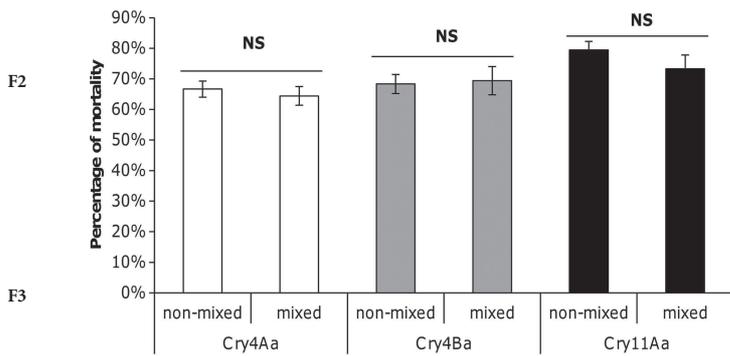
T1/AQ:F

TABLE 1 Proportions of each toxin among all the toxins or among Cry toxins in a *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulation in contact or not in contact with litter<sup>a</sup>

<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> state and test	Proportion (%) of each toxin:				
	Among all toxins			Among Cry toxins	
	Cry4Aa and Cry4Ba	Cry11Aa	Cyt1Aa	Cry4Aa and Cry4Ba	Cry11Aa
Solubilized; SDS-PAGE	2.9	15.5	81.6	15.7	84.3
Solubilized; ELISA	1.0	8.1	90.9	11.1	88.9
Extracted; ELISA	12.6	61.7	26.7	17.2	82.8

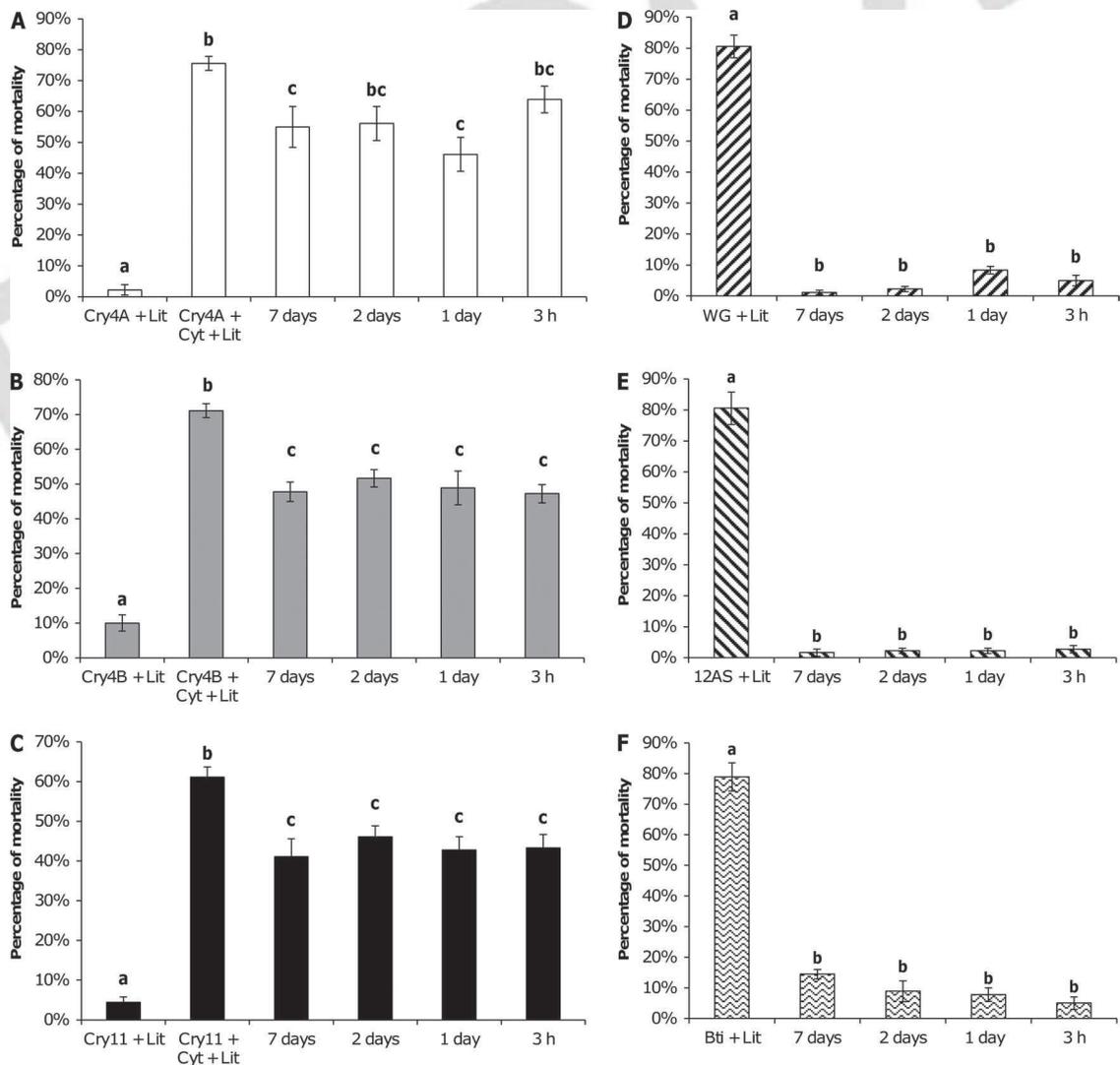
<sup>a</sup> The proportion of each toxin was determined by SDS-PAGE or by ELISAs using solubilized commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* or after toxin extraction from leaf litter.

Tetreau et al.



**FIG 2** Percentages of larval mortality after exposure to Cry4Aa (white), Cry4Ba (gray), or Cry11Aa (black) mixed or not mixed with leaf litter. Values are the mean percentages and the standard errors from nine replicates per treatment. Nonsignificant differences between bound and unbound toxins for each Cry toxin are indicated as “NS” between the two bars.

Toxicity of Cry toxins to mosquito larvae (Fig. 1, condition A versus condition B) was not affected by their contact with leaf litter (Fig. 2). Our results clearly indicate the synergistic effect of Cyt on Cry toxins. We observed 73%, 61%, and 57% increased larval mortalities, respectively, for Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa when Cyt was added in bioassays. In contrast, when Cyt was put in contact with leaf litter (Fig. 1, condition D versus condition C), significant decreases of the synergistic effects on Cry4Ba and Cry11Aa for all the exposure durations and on Cry4Aa for 1 and 7 days of exposure were observed (Fig. 3A, B, and C). We observed mean decreases of 20.28%, 22.22%, and 17.18% in the synergistic effect of Cyt1Aa on Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa, respectively. Toxicities of the two commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strains, VectoBac WG and VectoBac 12AS, and the laboratory-produced *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strain were significantly reduced by 76%, 78%, and 70%, respectively, when mixed



**FIG 3** (A to C) Percentages of larval mortality after exposure to Cry4Aa (A), Cry4Ba (B), or Cry11Aa (C) toxins without Cyt1Aa (Cry + Lit) or with Cyt1Aa and not mixed (Cry + Cyt + Lit) or mixed with leaf litter for 3 h, 1 day, 2 days, or 7 days. (D to F) Percentages of larval mortality after exposure to commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* VectoBac WG (D), VectoBac 12AS (E), or a *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulation produced in nutrient agar (F) not mixed (+ Lit) or mixed with leaf litter for 3 h, 1 day, 2 days, or 7 days. Values are the mean percentages and standard errors from nine replicates per treatment. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments (contaminated versus noncontaminated) are indicated by different letters above the bars.

with leaf litters (Fig. 1, condition A versus condition B, and Fig. 3D, E, and F). For all the bioassays performed, the duration of toxin exposure to leaf litter did not significantly affect larval toxicity (Fig. 3). Moreover, larval toxicity was unchanged when toxins were left in water at room temperature for 7 days (see Fig. S1 in the supplemental material), and neither solubilization nor degradation was detected by both SDS-PAGE and ELISAs.

## DISCUSSION

Cyt toxins are known to enhance Cry toxin activity and to delay the development of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* resistance in mosquitoes (4, 46). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* contact with leaf litter induced an important decrease in Cyt1Aa toxin bioavailability (60%), whereas the Cry4 and Cry11Aa toxins remained unaffected. Cyt toxins seem to have strong and irreversible interactions with litter, limiting desorption during the extraction step. Such an interaction has already been described for solubilized and activated Cry1Aa toxin in contact with different soils, with the amount of extractable *B. thuringiensis* toxin declining rapidly during the first 2 weeks of contact (19). Nevertheless, the context described in our study is far from this example, as we focused on leaf litters and on *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins in their crystal form. Further investigations are needed to understand how Cyt toxins can interact so strongly with litters in their crystal form. These results also show that *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* must be considered a combination of inclusions with different behaviors in the field and not a cohesive inert crystal.

Bioassays showed that Cry contact with leaf litters did not induce any alteration of their toxicity to *A. aegypti* larvae. Cry toxins are easily extractable and immunologically detectable when mixed with leaf litter, and they conserve their insecticidal properties for mosquito larvae.

In contact with leaf litter, the synergistic effect of Cyt on *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins decreased by about 20%, regardless of the contact duration. Cyt toxins seem to bind very quickly to leaf litter, as the 20% loss in synergy occurred after only 3 h of exposure. There is a discrepancy between the proportion of unextractable Cyt toxin from leaf litter (60%) and the decrease of its synergistic effect on Cry toxins (20%). Some mechanisms can be hypothesized to try to explain this phenomenon.

(i) This discrepancy may be due to the high synergy power of Cyt toxins, as only small amounts of Cyt toxin are needed to exponentially increase Cry toxicity to mosquito larvae. Therefore, the small proportion of still-extractable and bioavailable Cyt toxins may be sufficient to induce 80% of the total synergistic effect. Indeed, it was observed that Cyt toxins are able to synergize other toxins over a large range of toxin ratios (47). Furthermore, Cyt toxin activity may be enhanced by litter components ingested by larvae together with protoxins, as tannic acids have already been described to enhance the toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* for *Trichoplusia ni* (14). However, the impact of tannic acids is not clear, as they were shown to inhibit the toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* for *Spodoptera litura* (22).

(ii) A part of the Cyt toxins linked to the litter may still be able to synergize Cry toxins. It has been demonstrated that solubilized Cry toxins bound to soil can conserve their toxicity (16, 24), but it is still unknown whether Cyt toxins have the same behavior.

(iii) Cyt toxins may be degraded more rapidly than Cry toxins by microbes present in the leaf litter. Indeed, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* is known to be susceptible to microbial degrada-

tion (23). However, microbial degradation is expected to increase with exposure time. The fact that we did not observe an effect of exposure time either on the proportion of Cyt detected or on its synergistic effect on Cry toxins rules out the role of microbial degradation in differential *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin effects when mixed with leaf litter.

(iv) Bound Cyt toxins may experience three-dimensional (3D) conformational modifications, inducing a reduction of its synergistic activity and/or a reduction of its immunological detectability by ELISA. It has been shown that Cry toxins bound to the soil (37) or to leaf litter (present study) conserve their entire antigenicity and insecticidal activity. However, Cyt toxins have very different 3D conformations than Cry toxins and may interact differently with the heterogenic sorbent surface of the leaf litter, explaining why they partly lose their immunological detectability and synergistic effects (26). Even if the toxin extraction protocol coupled with ELISAs showed good efficiency and reproducibility for all toxins (see Fig. S1 in the supplemental material), it cannot be excluded that the drying and powdering steps may differently affect the toxins' stability, especially for the Cyt1Aa toxin, as proportions of Cry toxins remained the same as in SDS-PAGE.

(v) Contrary to Cry toxins that need receptors to perforate the intestinal membrane (23), Cyt toxins can directly insert into the membrane of epithelial cells due to their tertiary structure (5). This ability might also facilitate the binding of Cyt to litter, although plant epithelial cells have a structure that is very different from that of animal cells, with a rigid cell wall not composed of lipids *a priori* not favoring Cyt insertion. Since the synergistic effect of the Cyt1Aa protein on Cry toxins seems to be its role as a Cry "receptor," the interaction of Cyt proteins with litter might therefore inactivate this receptor role.

In contact with leaf litter, the toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* decreased by about 70%, regardless of the contact duration. No effect of the commercial formulations was evidenced, as the decreased toxicities were nearly the same for the two commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulations and for the laboratory-produced *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulation. The strongly decreased toxicity of the composite *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal in contact with leaf litter can be explained by two potential nonexclusive mechanisms. (i) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals contain a lamellar envelope, which maintains together the different inclusion types (13), that is typically absent from individual Cry and Cyt toxin productions. This envelope may interact strongly with leaf litter particles, leading to a major decrease in bioavailability of all the toxins. (ii) As Cyt toxins lost about 20% of their synergistic effect on all *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins because of contact with leaf litter, the important decreased bioavailability of the Cyt toxin may affect all Cry toxins contained in the *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* formulation. Therefore, the observed effect might simply be due to the cumulative effect of the decreased synergy of Cyt1Aa with each Cry toxin, leading to a severe loss of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxicity.

Cyt toxins bound to leaf litter lost about 20% of their synergistic effect on all *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins. This might explain why the selection of an *A. aegypti* laboratory strain using decaying leaf litters containing field-persistent *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* gave rise after 18 generations to a mosquito strain exhibiting consistent levels of resistance to separate *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins (6 to 30 resistance ratios)

but only a moderate resistance to the full commercial *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* mixture (29). It was demonstrated that even in the presence of Cyt toxins, resistance to Cry toxins and Bin toxins can evolve in selected mosquito strains (42, 44–46). Therefore, the decreased bioavailability of Cyt toxins because of contact with leaf litter may have facilitated the development of Cry resistance in the case of the *A. aegypti* LiTOX strain. In the field, a long-term exposure of larvae to an altered mixture of persistent Cry toxins with low levels of synergistic Cyt toxins may more easily lead to the evolution of resistance to Cry toxins and, at term, to *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. As increasing numbers of recombinant *B. thuringiensis* strains containing Cyt toxins are developed, our results suggest that their efficiency, essentially based on Cyt synergism, might prove to be much lower in the field than in laboratory conditions. These findings have to be taken into account to manage resistance evolution in mosquito breeding sites treated with *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and to evaluate the efficiency of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and new *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*-based insecticides in the field.

Numerous studies have evaluated *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* residual activity in many different conditions, including rivers, lotic zones, benthic zones (1, 2, 39), saltmarshes (8), and water tanks and containers (6, 34). It was shown that this residual activity ranged from a few days to several months, and many environmental factors (e.g., UV light, temperature, etc.) were shown to have an impact on *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* residual activity (21, 23), but so far, nothing is known about their action on each *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. To our knowledge, this is the first time one major component of several mosquito breeding sites is shown to have a differential impact on Cyt and Cry toxins, leading to a dramatic loss of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxicity. The present work opens new ways to better understand how multiple toxins in their crystal form can interact with leaf litter and why *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* quickly loses its toxicity for mosquito larvae in the field. As leaf litters are not present in all the mosquito breeding sites, the same experiments have to be performed with clays to see if this phenomenon is specific to leaf litter or if it can be generalized to other components of mosquito breeding sites. These findings must be taken into account for an integrated use of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* for mosquito-cidal treatments and for adapting the treatment strategies to the composition of the treated areas.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brian Federici for providing recombinant *B. thuringiensis* strains. We also thank Rolland Douzet for the identification of the litter leaves and Jean-Christophe Clément and Jacques Bourguignon for helpful comments on early versions of the manuscript. We want to thank anonymous reviewers for their constructive comments.

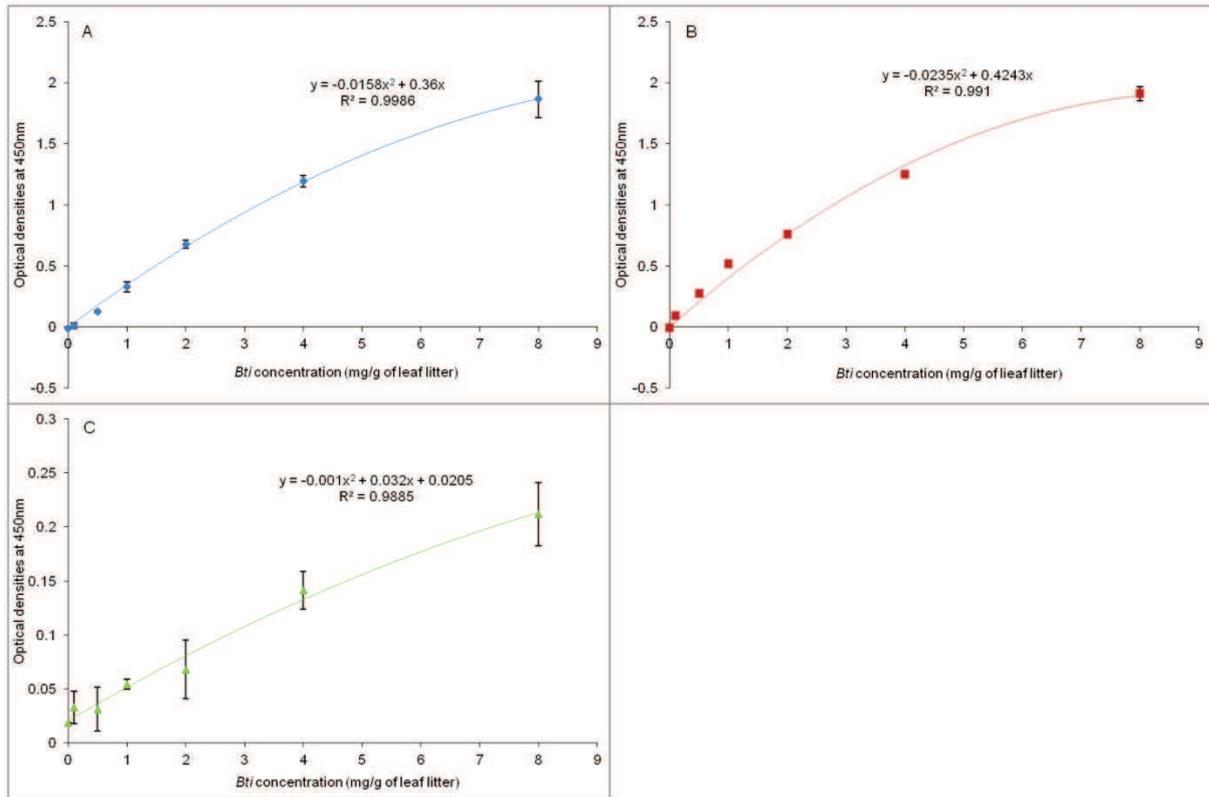
This work was funded by the French National Research Agency (ANR; project ANR-08-CES-006-01 DIBBECO). Guillaume Tetreau was supported by the French Ministry of Research.

## AQ: ref REFERENCES

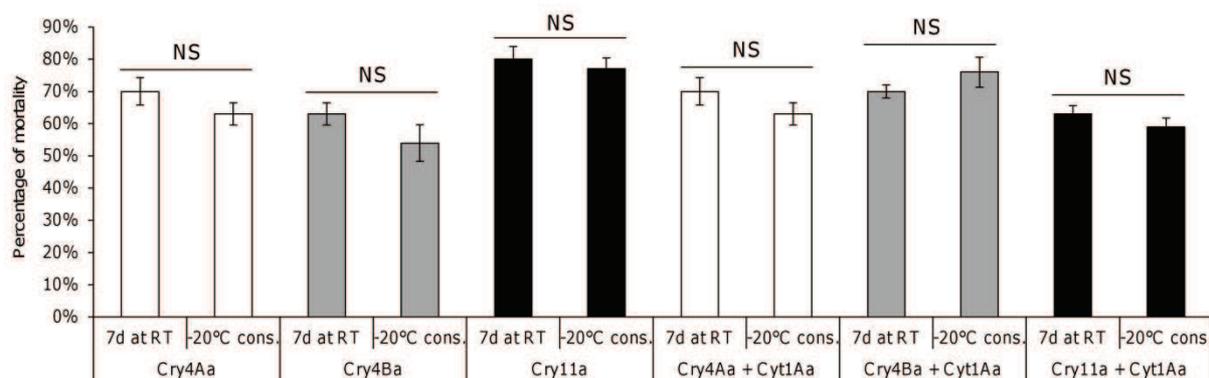
- Boisvert M, Boisvert J, Aubin A. 2001. Factors affecting black fly larval mortality and carry of two formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* tested in the same stream during a 3-year experiment. *Biocontrol Sci. Technol.* 11:711–725.
- Boisvert M, Boisvert J, Aubin A. 2001. Factors affecting residual dosages of two formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* tested in the same stream during a 3-year experiment. *Biocontrol Sci. Technol.* 11:727–744.
- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberon M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41:423–431.
- Butko P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2415–2422.
- Cadavid-Restrepo G, Sahaza J, Orduz S. 2012. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107:74–79.
- Canton PE, Reyes EZ, de Escudero IR, Bravo A, Soberon M. 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides* 32:595–600.
- Christiansen JA, et al. 2004. Influence of temperature and concentration of Vectobac on control of the salt-marsh mosquito, *Ochlerotatus squamiger*, in Monterey County, California. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20: 165–170.
- de Melo-Santos MAV, de Araujo AP, Rios EMM, Regis L. 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biol. Control* 49:186–191.
- Delecluse A, Poncet S, Klier A, Rapoport G. 1993. Expression of *cryIVa* and *cryIVb* genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3922–3927.
- Federici BA. 2010. Recombinant bacterial larvicides for control of important mosquito vectors of disease, p 1–10. In Atkinson PW (ed), *Vector Biology, Ecology and Control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Federici BA, et al. 2007. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23:164–175.
- Federici BA, Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ. 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Exp. Biol.* 206:3877–3885.
- Gibson DM, Gallo LG, Krasnoff SB, Ketchum REB. 1995. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. *J. Econ. Entomol.* 88:270–277.
- Girish V, Vijayalakshmi A. 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J. Cancer* 41:47.
- Gonzalez P, Pantani OL, Ristori GG, Fereres A. 2002. Toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* sorbed on clays: persistence and activity against the mosquito *Culex pipiens*, p 69–78. In Violante A, Huang PM, Bollag JM, Gianfreda L (ed), *Soil mineral-organic matter-microorganism interactions and ecosystem health. Ecological significance of the interactions among clay minerals, organic matter and soil biota*, vol 28B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Guidi V, Patocchi N, Luethy P, Tonolla M. 2011. Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss wetland reserve after 22 years of mosquito control. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3663–3668.
- Hajaj M, et al. 2005. Low persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* spores in four mosquito biotopes of a salt marsh in southern France. *Microb. Ecol.* 50:475–487.
- Helassa N, et al. 2011. Effects of physicochemical interactions and microbial activity on the persistence of Cry1Aa *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43:1089–1097.
- Helassa N, Quiquampoix H, Noinville S, Szponarski W, Staunton S. 2009. Adsorption and desorption of monomeric *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite. *Soil Biol. Biochem.* 41: 498–504.
- Ignoffo CM, Garcia C, Kroha MJ, Fukuda T, Couch TL. 1981. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. *Mosq. News* 41:85–93.
- Isayama S, Suzuki T, Nakai M, Kunimi Y. 2011. Influences of tannic acid and polyphenols in the leaves of strawberry, *Fragaria x ananassa*, and Perilla, *Perilla frutescens viridis* on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* formulation against the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Jap. J. Appl. Entomol. Zool.* 55:49–57.
- Lacey LA. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23:133–163.
- Lee L, Saxena D, Stotzky G. 2003. Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4111–4115.
- Loke SR, Andy-Tan WA, Benjamin S, Lee HL, Sofian-Azirun M. 2010.

AQ: G

- Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Trop. Biomed.* 27:493–503.
26. Madliger M, Gasser CA, Schwarzenbach RP, Sander M. 2011. Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to silica particles. Effects on transport and bioactivity. *Environ. Sci. Technol.* 45:4377–4384.
  27. Oestergaard J, et al. 2007. Quality control of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* products based on toxin quantification with monoclonal antibodies. *Biocontrol Sci. Technol.* 17:295–302.
  28. Pardo-Lopez L, et al. 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 30:589–595.
  29. Paris M, et al. 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Manag. Sci.* 67:122–128.
  30. Park HW, Bideshi DK, Federici BA. 2003. Recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* producing Cyt1A, Cry11B, and the *Bacillus sphaericus* binary toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1331–1334.
  31. Perez C, et al. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:18303–18308.
  32. Perez C, et al. 2007. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell. Microbiol.* 9:2931–2937.
  33. R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.
  34. Ritchie SA, Rapley LP, Benjamin S. 2010. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82:1053–1059.
  35. Schnepf E, et al. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775–806.
  36. Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M. 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol.* 27:347–355.
  37. Stotzky G. 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant Soil* 266:77–89.
  38. Tilquin M, et al. 2008. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. *PLoS One* 3:e3432. doi:10.1371/journal.pone.0003432.
  39. Tousignant ME, Boisvert JL, Chalifour A. 1993. Loss of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* larvicidal activity and its distribution in benthic substrates and hyporheic zone of streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:443–451.
  40. Vettori C, Paffetti D, Saxena D, Stotzky G, Giannini R. 2003. Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biol. Biochem.* 35:1635–1642.
  41. WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
  42. Wirth MC, Delecluse A, Walton WE. 2004. Laboratory selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* or a component toxin, Cry11B, in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae). *J. Med. Entomol.* 41:435–441.
  43. Wirth MC, Federici BA, Walton WE. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1093–1097.
  44. Wirth MC, Georghiou GP. 1997. Cross-resistance among CryIV toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* 90:1471–1477.
  45. Wirth MC, Jiannino JA, Federici BA, Walton WE. 2005. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B-sphaericus*+Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* 88:154–162.
  46. Wirth MC, Park HW, Walton WE, Federici BA. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:185–189.
  47. Wirth MC, Walton WE, Federici BA. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 37:401–407.
  48. Wu D, Federici BA. 1995. Improved production of the insecticidal CryIVD protein in *Bacillus thuringiensis* using cryIA(c) promoters to express the gene for an associated 20-KDa protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:697–702.



**Figure S1.** Optical densities of extracts from litters contaminated with 0.1, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mg of commercial *Bti* per gram of leaf litter obtained in ELISA assays with anti-Cry4 (A, blue), anti-Cry11 (B, red) and anti-Cyt (C, green) antibodies. All the contaminations have been performed in triplicate. They all show a good reproducibility and the high  $R^2$  assess the good correspondance between ELISA signal and increasing amount of *Bti* present in the leaf litter.



**Figure S2.** Aliquots of toxins were conserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $-20^{\circ}\text{C}$  cons.) or let at room temperature for 7 days (7d at RT) and their larval toxicity was measured in presence of leaf litter. NS indicates no significant differences between the two conditions.

# Article VII

---

**Larval gut proteolytic activity and *Bti* resistance in the dengue fever mosquito.**

TETREAU, G., STALINSKI, R., DAVID, J. P., DESPRES, L.

*En préparation pour Journal of Invertebrate Pathology*



# Larval gut proteolytic activity and *Bti* resistance in the dengue fever mosquito.

Guillaume Tetreau<sup>§\*</sup>, Renaud Stalinski<sup>§</sup>, Jean-Philippe David, Laurence Després

Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grenoble 1, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

<sup>§</sup>These authors contributed equally to the work.

\*Please address correspondence to:

Guillaume TETREAU  
Laboratoire d'Ecologie Alpine - Université de Grenoble 1  
2233 rue de la Piscine  
38400 Saint-Martin d'Hères  
FRANCE  
Tel. 33 (0)4 76 51 46 00  
Fax. 33 (0)4 76 51 42 79  
E-mail : guillaume.tetreau@gmail.com

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Aedes aegypti*, mosquito, gut extracts, enzymes, trypsin, chymotrypsin, leucine-aminopeptidase, carboxypeptidase, proteolytic activity, resistance, Cry toxins, zymogram,

**Abbreviations:** DTT, dithiothreitol; BApNA, N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide; SAApNA, N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide; FAPP, N-(3-[2-furyl]acryloyl)-phenylalanine-phenylalanine; FAAK, N-(3-[2-furyl]acryloyl)-alanine-lysine; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; TLCK, tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; TPCK, tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone.

## Abstract

The bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is increasingly used worldwide for mosquito control. Although no established resistance to *Bti* has been described in the field so far, an *Aedes aegypti* strain (LiTOX strain) has been selected in the laboratory using field-collected leaf-litter containing persistent *Bti*. This selected strain exhibits only moderate resistance to *Bti*, but higher resistance to Cry toxins tested separately. As *Bti* is constituted of four different toxins, it is expected that this strain has developed a generalist mechanism of resistance, notably by modifying the activities of proteases involved in the protoxins processing. In the present work, we showed a global increase of the total proteolytic activity and of trypsin, leucine-aminopeptidases and carboxypeptidase A activities in the LiTOX strain. This increased proteolytic activity resulted in a faster activation for Cry4Aa protoxins but not for Cry4Ba or Cry11Aa. These results indicate that modification of proteolytic activity is only partly responsible of *Bti* resistance in the LiTOX strain and is likely to be combined with other mechanisms such as membrane receptors modifications.

## 1. Introduction

Mosquitoes are vectors of severe human diseases such as dengue, yellow fever, malaria or chikungunya. To fight against these epidemic diseases, mosquito control is essential (Kyle and Harris, 2008; Tomori, 2004). Used for decades for their high efficiency, chemical insecticides are less and less used due to their low specificity and to increasing cases of resistance reported in target insects (Marcombe *et al.*, 2011; Tantely *et al.*, 2010). The bioinsecticide *Bti* represents an efficient and safe alternative to chemical insecticides because of its supposed low persistence in the environment, its high specificity to dipterans and of the lack of resistance reported in the field so far (Bravo *et al.*, 2011; Lacey, 2007). During sporulation, the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* produces a crystal, toxic for mosquito larvae. This composite crystal is constituted of four main toxins: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa (Lacey, 2007). After being ingested by mosquito larvae, the crystal is dissolved into the alkaline pH of the gut. Solubilized Cry protoxins are then activated by gut enzymes, bind to specific membrane receptors, oligomerize and insert into the membrane bilayer leading to the death of the larvae (Bravo *et al.*, 2007).

Recently, an increasing number of studies have shown that *Bti* can persist and even proliferate under specific conditions in the environment (de Melo-Santos *et al.*, 2009; Shaheen *et al.*, 2010). In the French Rhône-Alps region, decaying leaf litters were shown to exhibit high mosquitocidal activity due to persistent *Bti* several months after a treatment (Tilquin *et al.*, 2008). The selection of an *Aedes aegypti* laboratory strain with this field-persistent *Bti* during 30 generations resulted in a strain (LiTOX strain) moderately resistant to *Bti* (3.5-fold) but highly resistant to separate Cry toxins (69, 9 and 9-fold for Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa toxins respectively) (Tetreau *et al.*, 2012).

The mechanisms of resistance developed by lepidopteran and coleopteran larvae exposed to other *Bt* subspecies are well characterized (Heckel *et al.*, 2007; Jurat-Fuentes and Adang, 2006). In these insects, it was shown that when larvae are exposed to only one Cry toxin, high levels of resistance (over 1,000-fold) can be reached by mutating membrane receptors such as cadherins, alkaline phosphatases or N-aminopeptidases (Griffitts and Aroian, 2005; Jurat-Fuentes *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010). As these receptor-based resistances are often specific to one toxin, multiple mutations at different genes would be necessary in order to reach high level of resistance by receptor modification in the case of *Bti*, a combination of four different toxins acting in synergy. Considering the relatively low level of resistance of the selected mosquito LiTOX strain as compared to *Bt*-resistant species, *Bti* might induce a more generalist mechanism of resistance than receptor modification, possibly by acting at the protoxins activation step.

Activation of protoxins to toxins is a key step of the mode of action of Cry toxins (Bravo *et al.*, 2007). Proteases have been implicated in numerous cases of resistance, thanks to the high ability of insects to modulate their proteolytic activity when exposed to the selective pressure of insecticides (Oppert *et al.*, 1997). Three main mechanisms of resistance to Cry protoxins involving proteases have been described so far: 1. decreased proteases expression and/or activity could slow down protoxins activation (Huang *et al.*, 1999; Karumbaiah *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004); 2. protoxins can be improperly activated by proteases thereby decreasing toxicity to larvae (Rajagopal *et al.*, 2009) and 3. the degradation of toxins by overproduced proteases, or by new forms of proteases, can induce resistance (Forcada *et al.*, 1996). To investigate the implication of proteases in the resistance to *Bti* in the LiTOX strain, we measured total proteolytic activity of gut enzymes and more specific activities by focusing on trypsins and chymotrypsins, because they represent most of the total proteolytic activity. Furthermore, they were previously shown to be implicated in *Bt* protoxins processing and in several cases of resistance to Cry toxins in Lepidoptera (Candas *et al.*, 2003; Karumbaiah *et al.*, 2007). We also focused on leucine-aminopeptidases, because one of them was detected as potentially involved in resistance in the LiTOX strain by a genome scan approach (Bonin *et al.*, 2009), and on carboxypeptidases A and B, because previous work has shown that metallo-proteases might be involved in *Bti*-resistance in the LiTOX strain (Tetreau *et al.*, 2012). We then investigated the impact of the different proteolytic activities in larval guts of the resistant and susceptible strains on *Bti* Cry toxins processing kinetics and characterized the enzymes content of the gut extracts by zymogram analyses. We show that proteolytic activity changes in the selected strain have an impact on Cry4Aa processing, but not on other *Bti* toxins, indicating that they are not the only mechanism involved in resistance to *Bti* in the LiTOX strain.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Mosquito strains**

The *Ae. aegypti* laboratory strain Bora-Bora, susceptible to all insecticides, was selected with field-collected leaf litter containing *Bti* spores and toxins for 30 generations to obtain the LiTOX strain. At each generation, 6000 third instar larvae were exposed to toxic leaf litter to obtain about 70% of larval mortality after 48 h exposure (Paris *et al.*, 2011). Both resistant and susceptible strains were reared in standard insectary conditions (27°C, 14/10 h light/dark period, 80% relative humidity). Larvae were reared in tap water and fed with standard amount of larval food (Paris *et al.*, 2011).

## **2.2 Preparation of gut extracts**

For each strain, three biological replicates of midgut soluble protein extracts were performed. For each biological replicate, twenty early fourth instar larvae were chilled in ice, their midguts were carefully extracted, added in 50  $\mu\text{L}$  of distilled water, homogenized using a vortex for 30 sec and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C as previously described (Tetreau *et al.*, 2012). All the supernatants from larvae of the same biological replicate were mixed together. Protein concentration was quantified by a Bradford assay using BSA as standard (Bradford, 1976) and aliquots were conserved at -20°C until use.

## **2.3 Total protease activity**

Total protease activities of gut extracts from the two strains were measured at pH ranging from 4 to 13 using azocasein as substrate (Sigma Aldrich) as described in (Hosseininaveh *et al.*, 2007). The universal buffer (40 mM acetic acid, 40 mM phosphoric acid, 40 mM boric acid) was used in all activities measurement to determine the optimal pH (Elpidina *et al.*, 2001). For each biological replicate, three technical replicates were performed and absorbance was measured at 440 nm. For each pH, statistical difference between the two strains was tested by a Wilcoxon test. All statistical analyses were performed with R 2.8.1 software (R Development Core Team, 2007).

## **2.4 Specific protease activities**

Trypsin, chymotrypsin and leucine aminopeptidases activities were measured at pH ranging from 4 to 12 using respectively BApNA (N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide; Sigma Aldrich), SAApNA (N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide; Sigma Aldrich) and leucine p-nitroanilide (Sigma Aldrich) as specific substrates. Carboxypeptidases A and B activities were measured at pH ranging from 8 to 11 using respectively FAPP (N-(3-[2-furyl]acryloyl)-phenylalaline-phenylalaline; Sigma Aldrich) and FAAK (N-(3-[2-furyl]acryloyl)-alanine-lysine; Sigma Aldrich) as substrates. For each pH, each of the three technical replicate consisted in 150  $\mu\text{L}$  of universal buffer at the desired pH, 30 $\mu\text{L}$  of gut extract (containing 10  $\mu\text{g}$  of total proteins) and 20  $\mu\text{L}$  of the substrate at a final concentration of 10 mM. The reaction mixture was incubated at 30 °C and absorbance was measured every 5 sec during 10 min at 400 nm (for BApNA, SAApNA and leucine p-nitroanilide) or 330 nm (for FAPP and FAAK). Proteolytic activities are expressed in nmol of formed product per minute per mg of total protein (nanokatal, nkat). For each pH of each substrate, statistical difference between the two strains was tested by a Wilcoxon test.

## **2.5 Temporal processing of Cry toxins**

### 2.5.1 Production of individual *Bti* Cry toxins

Each *Bti* Cry toxin was produced separately using a crystal negative strain of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (4Q2-81) transformed with the plasmids pHT606, pHT618 or pWF53 producing respectively Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa toxins obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) or from Prof. B. Federici (University of Riverside, USA). Bacteria were grown on Nutrient Agar solid medium (Sigma Aldrich) supplemented with erythromycin (25 µg.mL<sup>-1</sup>). After 7 days at 30°C, spores and crystals were recovered using cell scrapers (BD Falcon) and purified as previously described (Tetreau *et al.*, 2012). Crystals were solubilized using an alkaline buffer (pH 10.8) containing Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mM) and DTT (10 mM) and were incubated at 60°C for 1h. After a centrifugation at 10,000 g for 10 min, solubilized protoxins present in the supernatant were purified using an ion-exchange column HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Biosciences), desalted and resuspended into the universal buffer at pH 9 using the HiPrep 26/10 Desalting column (Amersham Biosciences). Protein concentration was quantified by a Bradford assay using BSA as standard (Bradford, 1976).

### 2.5.2 Temporal processing of Cry protoxins without inhibitors

To determine whether the differences in proteolytic activities observed across strains modified the activation kinetics of *Bti* Cry toxins, we measured the activation of protoxins to toxins at different digestion times. The reaction mixture consisted in 14 µL of Cry protoxins with 2 µL of gut extracts (0.5 µg of total proteins) incubated at 37 °C during 1, 5, 10, 30, 60, 180 and 360 min. Reaction was stopped by adding 2 µL of Protein Loading Buffer (Fermentas) and by heating at 95 °C during 5 min. A positive control was also performed by activating Cry protoxins with bovine trypsin (Sigma Aldrich) at 37 °C for 3 h. All different digestion times were co-migrated on SDS-PAGE and revealed by coomassie blue staining. The size of the different digested bands was determined by comparing with the Unstained Protein Ladder (Fermentas). Intensity of each band was estimated using Imagej software v.1.41o (Girish and Vijayalakshmi, 2004). For each digestion time, percentage of total activation was calculated by dividing the intensity of the activated band (*i.e.* band at 49, 49 and 36 kDa respectively for Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa toxins) by the intensity of the activated band in the positive control. For each digestion time, differences between the two strains were tested by a Wilcoxon test.

### 2.5.3 Temporal processing of Cry4Aa protoxins with inhibitors

As Cry4Aa showed altered activation kinetics between the two strains, we further determined which category of protease was implicated by using specific inhibitors. Processing of Cry4Aa

protoxins was performed as described in section 2.5.2 with the addition of PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride; 30 mM) or EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; 1 mM) for the inhibition of serine proteases or metallo-proteases respectively. Gut extracts (0.5 µg of total proteins) were treated 15 min at room temperature with inhibitors. For processing with EDTA, analysis was performed as described in section 2.5.2. As PMSF induced a strong decreased activation of Cry4Aa protoxins to toxins, the 49 KDa activated band was visible only after 360 min of digestion. Difference in the percentage of activated toxin between the two strains after 360 min of digestion were tested by a Wilcoxon test.

## **2.6 Zymogram analyses**

Zymograms allowed us to determine how many different proteases were present in the gut extracts and to characterize their nature by using four specific protease inhibitors: PMSF (30 mM), TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; 1.5 mM), TPCK (tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; 1.5 mM) and EDTA (1 mM) inhibiting most of serine proteases, trypsins, chymotrypsins and metallo-proteases respectively. Gut extracts (5 µg of total proteins) were treated 15 min at room temperature with inhibitors. For each strain, each of the three gut extracts replicates was treated or untreated with inhibitors, and all were co-run on native SDS-PAGE for 6h30 at 90V at 4 °C to preserve proteins structure. Gels were then washed with distilled water and left overnight at 4 °C in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8) containing 2% casein. The day after, digestion of casein was performed at 25 °C during 1h30, the gel was stained with coomassie blue and band intensities were estimated using Imagej software v.1.41o (Girish and Vijayalakshmi, 2004).

## **3. Results**

### **3.1 Protease activities of gut extracts**

Total gut azocaseinolytic activities were significantly increased by about 26% for 6 out of the 10 pH tested with a maximum increased activity of 43% at pH 6 in the LiTOX compared to the susceptible strain (Figure 1). Trypsin activities in gut extracts were significantly 23% increased for the alkaline pH (from 7 to 12) (Figure 2A) whereas chymotrypsin activities were moderately but significantly increased by 12% for pH 6, 8 and 12 in the LiTOX strain (Figure 2B). Leucine aminopeptidases activities were significantly 34% increased for all the pH from 4 to 12 in the LiTOX strain (Figure 2C). The high increase at pH 4 is due to very low value of activity measured. Carboxypeptidases A activity was significantly 28% increased at pH 8 (Figure 2D) and carboxypeptidases B had 42% increased activities at pH 8, 9 and 11 in the LiTOX strain (Figure 2E).

### 3.2 Kinetics of Cry toxins activation by gut extracts

Cry4Ba and Cry11Aa protoxins were not differently activated by gut extracts from the LiTOX or from the susceptible strain (Figure 3D and 3E), while Cry4Aa protoxins were significantly more activated in the LiTOX strain after 5, 30 and 60 min of digestion, with a maximum of 15% increased activation at 60 min of digestion (Figure 3A). When EDTA was added, Cry4Aa protoxins were still significantly more activated in the LiTOX strain but with a maximum of 8% increase at 60 min of digestion (Figure 3B). At 360 min of digestion with PMSF, enzymes of gut extracts from the LiTOX strain significantly activated Cry4Aa protoxins 17% more than gut extracts from the susceptible strain (Figure 3C).

### 3.3 Zymogram analyses of gut extracts

Electrophoretic zymograms allowed the separation of 6 different proteic bands with caseinolytic activities in the gut extracts of both LiTOX and susceptible strains (E1 to E6, Figure 4). E1 and E2 bands were partially inhibited by PMSF (about 50% and 80% respectively) indicating that these bands are composed of at least two categories of enzymes and only partly of serine proteases or that the PMSF concentration used is not sufficient to fully inhibit the large amount present in these bands. E3 was inhibited by both PMSF and TPCK, indicating that this enzyme is a trypsin-like serine protease. None of the inhibitors tested induced a decrease or a disappearing of the E4 enzyme, indicating that this enzyme is neither a serine protease nor a metallo-protease. E5 enzyme was fully inhibited by PMSF indicating that it is a serine protease. Inhibitions with others inhibitors are too variable to conclude. E6 enzyme was always active in the susceptible strain, whatever the inhibitor used, but when EDTA was added, activity was decreased by about 20%. By contrast, E6 was fully inhibited by EDTA in the LiTOX strain. Therefore, the E6 band appears to be exclusively constituted of EDTA-inhibited metallo-proteases in the LiTOX strain but only partly (about 20%) in the susceptible strain.

## 4. Discussion

Because *Bti* is a combination of several toxins acting in synergy, mosquito larvae are likely to develop resistance by generalist mechanisms, such as the protoxins activation step. Protoxins activation can be slowed down by decreased protease activity (Karumbaiah *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004). Indeed, one of the four *Bt*-resistant strains of *Ostrinia nubilalis* tested showed an about 50%-decreased trypsin activity inducing a 20 to 30% decrease in Cry1Ab protoxin activation (Huang *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004). The slower processing of Cry1Ac and Cry2Aa protoxins by gut extracts from two *Bt*-resistant strains of *Heliothis virescens* (YHD2-B and CXC) was due to a loss of chymotrypsin-like (CXC) or trypsin-like (YHD2-B) proteinase

activities (Karumbaiah *et al.*, 2007). Unexpectedly, we found that all proteolytic activities were globally increased in the LiTOX strain, with the highest increase observed for the metallo-proteases leucine-aminopeptidases (34%) and carboxypeptidases B (42%). This increased proteolytic activity had an effect only on the temporal processing of Cry4Aa protoxins. Cry4Aa protoxins were more quickly activated by gut extracts from the LiTOX than from the susceptible strain, even in the presence of inhibitors, although EDTA induced a lower increase than with PMSF or without inhibitor. These results indicate that proteases non-inhibited by EDTA (*i.e.* mainly serine-proteases) were only partly responsible for this increased Cry4Aa processing and that proteases non-inhibited by PMSF (*i.e.* notably metallo-proteases) were mainly implicated in this increased processing. Therefore, increased serine-proteases and metallo-proteases activities have direct impact on the Cry4Aa temporal processing but not on Cry4Ba and Cry11Aa. This indicates that protease activity modification in the LiTOX strain alters only Cry4Aa processing, the toxin for which the LiTOX strain exhibits the highest level of resistance (69-fold, Tetreau *et al.*).

Protoxin processing can be impaired leading to the production of altered and less efficient toxins (Rajagopal *et al.*, 2009). It has already been demonstrated that the precision of the protoxin cleavage is essential for the insecticidal activity of Cry toxins, as the non-cleavage of 28 amino acids of Cry1Ac protoxins was responsible for a 72-fold resistance in *H. armigera* (Rajagopal *et al.*, 2009). Moreover, a higher degradation of Cry1Ab toxins induced a resistance in *H. virescens* (Forcada *et al.*, 1999). In our case, it is possible that the observed faster processing of Cry4Aa in the LiTOX strain led not to a faster activation, but to a faster degradation of the toxin. It is possible that the resolution of the gels didn't allow us to detect a slight modification in the size of Cry4Aa toxins processed by LiTOX as compared to by Bora-Bora gut enzymes that could partly explain the resistance. It has also been demonstrated that trypsin-activated toxins can differ from toxins activated with midgut juices and that even if they have a similar size in SDS-PAGE, the differently activated toxins can experience structural modifications leading to altered toxicity for the larvae (Haider *et al.*, 1986; Knowles *et al.*, 1986; Lightwood *et al.*, 2000).

Zymogram analyses of the proteases content of gut extracts showed that they were constituted of at least six different proteases. Only the E6 band differed between the two strains. It seems that at least two different proteases, or isoforms of the same protease, were produced in the susceptible strain as EDTA only partly inhibited the activity of this band. By contrast, only the EDTA-inhibited protease was present in the LiTOX strain. It is possible that the loss of one particular protease in the LiTOX strain is responsible for part of the relatively high level of resistance to Cry4Aa observed in this strain.

In a previous study, four genes encoding metallo-proteases were found under-transcribed in the midgut of larvae from the LiTOX strain (Tetreau *et al.*, 2012). Moreover, EDTA induced a 12%-decrease of total proteolytic activity in the midgut of larvae from the susceptible strain while no inhibition was observed in the LiTOX strain (Tetreau *et al.*, 2012). As EDTA is a metallo-protease inhibitor, we expected to have a strong decrease of metallo-proteases activities in the LiTOX strain. However, we observed here a global increase of all proteolytic activities, including metallo-proteases, in the LiTOX strain. These discrepancies can be explained by different mechanisms. The literature is still contradictory about the ability of EDTA to inhibit leucine-aminopeptidases (Matsui *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2008) and carboxypeptidases (Alonso-del-Rivero *et al.*, 2009; Igic *et al.*, 2003). Moreover, EDTA is a metal chelator, not a specific inhibitor, and could be inappropriate to inhibit total protease activity using azocasein as substrate. Non-chelator inhibitors, such as bestatin for aminopeptidases (Matsui *et al.*, 2006), are needed to better characterize the role metallo-proteases seem to play in *Bti*-resistance in the LiTOX strain. Moreover, other metallo-proteases activities, like matrix metallo-proteases, have to be measured to determine whether they have decreased activities in the LiTOX strain, that could help explaining the differential inhibition by EDTA of the total proteolytic activity in the LiTOX compared to the susceptible strain (Tetreau *et al.*, 2012).

In this work, we investigated only the constitutive implication of proteases in the *Bti*-resistance of the LiTOX strain, as we compared proteolytic midgut activities of unexposed larvae from the two strains. However, resistance to *Bti* could be inducible, *i.e.* LiTOX larvae may express different gut enzymes only when exposed to *Bti*. Such inducible resistance was shown in *Bt*-resistant insects. For example, in *Spodoptera frugiperda* larvae, 24 hours after ingestion of sublethal doses of Cry1Ca1, a gene encoding a trypsin-like protease was inhibited inducing a lower processing of the toxin leading to Cry1Ca1-resistance (Rodriguez-Cabrera *et al.*, 2010). Such inductive resistance could be a good way to reduce the fitness costs of the *Bti*-resistance and it has to be investigated in the LiTOX strain.

The LiTOX strain was selected using field-persistent *Bti* in mixture with leaf litter. The presence of natural larval food is known to strongly modulate the proteases expression and activities, notably due to the presence of plant protease inhibitors (Erlandson *et al.*, 2010; Hivrale *et al.*, 2011). Selected larvae were exposed to leaves components, such as tannic acids, known to inhibit protease activities (Xu and Qin, 1994). To survive and conserve their digestive abilities, it is possible that protease activities increase was selected in resistant larvae (Brioschi *et al.*, 2007). The presence of leaf litter could have potentially helped larvae to develop the resistance to *Bti* by protease-mediated mechanisms.

As Cry4Aa was the only *Bti* protoxin affected by increased proteases activities, this work provides evidence that resistance by proteases modifications can be a toxin-specific mechanism contrary to the commonly admitted hypothesis of a generalist mechanism of resistance. Resistance by proteases is therefore only partly responsible of the *Bti*-resistance developed by the LiTOX strain, as Cry4Ba and Cry11Aa protoxins are not affected by proteases modifications. This strain seems to have developed other complementary mechanisms of resistance, such as modifications of Cry toxins receptors (Bonin *et al.*, 2009; Paris and Despres, 2012; Tetreau *et al.*, 2012), but the implication of these potential receptors have to be experimentally validated by functional approaches.

## 5. Conclusion

The LiTOX strain, selected with field-persistent *Bti* linked to leaf litter, exhibited a moderate resistance to *Bti*. We investigated the role of proteases in this resistance. Total specific proteolytic activities were increased and Cry4Aa processing was faster in the LiTOX strain than in the susceptible strain. However, one metallo-protease non- inhibited by EDTA appears to be lacking in the LiTOX strain. Further characterization of this metalloproteinase is needed to validate its implication in *Bti*-resistance. We demonstrate that proteases are could be partly responsible of the *Bti*-resistance but cannot explain Cry4Ba and Cry11Aa-resistance, indicating that other complementary mechanisms of resistance are involved in the LiTOX strain. Leaf litter present in several mosquito breeding sites and representing the main larval food, might act as a synergist of protease-mediated resistance. All these findings give new insights in deciphering the mechanisms of resistance mosquito larvae can develop against *Bti* in the field.

## 6. Acknowledgements

The authors would like to thank B. Federici for providing recombinant *Bt* strains. This work was founded by the French National Research Agency (ANR, project ANR-08-CES-006-01 DIBBECO). Guillaume Tetreau was supported by the French Ministry of Research.

## 7. References

Alonso-del-Rivero, M., *et al.*, 2009. A novel metallocarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*- a step into the invertebrate world of proteases. *Febs Journal*. 276, 4875-4890.

Bonin, A., *et al.*, 2009. Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations. *BMC Genomics*. 10.

- Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Bravo, A., *et al.*, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49, 423-435.
- Bravo, A., *et al.*, 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41, 423-431.
- Brioschi, D., *et al.*, 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37, 1283-1290.
- Candas, M., *et al.*, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2, 19-28.
- de Melo-Santos, M. A. V., *et al.*, 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biological Control*. 49, 186-191.
- Elpidina, E. N., *et al.*, 2001. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 48, 206-216.
- Erlandson, M. A., *et al.*, 2010. Characterization of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larval midgut protease complement and adaptation to feeding on artificial diet, brassica species, and protease inhibitor. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 75, 70-91.
- Forcada, C., *et al.*, 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 31, 257-272.
- Forcada, C., *et al.*, 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 42, 51-63.
- Girish, V., Vijayalakshmi, A., 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*. 41, 47.
- Griffitts, J. S., Aroian, R. V., 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. *Bioessays*. 27, 614-624.

- Haider, M. Z., et al., 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry*. 156, 531-540.
- Heckel, D. G., et al., 2007. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95, 192-197.
- Hivrale, V. K., et al., 2011. *Periplaneta americana* midgut proteases differentially expressed against dietary components from different plant seeds. *Physiological Entomology*. 36, 180-186.
- Hosseininaveh, V., et al., 2007. Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae : Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*. 43, 515-522.
- Huang, F. N., et al., 1999. Comparison of midgut proteinases in *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 65, 132-139.
- Igic, R., et al., 2003. Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney. *Peptides*. 24, 1237-1240.
- Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M. J., 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92, 166-171.
- Jurat-Fuentes, J. L., et al., 2011. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*. 6, e17606.
- Karumbaiah, L., et al., 2007. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 146, 139-146.
- Knowles, B. H., et al., 1986. Structurally related *Bacillus-thuringiensis* delta-endotoxins display major differences in insecticidal activity in vivo and in vitro. *Journal of Cell Science*. 84, 221-236.
- Kyle, J. L., Harris, E., 2008. Global Spread and Persistence of Dengue. *Annual Review of Microbiology*. 62, 71-92.
- Lacey, L. A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 23, 133-163.

- Li, H. R., *et al.*, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34, 753-762.
- Lightwood, D. J., *et al.*, 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 5174-5181.
- Marcombe, S., *et al.*, 2011. Resistance of *Aedes aegypti* to insecticides in Martinique and implications for dengue vector control. *Tropical Medicine & International Health*. 16, 284-284.
- Matsui, M., *et al.*, 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*. 387, 1535-1544.
- Oppert, B., *et al.*, 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 23473-23476.
- Paris, M., Despres, L., 2012. Identifying insecticide resistance genes in mosquito by combining AFLP genome scans and 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05499.x.
- Paris, M., *et al.*, 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Management Science*. 67, 122-128.
- R Development Core Team, R: a language and environment for statistical computing., 2007.
- Rajagopal, R., *et al.*, 2009. Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochemical Journal*. 419, 309-316.
- Rodriguez-Cabrera, L., *et al.*, 2010. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*. 12, 2894-2903.
- Shaheen, R., *et al.*, 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*. 27, 347-355.
- Song, S. M., *et al.*, 2008. Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitology International*. 57, 334-341.

Tantely, M. L., *et al.*, 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 317-324.

Tetreau, G., *et al.*, 2012. Larval Midgut Modifications Associated with *Bti* Resistance in the Yellow Fever Mosquito using Proteomic and Transcriptomic Approaches. *BMC Genomics*. 13:248.

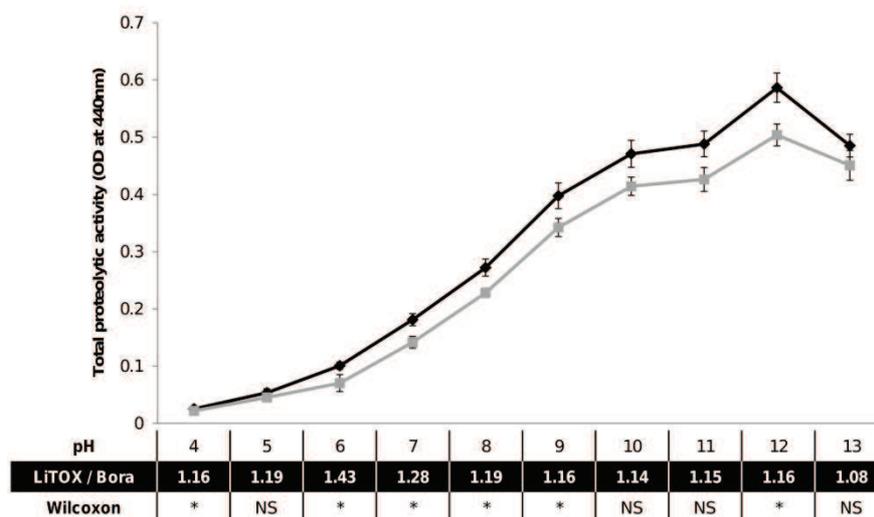
Tilquin, M., *et al.*, 2008. Long Lasting Persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp *israelensis* (*Bti*) in Mosquito Natural Habitats. *PLoS ONE*. 3, e3432.

Tomori, O., 2004. Yellow fever: The recurring plague. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 41, 391-427.

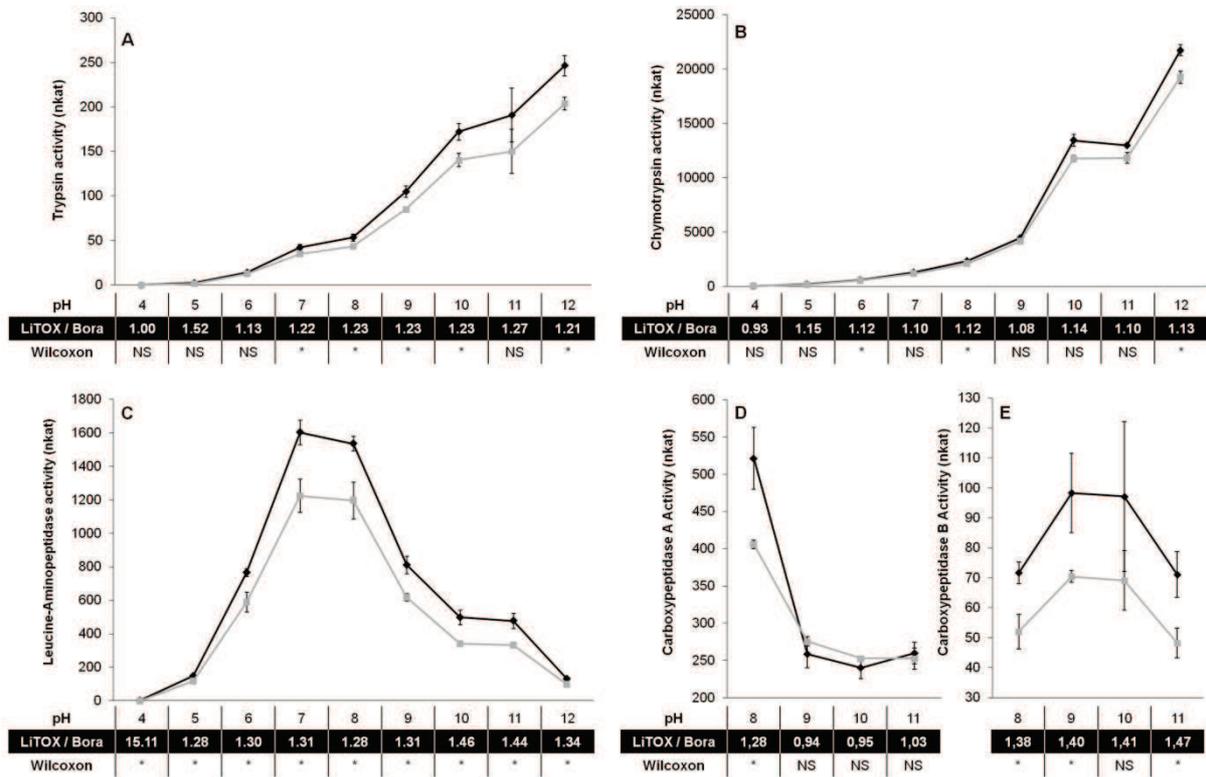
Xu, G., Qin, J. D., 1994. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heliothis-armigera* and *H-assulta* (lepidoptera, noctuidae) and their inhibition by tannic-acid. *Journal of Economic Entomology*. 87, 334-338.

Zhao, J., *et al.*, 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40, 113-118.

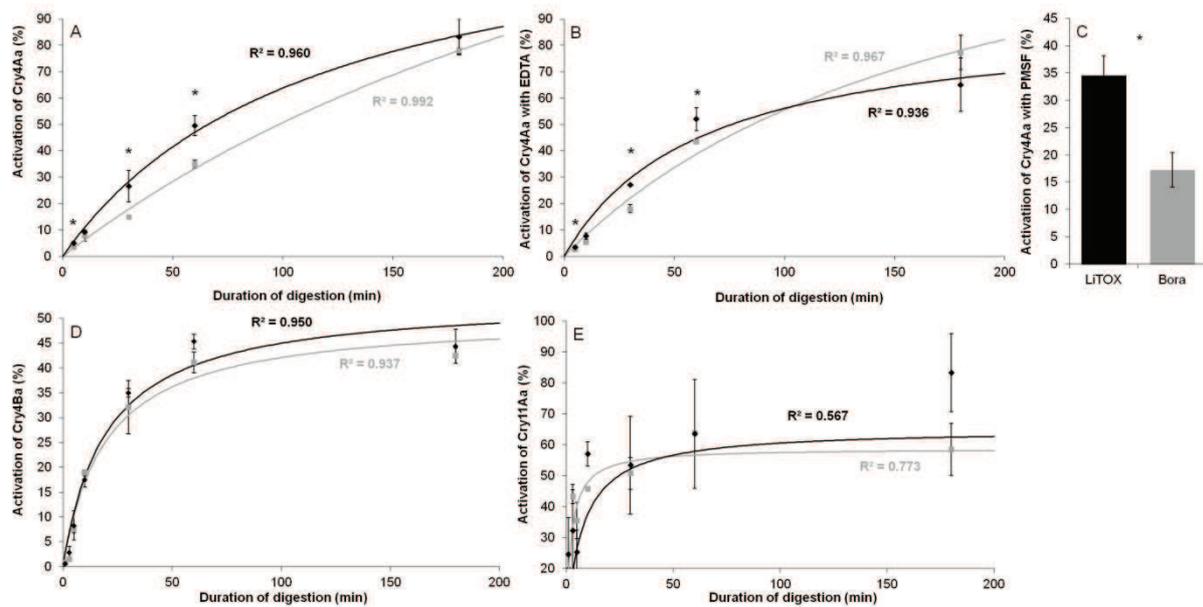
### Figures legends



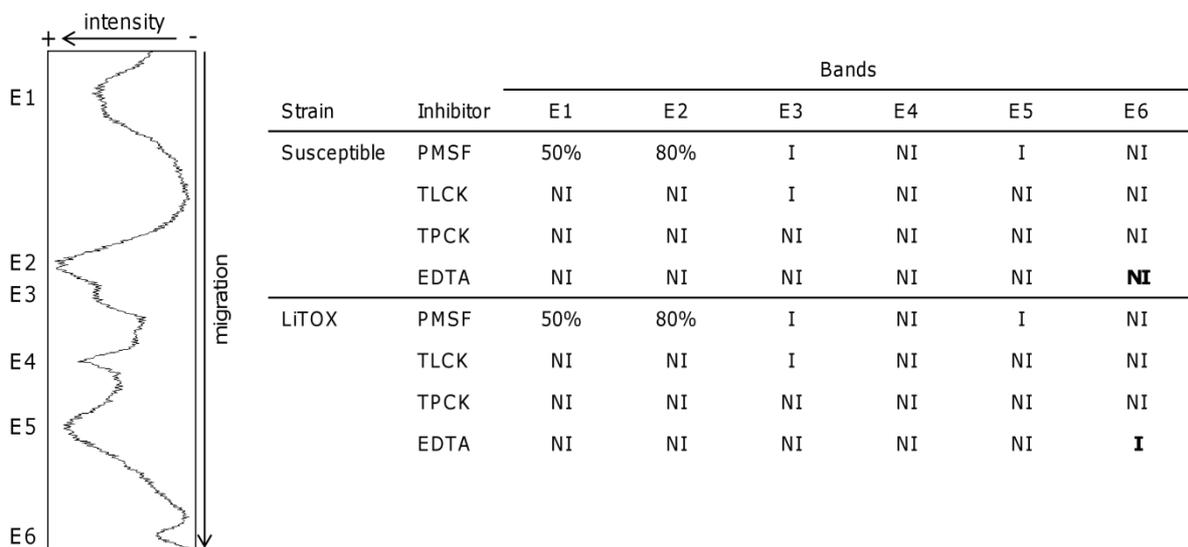
**Figure 1.** Total azocaseinolytic activity for the LiTOX and susceptible strains. For each pH from 4 to 13, ratio LiTOX over Bora-Bora, and optical densities at 440 nm for the LiTOX (black diamond) and susceptible (grey square) strains are indicated. Values are indicated as mean OD  $\pm$  standard error from three biological replicates per pH. ,NS: non-significant differences; \*, p-value < 0.05 (Wilcoxon test).



**Figure 2.** Specific protease activities for the LiTOX and susceptible strains. For each pH, trypsin (A), chymotrypsin (B), leucine aminopeptidase (C), carboxypeptidases A (D) and B (E) activities (in nkat) for the LiTOX (black diamond) and susceptible (grey square) strains are indicated. Values are indicated as mean activity  $\pm$  standard error from three biological replicates per pH. The ratio LiTOX over Bora-Bora and the statistical test performed on the proteolytic activities between the two strains (Wilcoxon test) are also indicated for each pH. NS, non-significant differences; \*, p-value < 0.05 (Wilcoxon test).



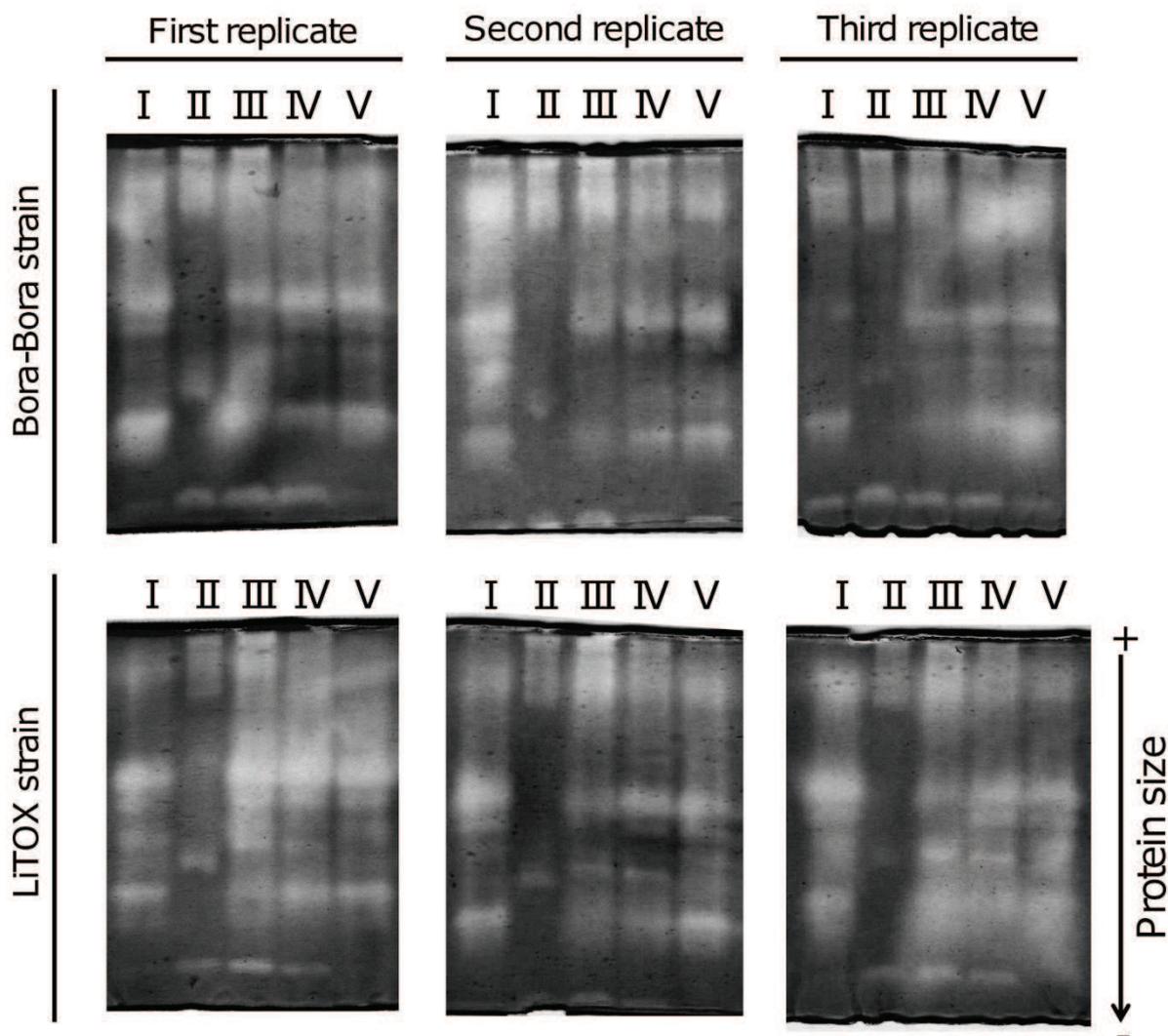
**Figure 3.** Time processing of *Bti* Cry toxins by gut extracts. The percentage of activation of Cry4Aa (A), Cry4Aa with EDTA (B) or PMSF (C), Cry4Ba (D) and Cry11Aa (E) are indicated. Nonlinear regressions were performed using the function  $[pr1 \cdot X1 / (pr2 + X1)]$  using XLSTAT version 2011.4.04 (Addinsoft). Values are indicated as activation  $\pm$  standard error from three biological replicates per digestion duration. Statistical differences ( $p$ -value  $< 0.05$ , Wilcoxon test) between the two strains for all the digestion duration are indicated as a star.



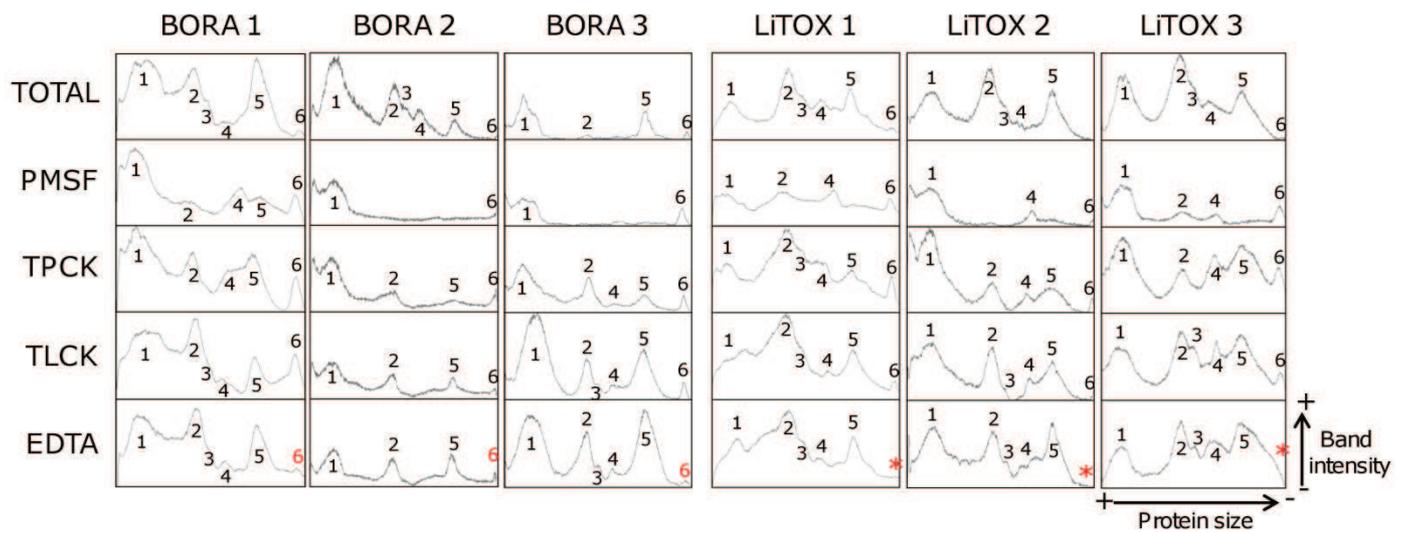
**Figure 4.** Effect of inhibitors on the bands detected by zymogram analyses. The graphic at the left side represents the band intensity along the gel measured for gut extract of the first biological replicate of LiTOX strain using Imagej software. The six different bands identified on the zymograms are indicated, from E1 to E6. The table at the right side summarizes the results obtained from the zymograms of each of the three biological replicates from each

strain (SuppFile1 & 2). For both strains, results of inhibition with PMSF, TLCK, TPCK and EDTA are indicated. When bands were only partially inhibited, the percentage of inhibition is indicated. I, inhibited; NI, not inhibited. Differences between the two strains are indicated in bold.

### Supporting Information legends



**Figure S1.** Zymograms analyses of the gut extracts from the three biological replicates from the two strains. Zymograms of gut extracts without inhibitor (I) or with PMSF (II), TLCK (III), TPCK (IV) or EDTA (V) are shown.



**Figure S2.** ImageJ analyses of the zymograms presented in the figure S1. BORA 1, 2 and 3 are referring to the three biological replicates of the susceptible strain and LITOX 1, 2 and 3 to those of the LiTOX strain. A number (from 1 to 6) is indicated when the corresponding band (E1 to E6) is present on the profile. The difference between the two strains for the EDTA inhibition of the E6 band is indicated in red.



## Liste des annexes

- I. Protocole d'extraction du *Bti* à partir d'échantillons environnementaux et test ELISA
- II. Manuel d'élevage de moustiques en laboratoire
- III. Protocole de 2D-DIGE (Differential In Gel Electrophoresis)
- IV. Protocoles de mesure des activités protéolytiques totales et spécifiques
- V. Fiche d'échantillonnage de larves de moustiques en populations naturelles



# ANNEXE I

## Extraction and ELISA Protocol

Brevet N°FR 11 60365

### Products

Carbonate Buffer: 0.1 M – pH 9.5

<b>Ref. Nb.</b>	<b>Product</b>	<b>Mass (g)</b>	<b>Molar Mass (g.mol<sup>-1</sup>)</b>
59	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3.56	106
275	NaHCO <sub>3</sub>	8.4	84
	Distilled Water	qsp 1L	

PBS 10X:

<b>Ref. Nb.</b>	<b>Product</b>	<b>Mass (g)</b>	<b>Molar Mass (g.mol<sup>-1</sup>)</b>
68	NaCl	382.5	58.4
183	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.5	136
184bis	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	36.2	142
	Distilled Water	qsp 5L	

Sodium carbonate: 50 mM – pH 10.5

<b>Ref. Nb.</b>	<b>Product</b>	<b>Mass (g)</b>	<b>Molar Mass (g.mol<sup>-1</sup>)</b>
59	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5.3	106
	Distilled Water	qsp 1L	

PBS/BSA 3% → Prepare 10 mL/plate (300mg for 10mL)

PBS/BSA 1% → 300 mg for 30 mL (used for antibodies dilutions)

UltraTMB 1L W6467T Fisher Scientific 349,00€

BSA

Tween20

Sulfuric Acid

### Materials

Distripipette: Coating, Detection antibodies, Blocking

Pipette: Dilution series

Bain-marie with agitation

Maxisorp plates (Nunc)

50mL centrifuge tube (Greiner)

Ultrasonic Homogenizer Sonopuls HD 2200 (Bandelin)

Microplate reader Varioskan Flash (Thermo)

## Protocol

Day -15 to Day -1

### 1) Extraction

1. Put 1g in a 50mL centrifuge tube (GREINER)
2. Add 5mL of extraction buffer (EB) just before sonicating.  
EB: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM  
BSA 2%  
Tween20 1%  
pH 10,8
3. Vortex until total suspension of the litter.
4. Sonicate 5 x 10" – wait for 2' in ice – sonicate again 5 x 10".
5. Incubate at 37°C for 1h (bain marie) with agitation
6. Centrifuge 2' at 2000g.
7. Supernatant can be stored at -20°C during 15 days.

Day -1

### 2) Coating of ELISA plates with the capture antibodies (solubilised in carbonate buffer)

1. 100 µl per well (IgG2 at 25 µg/mL ; ready to use for Cry11 and Cyt, [Cry4AB]i = 8957 µg/mL → 28µL qsp 10mL carbonate buffer)
2. Incubate overnight at 4°C without shaking
3. Washing 3 times with PBS/Tween20 0,1%

### 3) Blocking

1. 100 µl per well of PBS/BSA 3% 1h30 at 37°C.
2. Don't wash

### 4) Dilution series

1. Resuspend lyophilized toxins in 1mL of distilled water  
*Toxins will be quantified by a Bradford assay at this step*
2. Dilutions of the solubilized toxins are made with the extraction buffer (EB)
3. 100 µl per well, 1h, at 37°C
4. Washing 3 times with PBS/Tween20 0,1%

### 5) Detection antibodies

3. 100 µl per well (IgG1), 1h, at 37°C  
Dilutions: 1 µg/mL in PBS/BSA1%  
[IgG1 4AB]i = 5006 µg/mL → 1/5000  
[IgG1 11]i = 4773 µg/mL → 1/4500  
[IgG1 Cyt]i = 4643 µg/mL → 1/4500
4. Washing 3 times with PBS/Tween 20 0,1%
5. 100 µl goat-anti-mouse-IgG1 conjugated with peroxidase 1h, at 37°C  
Dilutions in PBS/BSA1%  
Cry4AB : → 1/6000  
Cry11 : → 1/6000  
Cyt : → 1/6000
6. Washing 3 times with PBS/Tween20 0,1%

Day of the experiment

### 6) Detection reaction

1. 100 µl of UltraTMB  
Time to wait before blocking :  
Cry4AB : 3'  
Cry11 : 5'  
Cyt : 5'
2. Blocking with 100 µl / well of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M
3. Measuring at 450 nm

## ANNEXE II



## MANUEL D'ELEVAGE DE MOUSTIQUES DU GENRE *Aedes* EN LABORATOIRE

Version 1.1

par Guillaume TETREAU (Juillet 2011)

*Ce manuel a été rédigé afin de centraliser toutes les informations, astuces, idées utiles pour faire un élevage de moustiques et des sélections. Le but est de partager entre utilisateurs, chevronnés ou occasionnels, les petits trucs qui font passer d'une cage avec de petits adultes et une forte mortalité à des cages pleines de gros adultes pondant rapidement de grandes quantités d'œufs.*

## I. Cycle de vie du moustique en milieu naturel

Les moustiques présentent quatre étapes dans leur développement en populations naturelles (figure 1) :

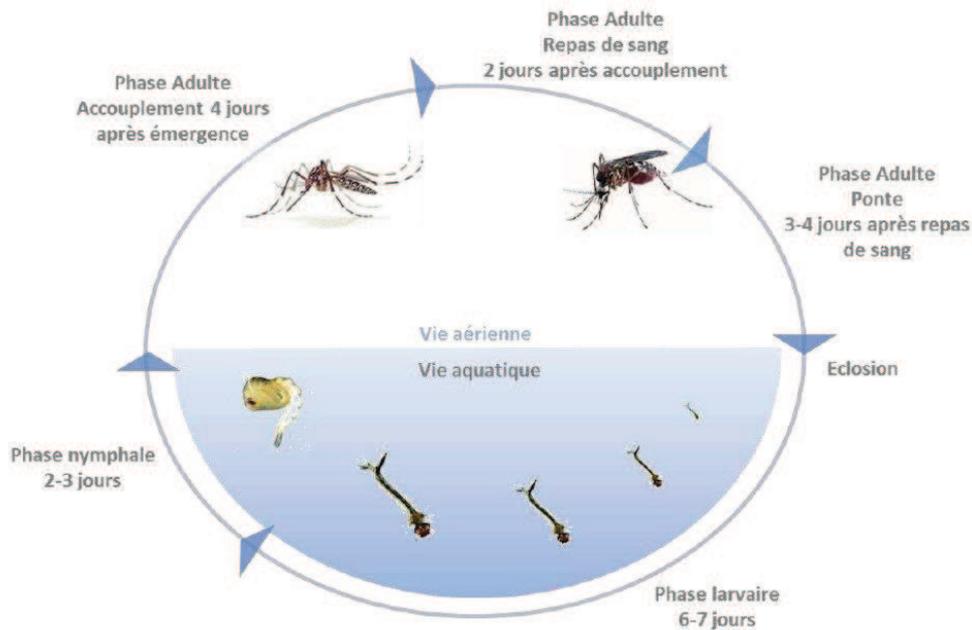


Figure 1. Cycle de développement de moustiques du genre *Aedes*. (© R. Poupardin, thèse)

- **4 stades larvaires**, séparés par une mue : à ces stades, le moustique va se nourrir de débris végétaux. Le temps de développement va varier en fonction de son environnement (température, densité en larves, nourriture).
- **Stade nymphal** : à ce stade, les moustiques ne se nourrissent plus. Ce stade dure approximativement 2 jours.
- **Stade adulte** (imaginal) : les moustiques émergent et sortent du milieu aquatique pour le milieu aérien. Les mâles émergent quelques jours plus tôt que les femelles car leur système reproducteur nécessite 2-3 jours de maturation pour être pleinement fonctionnels. Les imagos se nourrissent de nectar des plantes et seules les femelles, lors de la maturation de leurs œufs, vont devoir réaliser un repas de sang. Après s'être accouplée, la femelle stocke le sperme pendant plusieurs mois. Dans la nature, les moustiques vivent en moyenne 2 à 3 semaines.
- **Stade œuf** : les œufs sont pondus à l'interface entre l'air et l'eau. Lors de fortes pluies, le niveau de l'eau augmente et immerge les œufs entraînant leur éclosion.

A partir de ces connaissances, nous allons présenter les astuces qui permettent d'élever des moustiques en laboratoire.

## II. Gestion des adultes – Cages d'élevages :

Les adultes sont élevés dans des cages d'élevage. Deux formats sont disponibles (figure 2) :

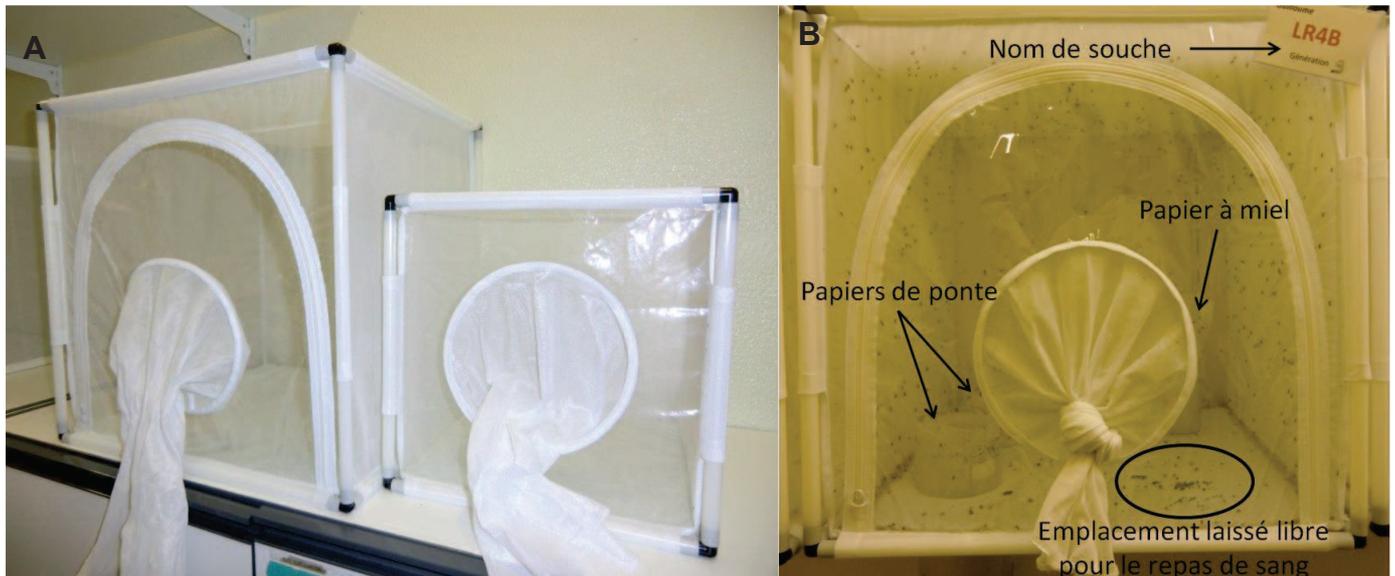


Figure 2. A. Cages d'élevage grand format (gauche) et petit format (droite). B. Organisation d'une cage en fonctionnement dans l'insectarium.

1. Les **grosses cages** sont privilégiées dans le cas d'élevages des souches car elles peuvent accueillir jusqu'à **2000 individus**.
2. On optera pour les **petites cages**, qui peuvent contenir jusqu'à **1000 individus**, pour des expériences à court terme ou un maintien temporaire de souches.

Au-delà de ces densités, les moustiques se cognent aux parois et ont tendance à se noyer, induisant une sélection non souhaitée des adultes.

Dans les grosses cages, préférer **1000-1500 individus**, soit 500-750 femelles pondueuses par cage. Toujours avoir **plus de 500 adultes par cage** pour éviter d'avoir un effet de la **dérive génétique** qui pourrait biaiser toutes les analyses réalisées par la suite !

En-dessous de 500 individus, préférer recommencer la sélection et/ou la mise en eau plutôt que de prendre le risque de sélectionner des gènes sans aucun lien avec la pression de sélection appliquée.

Dans de telles conditions, les moustiques femelles peuvent **vivre jusqu'à 2-4 mois** en cage.

A noter : **Les mâles vivent entre 1 et 2 semaines.** Ainsi, lorsque vous estimez la quantité d'adultes dans une cage, pensez à diviser par deux (sex-ratio 50%) pour savoir le nombre de femelles pondueuses réellement présentes. Autrement dit, ne soyez pas surpris si la densité de moustiques diminue drastiquement quelques semaines après, c'est juste lié à la mort des mâles !

Pour qu'ils se nourrissent, le nectar des plantes est remplacé par du **miel badigeonné sur du papier filtre**. Deux techniques sont utilisées au laboratoire (figure 3) :



**Figure 3.** Pot en verre avec papiers à miel en accordéon (gauche) ou recouvrant (droite).

- 1. Plié en accordéon** (4-5 plis), le papier filtre est enduis à moitié avec du miel et l'autre moitié est plongé dans un petit pot en verre rempli d'eau du robinet. Cela permet au papier de rester humide et empêche donc le miel de sécher. Apporte en plus de l'eau pour que les moustiques se désaltèrent.

*Avantages :*

- Il reste humide environ 1 semaine.
- On peut mettre beaucoup de miel

*Inconvénients :*

- Les moustiques peuvent se noyer dans l'eau
- On s'en met pas plein les doigts et le manchon en le rentrant dans la cage
- L'eau « daube » régulièrement, entraînant des odeurs nauséabondes si laissé trop longtemps. *Astuce :* ne pas mettre de miel en excès permet d'éviter que le miel tombe dans l'eau et limite cet effet.

- 2. Le papier filtre recouvre le petit pot** en verre rempli d'eau et est tenu à l'aide d'un élastique. Le miel est badigeonné à la surface.

*Avantages :*

- On ne s'en met plein les doigts et le manchon en le rentrant dans la cage
- Les moustiques ne peuvent plus se noyer avec ce système

*Inconvénients :*

- Le papier sèche rapidement et doit être changé au moins 2 fois par semaine
- On ne peut pas mettre beaucoup de miel

### III. Gestion des œufs – Papiers de pontes :

Pour que les moustiques puissent pondre, nous simulons une interface air/eau à l'aide de cristallisoir de 300mL dans lesquels nous introduisons des papiers filtres découpés en bandelettes (idéalement : 7 cm sur 30 cm). Ces cristallisoirs sont remplis à ras bord d'eau du robinet.

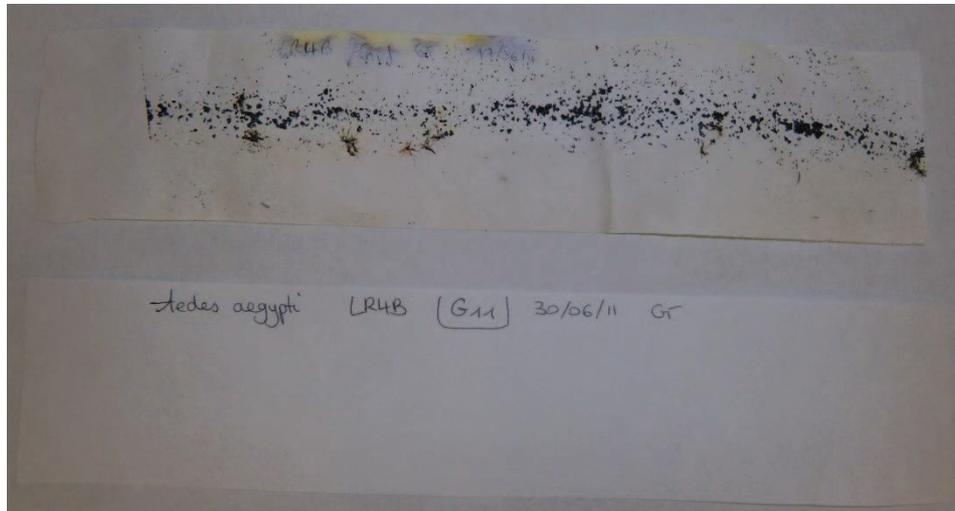


Figure 4. Papiers de ponte avant (bas) et après (haut) 1 semaine dans une cage d'élevage. Chaque point noir représente un œuf. Sur chaque papier, indiquer l'espèce, la souche, la génération, la date et les initiales du responsable.

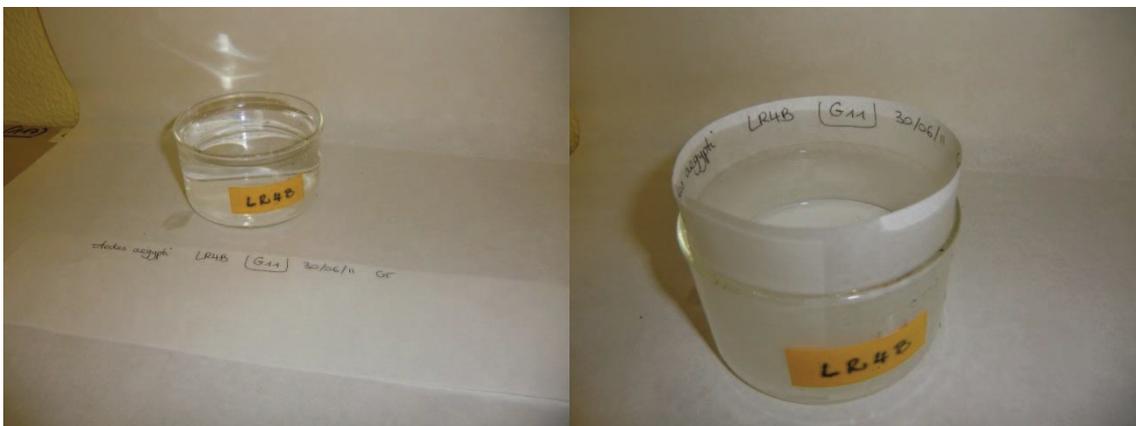


Figure 5. Protocole de mise en place du papier de ponte dans le cristallisoir.

Les femelles vont donc pondre leurs œufs sur ces bandelettes. Malgré l'humidité forte de la pièce, l'eau finit toujours par s'évaporer. Cela permet aux femelles de pondre sur la quasi-totalité du papier en 1 semaine. **Les papiers doivent être changés chaque semaine.**

Astuce : Il est conseillé de changer les papiers après un repas de sang pour éviter de se faire piquer.

Astuce : Les femelles pondent préférentiellement lorsqu'il y a des larves / nymphes dans le cristallisoir, gage de la bonne qualité de l'eau. Dans la mesure du possible, laisser les larves présentes dans les cristallisoirs favorise l'augmentation des pontes. Veillez à ne pas les laisser émerger dans le cas de souches sélectionnées.

Les bandelettes sont ensuite récupérées et mises à sécher 1 semaine dans des boîtes en plastiques contenant du papier absorbant dans le fond et sont mise entre deux couches de papier filtre (figure 6 ; détail du protocole ci-après). Une fois secs, **les œufs peuvent être conservés jusqu'à 4 mois** sans différences dans l'éclosion des œufs chez la souche sensible. Pour certaines souches résistantes, la fitness des œufs **résistants** peut diminuer la **durée de vie des œufs à moins de 2 mois**. Dans la mesure du possible, lancer de nouvelles sélections dès que le nombre d'œufs disponibles est suffisant.



Figure 6. Protocole de séchage des œufs.

### Protocole de séchage des œufs :

- A. Des boîtes en plastiques aux contours perforés sont utilisées pour le séchage des œufs.
- B. Mettre du papier absorbant généreusement au fond des boîtes afin d'absorber l'humidité.
- C. Du papier filtre est placé au-dessus du papier absorbant de manière à pouvoir le refermer sur les œufs.
- D. Les papiers à œufs humides sont disposés pliés sur le papier filtre.
- E. On repose le couvercle sur les boîtes. ATTENTION : ne pas fermer la boîte hermétiquement pour permettre un séchage optimal.
- F. Une fois sèches (1 semaine), les bandelettes sont placées dans des enveloppes faites main, elles-mêmes placées dans des sacs de congélation pour éviter les contaminations. Plusieurs souches sont regroupées dans des boîtes de stockage.

#### IV. Gestion des larves – Mises en eau :

Pour faire éclore les œufs, plusieurs techniques sont possibles.

1. La technique utilisée en routine au laboratoire est d'utiliser de la **nourriture pour lapins** (figure 7). Dans des bacs de 25 cm sur 35 cm, on dispose **5L d'eau du robinet à 25°C**.

Double avantage : cela **abaisse la quantité d'oxygène dans l'eau** (paramètre indispensable à l'éclosion des œufs) et fournit une **source riche de nourriture** aux larves pour leur croissance.



Figure 7. Nourriture pour lapins

2. Pour synchroniser l'éclosion des œufs, on peut utiliser un **erlenmeyer relié à une pompe à vide**. Les œufs immergés sont soumis au vide **pendant 15 à 45 minutes**, entraînant une éclosion quasi simultanée de 90% des œufs.

**Ne pas sur-doser la nourriture !** Contrairement à ce que l'on peut penser, trop de nourriture n'augmente pas l'éclosion et est même un frein au développement des larves. Aux stades 1 et 2, les larves se nourrissent très peu. Ainsi, on observera un fort développement bactérien qui produira un bio-film à la surface pouvant asphyxier les larves.

Si possible, mettre la nourriture 1 heure avant les bandelettes d'œufs pour une éclosion plus homogène. **Bien immerger les papiers à œufs** en veillant à ne **jamais excéder 1500-2000 larves par bac** (1000 larves est optimal). Au-delà de cette densité, les larves seront petites et non synchronisées (coexistence de petites et de grosses larves de stades 1 à 4).

Voici deux plannings indicatifs des quantités de nourritures à donner en fonction de la date de mise en eau et de la nourriture deux fois par jour (haut) ou une fois par jour (bas)

(environ 1000 larves) : *Le rectangle représente 1 unité de nourriture (UN) :*

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7	Jour 8
Matin				2 UN	2 UN	3 UN	3 UN	3 UN
Après-midi	5 UN		(5 UN)	2 UN	2 UN	3 UN	3 UN	3 UN
	↑ Mise en eau			↑ Nymphes				
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7	Jour 8
Matin				3 UN	4 UN	4 UN	4-5 UN	4-5 UN
Après-midi	5 UN		(5 UN)					
	↑ Mise en eau			↑ Nymphes				

A noter : La règle principale étant de ne pas sur-doser la nourriture et d'en rajouter dès qu'il n'y en a plus.

## V. Comment avoir de gros adultes ?

Une règle simple :

Grosses larves → Gros adultes → Grosses pontes → Générations successives plus rapides

Avoir de gros adultes est un travail laborieux qui se joue à tous les stades de développement. Quelques règles permettent d'obtenir de gros adultes :

1. **Ne pas surcharger** les bacs de mise en eau.
2. **Ne pas sur-doser** la nourriture.
3. **Changer l'eau des moustiques** permet de les remettre en conditions favorables et leur permet de **changer de stade plus rapidement**. Il est conseillé de le faire lorsque l'on approche de la nymphose pour synchroniser les nymphes et faciliter le travail de transfert.
4. **Eviter de transférer des larves dans les cages** autant que faire se peut. Elles se développeront lentement et finiront par **mourir massivement** en cas de trop fortes densités (e.g. plus de 100 larves dans un cristalliseur).

Astuce : Les larves doivent être placées dans des bacs propres, avec de la nourriture suffisante pour 10-12h à renouveler matin et soir ou pour 24h à donner le matin ou le soir (figure). **Les nymphes doivent être transférées tous les jours** ou au moins tous les deux jours pour éviter les émergences. Les nymphes sont placées directement dans les cristalliseurs ou dans des petits gobelets en plastiques pour éviter que les adultes émergés ne se noient.

A noter : Eviter de mettre des larves dans des cristalliseurs avec les bandelettes de ponte. Si vous rajoutez de la nourriture, vos œufs pondus vont moisir et leur durée de vie décroître fortement. Si vous ne rajoutez pas de nourriture, les larves mangeront la bandelette de papier qui deviendra alors inutilisable.

A noter : Eviter de mettre des nymphes dans des supports sans bandelette de papier si des femelles de la cage sont déjà en état de pondre. Vous vous retrouverez avec des œufs sur le support, augmentant le risque de contamination d'autres souches et rendant leur manipulation/séchage très difficile.

De cette manière, les larves se nourrissent bien, évoluent dans une eau propre favorable à leur développement et donneront de grosses nymphes. Ces nymphes donneront des **adultes qui vivront plus longtemps, pondront plus d'œufs et seront moins fragiles** que les autres. Cela prend donc du temps mais l'investissement est vite rentabilisé !

## VI. Comment éviter que les moustiques s'échappent ?

### ○ **Éliminer les œufs et les larves :**

Pour éviter que les œufs et les larves ne se retrouvent dans les canalisations et risquent d'envahir des gîtes naturels présents autour du laboratoire, plusieurs précautions peuvent être prises.

1. Jeter systématiquement dans des sacs à autoclave les œufs encore présents sur les papiers de pontes après une mise en eau. Les sacs sont ensuite **autoclavés 20 minutes à 120°C** pour détruire les œufs.
2. Vider l'eau contenant les larves et les quelques œufs dispersés non éclos dans une **passoire munie d'un filtre au maillage très fin** puis :
  - a. A l'aide de papier absorbant, récupérer le tas de larves et le jeter dans un sac à autoclave ;
  - b. Faire passer de l'**eau bouillante pendant au moins 5 minutes** afin de tuer les larves et les œufs.

A noter : Passer les larves et œufs à l'eau bouillante permet d'en éliminer 99% si cela est bien fait. A la longue, la routine aidant, le temps d'ébouillantage se réduit, c'est inévitable. De ce fait, il est fortement recommandé de prendre l'habitude de faire l'étape a. ET l'étape b.

### ○ **Limiter la sortie des adultes :**

Pour limiter leur évasion, il convient de faire très attention lorsque l'on fait entrer ou sortir des objets des cages.

Toujours **souffler fortement** sur le manchon afin de faire s'envoler les moustiques éventuellement posés. Lorsque l'on introduit ou enlève un objet de la cage, il faut souffler fortement pour créer un **courant d'air empêchant les moustiques de sortir**.

**Inspecter minutieusement** tout objet sortant de la cage pour vérifier qu'aucun moustique ne se dissimule.

Transférer les nymphes tous les jours est idéal. Les nymphes émergent en général après plus de 48h mais certaines peuvent émerger avant. Attendre deux jours est donc à éviter.

○ **Éliminer les adultes :**

Les moustiques réussissent régulièrement à s'échapper des cages. Il est **INDISPENSABLE** de les éliminer pour éviter qu'ils ne s'échappent. Plusieurs solutions existent :

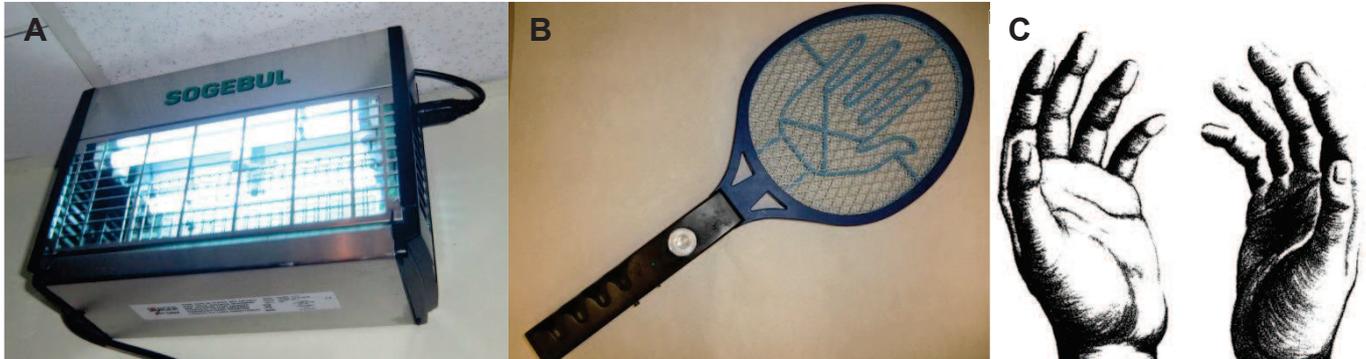


Figure 8. Dispositifs de lutte contre les moustiques adultes.

- A. Les désinsectiseurs.** Placés aux deux endroits stratégiques (*i.e.* dans l'insectarium et dans le sas), ils sont à considérer comme un garde-fou, permettant d'éradiquer les quelques moustiques qui auraient réussi à déjouer l'attention des utilisateurs. Ils ne peuvent constituer le seul outil pour empêcher l'évasion des moustiques.
- B. Les raquettes électrifiées.** Elles sont d'une efficacité redoutables et permettent d'allier l'utile à l'amusant. C'est l'outil à privilégier pour tuer les moustiques volants. Penser à les **faire recharger régulièrement** pour une efficacité maximale.  
**Ne pas appuyer trop fort sur le bouton** qui se casse très facilement.
- C. Les mains.** Au moins, on galère pas à les retrouver (en général) ! Penser à **les mouiller à l'eau** pour une meilleure efficacité (les moustiques se collent aux mains et n'arrivent donc pas à s'échapper).

## VII. Repas de sang

### ○ Organisation du repas de sang

Pour amener leurs œufs à maturité, les femelles moustique doivent réaliser un repas de sang. Les moustiques *Aedes aegypti* supportent très bien des modèles tels que les souris.

Les souris sont élevées dans des cages avec une densité oscillant entre 6 et 15 souris par cage. L'objectif est que les souris soient utilisées toutes les deux semaines pour leur éviter un stress trop important.



Figure 9. Cages d'élevage des souris pour le repas de sang. La brique permet de lester le couvercle pour éviter que les souris ne s'échappent.

**Un repas de sang par semaine** est prévu, réalisé le **Jeudi en binôme**, et comprend également l'entretien des souris. Les cages des souris sont ainsi javellisées puis rincées, la litière changée et l'eau et la nourriture remplis.

A noter : Le **premier repas de sang** doit être réalisé **au moins une semaine après la mise en cage**. Avant, il y a principalement des mâles (qui ne piquent pas) et le proboscis des femelles est encore trop fragile pour piquer et réaliser un repas de sang correct.

Astuce : Au début d'une nouvelle génération, si on veut avoir beaucoup d'œufs lorsque la population est à son effectif maximal, on peut réaliser **deux repas de sang par semaine** : le Lundi et le Jeudi.

Pour que les moustiques piquent de manière efficace et éviter une importante mortalité des moustiques, la souris doit être immobilisée à l'aide de **petits fourreaux grillagés**. Tenir le fourreau avec l'ouverture vers le bas : la souris entre plus facilement en grimpant. Une fois la souris entrée, le fourreau est refermé à l'aide d'une pince. Faire en sorte que la souris ne puisse pas se retourner ni bouger de manière excessive : cela nuirait au bon déroulement du repas de sang.

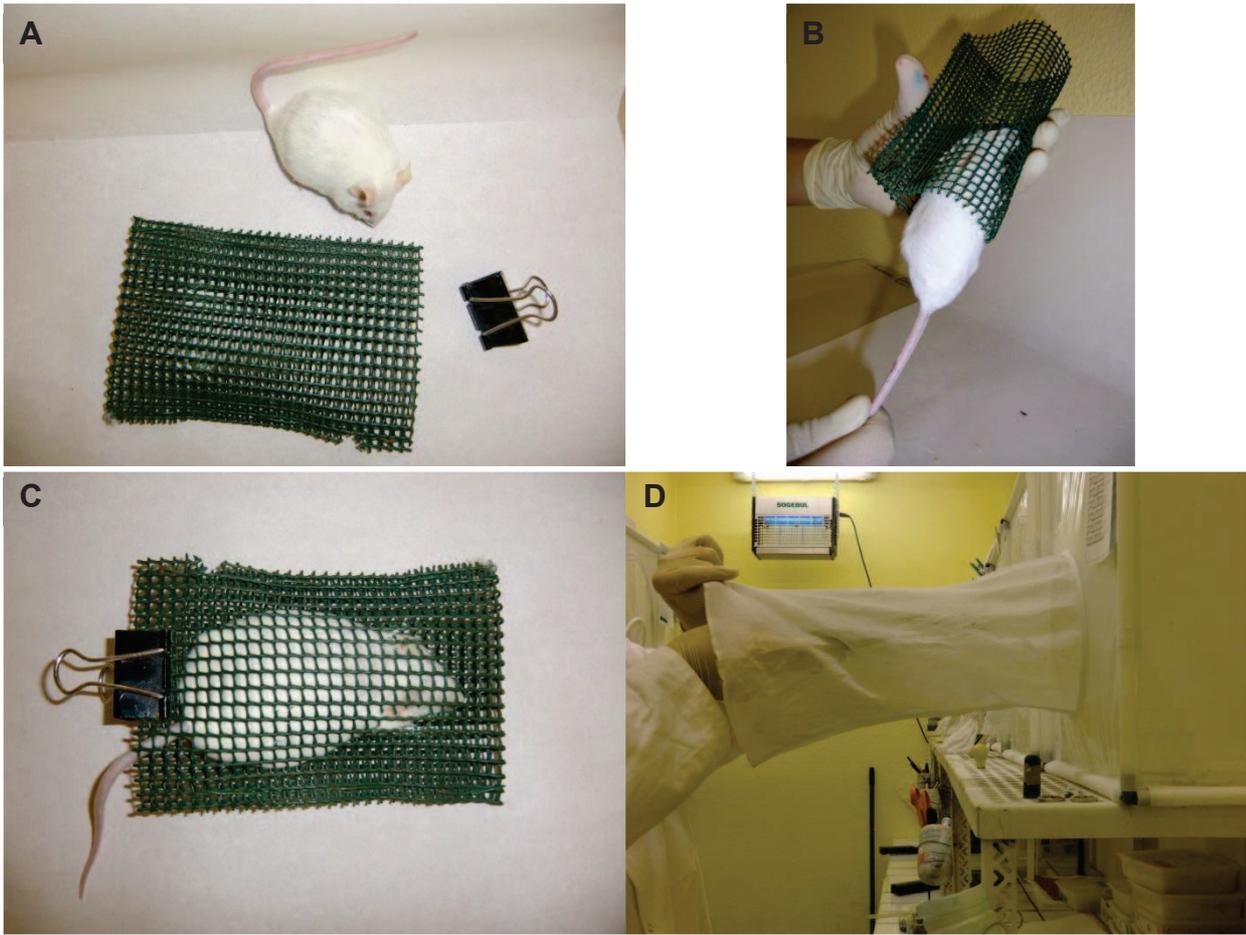


Figure 10. Système de mise des souris dans les grilles pour le repas de sang. A. Matériel pour le repas de sang (grillage, souris, pinces) ; B. Pour faire entrer les souris, tenir le grillage penché, les souris entrent plus facilement dans le grillage en grim pant ; C. Souris dans le grillage ; D. Insertion de la souris dans la cage.

Astuce : Préférer des **grillages en métal** car les grillages en plastiques sont facilement rongés par les souris voulant s'échapper. Néanmoins, le plastique a l'avantage d'être plus flexible et donc plus aisément manipulable.

○ **Comment ne pas faire sortir les moustiques ?**

L'étape d'insertion et de retrait des souris dans les cages est généralement critique et il est courant de voir des moustiques s'échapper. Pour éviter cela, quelques astuces permettent une manipulation rapide en limitant les gestes parasites et les situations critiques :

1. **Préparer toutes les souris avant** de les insérer dans les cages (figure 10A,B,C). Cela évite d'avoir trop de décalage entre les cages. De plus, si certains fourreaux sont mal fermés, cela se verra et évitera d'avoir une souris affolée dans une cage remplie de moustiques.
2. **Secouer le nœud** du manchon et **souffler fortement** pour faire s'envoler les moustiques potentiellement posés dessus.
3. Défaire le nœud et **tendre le manchon bien droit** pour faciliter l'insertion du grillage (figure 10D). Si le manchon n'est pas suffisamment tendu, le grillage va se prendre dedans et le temps de le décrocher, les moustiques peuvent s'échapper.
4. **Insérer la souris tout en soufflant** pour empêcher les moustiques de sortir.
5. **Refermer le manchon** en tournant le manchon au moins une fois sur lui-même et en faisant un nœud.
6. Laisser les souris dans la cage pendant **45 minutes à 1 heure**. Préférer mettre 2 souris pendant 1 heure qu'une seule souris pendant moins de 30 minutes.

A noter : Les souris ne meurent que très rarement lors du repas de sang. Généralement, c'est le stress provoqué par la situation qui leur fait faire des attaques cardiaques. En laissant les souris **moins de 30 minutes**, les moustiques n'ont **pas le temps de piquer** et les souris stressent donc inutilement !

7. Avant de retirer les souris, il faut **souffler fortement sur la souris** pour retirer l'intégralité des moustiques posés. Ne pas hésiter à insister car des femelles en pleine pique sont parfois bien accrochées.
8. **Retirer la souris** en tendant le manchon et en **soufflant fortement** pour éviter que des moustiques ne s'échappent.
9. **Refermer le manchon** en tournant le manchon au moins une fois sur lui-même et en faisant un nœud.

## VIII. Bioessais

### ○ Qu'est-ce qu'un bioessai ?

Les bioessais permettent de déterminer la toxicité d'une molécule sur une population. Nous calculons généralement la  $LC_{50}$ , concentration à laquelle 50% de la population étudiée meurt. Nous réalisons les bioessais sur larves de moustiques en conditions contrôlées (salle bioessais) dans des **gobelets en plastique blancs** contenant **50mL d'eau du robinet** et **20-25 larves**.



Figure 11. Bioessais comparant deux souches de moustiques.

Lors d'un bioessai, on expose des lots de larves à des concentrations croissantes de la molécule à tester. Pour avoir des données de qualité, il convient de toujours faire **au moins 3 réplicats** par concentration et **6 concentrations**.

A noter : Augmenter le nombre de réplicats apportera de **meilleurs intervalles de confiance** et donc une plus grande fiabilité dans le calcul de la  $LC_{50}$ . Préférez cette option si vous avez déjà bien ciblé votre gamme et votre  $LC_{50}$ .

Augmenter le nombre de doses permet de **mieux encadrer la  $LC_{50}$**  ou de ne pas la rater. Préférez cette option si vous doutez de la localisation de votre  $LC_{50}$ .

Astuce : Utiliser préférentiellement des **gobelets blancs** et non translucides. Avec des gobelets translucides, la couleur de la table est visible, pouvant ralentir le comptage des larves.

Astuce : Pour éviter d'écrire sur tous les gobelets ce qui fait perdre beaucoup de temps, **n'écrivez que sur les gobelets de devant** en notant la molécule et la souche.

Penser également à utiliser un **code couleur par souche** (ici Vert pour Bora et Noir pour Litox). Cela permet d'éviter facilement des erreurs d'inattention.

### ○ Mise en place du bioessai

Tout d'abord, les larves de plusieurs bacs sont poolées dans un cristalliseur. Pour faciliter le tri, on en met une centaine dans une grande coupelle pour faciliter leur dispersion et leur tri (figure 12).

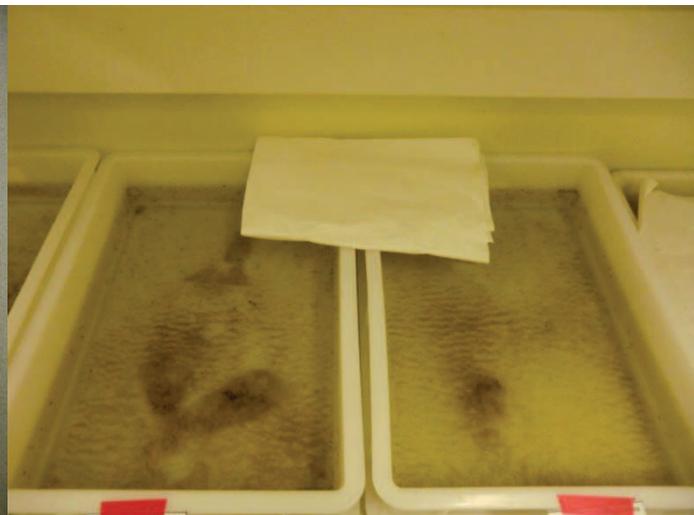
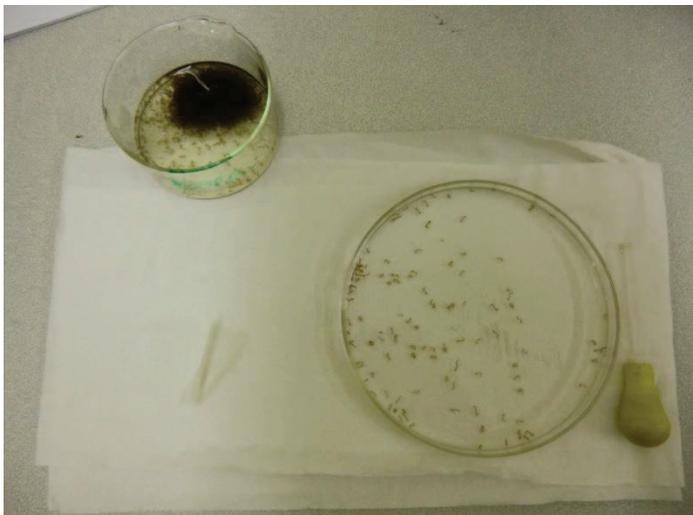


Figure 12. Poste de travail pour la mise en gobelet avant un bioessai.

Figure 13. Dispositif pour générer un coin d'ombre

Astuce : Parfois, on a fait une mise en eau « un peu juste » au niveau du nombre de larves et on a l'impression qu'il reste trop peu de larves. Pour récupérer un maximum de larves, il faut générer un **coin d'ombre dans les bacs**. Les larves préférant l'obscurité à la lumière, elles se regrouperont dans ce coin, facilitant leur récupération.

Pour ce faire, on met généralement un morceau de papier filtre dans un coin du bac (figure 13).

Les gobelets blancs sont remplis avec exactement 50mL d'eau du robinet. Lorsque l'on rajoute les larves, on risque d'augmenter le volume et donc de biaiser la concentration en produit final. Deux techniques sont utilisées :

1. **Gobelets – Filtre – Gobelets.** Les larves sont mises dans des gobelets dont le volume n'est pas précisément mesuré. Lorsque le comptage est fait, on transfère les larves de chaque gobelet dans des gobelets à volume précis (50mL) en récupérant les larves à l'aide d'un filtre.

*Avantages :*

- Permet un tri rapide des larves
- On peut vérifier qu'il n'y a pas de morts liés au comptage lors de la filtration.

*Inconvénients :*

- Travail de filtrage laborieux
- Utilise beaucoup de place (2 gobelets utilisés pour 1 final).
- Manipulation des larves avec un filtre qui peut les endommager.

2. **Filtre – Gobelets.** Avant de les mettre dans les gobelets avec 50mL d'eau, les larves sont comptées et déposées dans un filtre (figure 14A). Dès que 20-25 larves sont dans le filtre, on les dépose délicatement dans les gobelets (figure 14B).

*Avantages :*

- Tri et filtrage rapide. On combine les deux étapes en une seule.

*Inconvénients :*

- On a les doigts mouillés tout le long, plutôt désagréable.
- La paillasse finit généralement avec beaucoup d'eau (d'où l'utilisation de papier filtre sous les cristallisoirs – figure 14A).
- Aucune étape de vérification n'est faite. Il faut donc repasser manuellement pour chercher d'éventuels morts.

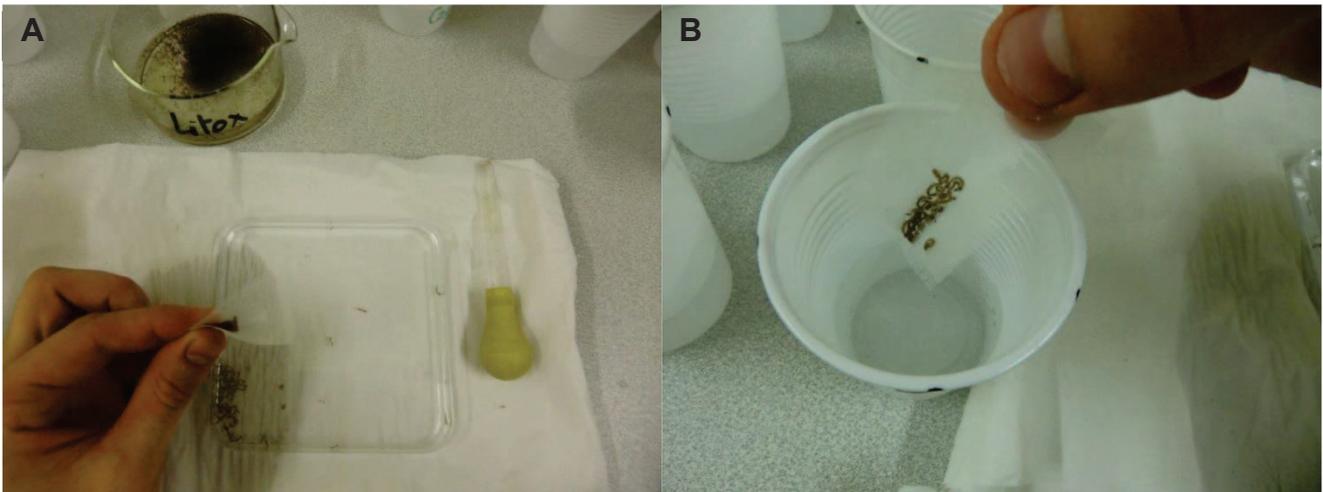


Figure 14. A. Comptage/filtrage des larves à tester ; B. Dépôt des lots de larves dans les gobelets.

### ○ Comment choisir les concentrations ?

Il faut toujours réaliser un « **pré-bioessai** » pour estimer les concentrations à utiliser. Lors de ce pré-test, on choisit généralement des concentrations avec un **facteur de 10 en 10**. Cela permet de couvrir une large gamme de doses et de localiser approximativement la  $LC_{50}$ .

Pour que le logiciel puisse appliquer son modèle Probit et avoir une courbe qui est représentative de la distribution des données (figure 15), il faut en général :

- 1 à 2 doses avec moins de 5% de mortalité.
- 1 à 2 doses avec plus de 95% de mortalité
- 4 à 6 doses dans la phase exponentielle de mortalité. Au moins, 2 avant et 2 après la  $LC_{50}$ .

Astuce : A t=24h et 48h, **ne compter que les larves vivantes** et non les larves mortes ! Elles font preuve de **cannibalisme** ce qui peut fortement biaiser les résultats.

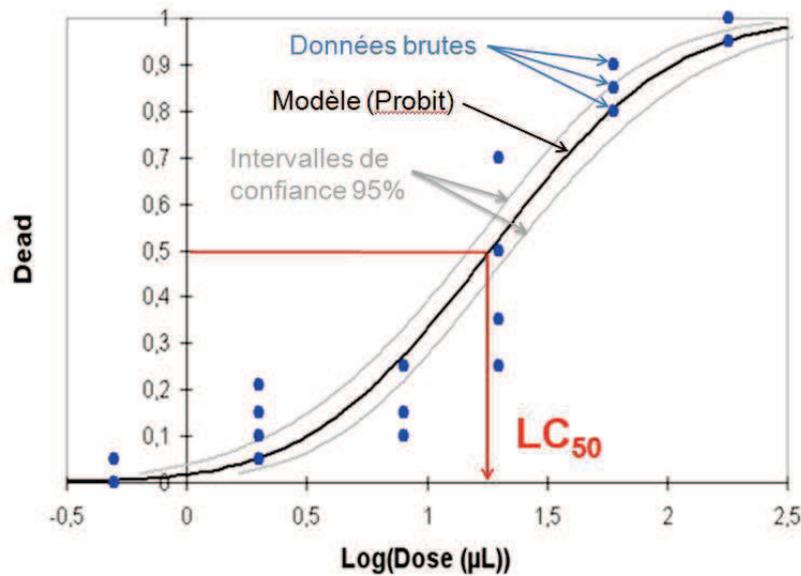


Figure 15. Courbe sigmoïdale caractéristique de données de bioessais obtenue avec le logiciel XLStat, module Dose.

○ **Calcul de la  $LC_{50}$  – Utilisation du logiciel XLStat, module Dose.**

Pour calculer la  $LC_{50}$ , nous appliquons un modèle de régression logistique Probit. Pour faciliter l'analyse par le logiciel, il est conseillé de remplir un tableau comme décrit dans la figure 16. Toujours sélectionner la ligne de titre pour que le logiciel la reconnaisse.

Parfois, en utilisant les données brutes, le logiciel peine à calculer la  $LC_{50}$  même si les doses ont été correctement choisies. Cela arrive souvent lorsqu'il y a un gros écart entre les doses les plus fortes et les plus faibles. Ne pas hésiter à utiliser les données converties en **logarithme** (onglet : « Options » ; cocher : « utiliser le logarithme »).

Souche : Bora      concentratio Ecart type  
 Toxine utilisée : Bti      100  
 Production : NA du 21.01.11  
 Temps d'exposition : 24H

conc (µg/ml)	Alive	Dead	Total	Dose (µL)
10,00	20	0	20	5
10,00	20	0	20	5
10,00	20	0	20	5
49,98	14	6	20	25
49,98	14	6	20	25
49,98	19	1	20	25
99,90	7	13	20	50
99,90	13	7	20	50
99,90	10	10	20	50
149,78	6	14	20	75
149,78	9	11	20	75
149,78	3	17	20	75
199,60	0	20	20	100
199,60	0	20	20	100
199,60	1	19	20	100
398,41	0	20	20	200
398,41	0	20	20	200
398,41	0	20	20	200
Tneg				

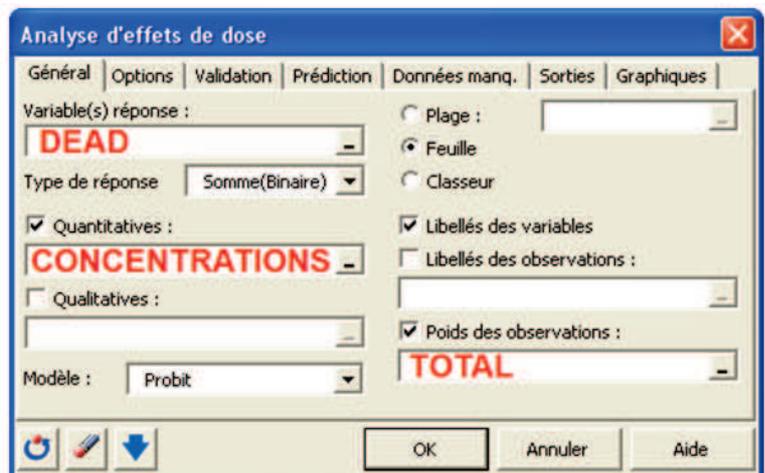


Figure 16. Tableau de relevé de mortalité

Figure 17. Interface du logiciel XLSTAT



## ANNEXE III

### 2D-DIGE Protocol

[See 2D-Electrophoresis Manual of GE Healthcare for further information]

This protocol is written for 2D-DIGE Protocol done with GE Healthcare Ettan systems with 18 cm strips at pH range from 4 to 7. For any changes, see the related information on manual.

Products: Always seal opened product with parafilm to protect them

<i>Product</i>	<i>Storage</i>	<i>Reference</i>	<i>Use</i>
Agarose (Low Melting)	at RT		
Bromophenol Blue	at RT		[p73]
CHAPS	at RT	17-1314-01(Ge Healthcare)	[p39, 56]
DMF			
DTT	at 4°C	17-1318-01(Ge Healthcare)	[p39, 73]
Glycerol	at RT		[p73]
Glycine	at RT		
Iodoacétamide	at 4°C	RPN6302(Ge Healthcare)	[p73]
IPG Buffer (pH4-7)	at 4°C	17-6000-86 (GE Healthcare)	[p40, 56]
L-Lysine	at RT	L-5626 (Sigma Aldrich)	Stop labeling of Dyes
SB3-10	at 4°C		
SDS	at RT	17-1313-01(Ge Healthcare)	[p73, 74-75]
Thiourea	at RT (in dark)	RPN6301(Ge Healthcare)	[p39, 56]
Tris	at RT	17-1321-01(Ge Healthcare)	[p73]
Urea	at RT	17-1319-01 (Ge Healthcare)	[p39, 56, 73]

Material:

<i>Material</i>	<i>Reference</i>
Ettan Daltsix	
Multiphor II	18-1018-06 (GE Healthcare)
IPG strip pH4-7, 18 cm	17-1233-01 (GE Healthcare)
DIGE Gel 12.5%, C=3%, 1mm	28-9374-51 (GE Healthcare)
Gels for automatic picking	
2D-clean up kit	80-6484-51 (Amersham Bioscience)
Cy3, Cy5, Cy2 for “minimal labeling”	25-8010-82, 83, 85 (GE Healthcare)
Strip Holder Cleaning Solution	
Sample application piece (for Ladder)	80-1129-46 (GE Healthcare)
IEF Electrode strips	18-1004-40 (GE Healthcare)
PlusOne DryStrip Cover Fluid	17-1335-01 (GE Healthcare)

## Buffers:

### **Basis Buffer:**

2M Thiourea  
7M Urea  
3% CHAPS  
1% SB3-10

Aliquot 1mL in 1.5mL tube  
Store at -20°C until use

### **Lysis Buffer / CyDye Buffer:**

2M Thiourea  
7M Urea  
3% CHAPS  
1% SB3-10  
20 mM Tris ; pH 8.5 (pH is very important)

*Basis Buffer*

Aliquot 200µL in 0.5mL tube  
Store at -20°C until use

### **2X Sample Buffer:**

[Solution B, p133]

2M Thiourea  
7M Urea  
3% CHAPS  
1% SB3-10  
130 mM DTT  
2% IPG buffer (pH4-7)

*Basis Buffer*

◆ Add before use (10mg/0.5mL)

◆ Add before use (10µL/0.5mL)

### **Rehydration Buffer:**

[Solution D, p134]

2M Thiourea  
7M Urea  
3% CHAPS  
1% SB3-10  
13 mM DTT  
1% IPG buffer (pH4-7)

*Basis Buffer*

◆ Add before use (1mg/0.5mL)

◆ Add before use (5µL/0.5mL)

### **Equilibration Buffer:**

[Solution E, p134]

6M Urea  
75 mM Tris ; pH 8.8  
2% SDS  
29.3% Glycerol (87% w/w)

Aliquot 25mL in 50mL tube  
Store at -20°C until use

### **Equilibration Buffer I (DTT):**

(1%) Bromophenol Blue (tip p100) ◆ Add before use  
+DTT (100mg/10mL) ◆ Add before use

### **Equilibration Buffer II (Iodo):**

+Iodoacetamide (250mg/10mL) ◆ Add before use

### **Laemmli SDS Buffer:**

[Solution M, p136]

25 mM Tris Base	30.3g	48,464g
192 mM Glycine	144.0g	230.4g
0.1% SDS (w/v)	10.0g	16.0g
MQ Water	to 10L → <b>1X</b>	to 4L → <b>4X</b>

### **Agarose Sealing Solution:**

[Solution N, p136]

Low melting Agarose (0.5g/100mL)  
1X Laemmli SDS Buffer  
(0.002%) Bromophenol Blue (tip)

Can be conserved at RT until use

Do not conserve too long to avoid "traces" in migration

When used, make it boil well to have full dissolution and maintain it at ~60°C

## Protocol:

### PREPARATION

- Prepare “CyDye Buffer”, “2X Sample Buffer”, “Rehydration Buffer” and “Equilibration buffer”.
- Wash all material with deionized water and then with MQ Water.
- Get 150 µg of BBMV from each strain  
*Be precise, BBMV cannot be frozen again!*

RESISTANT	SUSCEPTIBLE	BOTH
100 µg	100 µg	50 µg R + 50 µg S
Cy5	Cy3	Cy2
Cy3	Cy5	Cy2

### CLEAN-UP BBMV

*using 2D-clean up kit (Amersham Bioscience)*

- For samples volumes of 1 – 100µL (containing 1 – 100 µg protein), see [p39-40]  
For samples volumes of >100µL (containing >100 µg protein), see [p40-41]
- Follow manufacturer’s instructions from step 1 to 13.

### CYDYE LABELING [p117-124]

Preparation of samples:

- Resuspend the pellet in **20µL of “CyDye Buffer”**
- Sonicate in ice cold water bath for **15minutes**
- Check the pH by depositing 1µL of each solution on pH paper.  
*pH must be around 8.0*

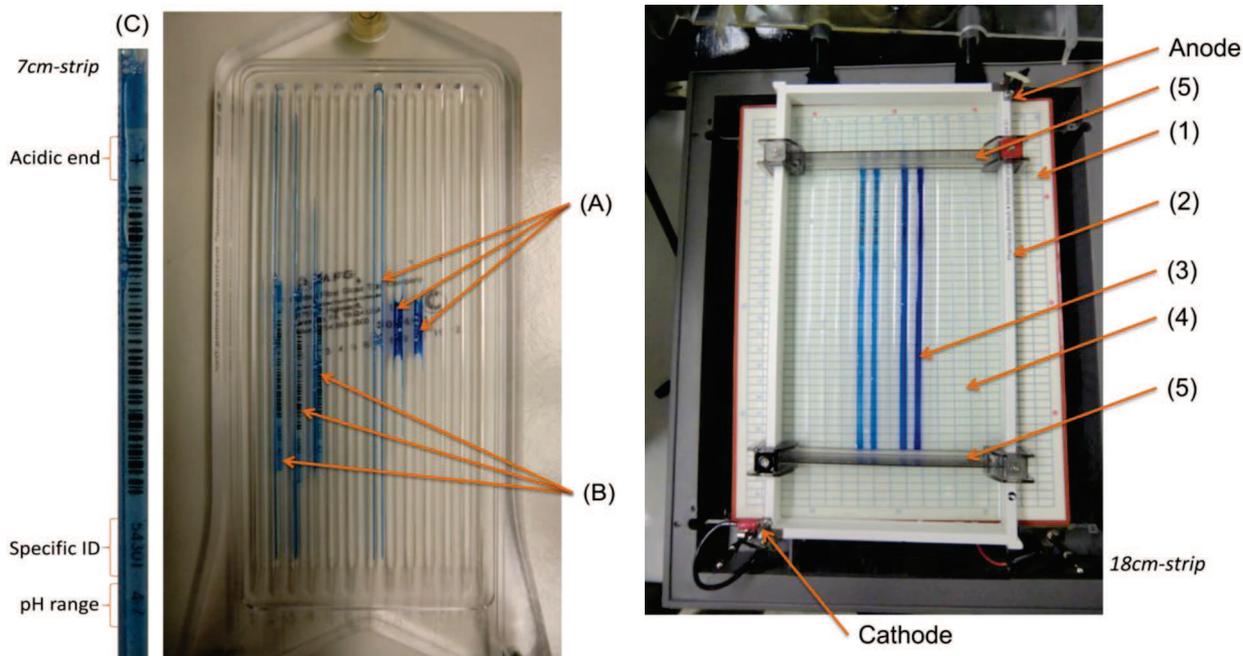
Preparation of dyes (try to work with the less light possible):

- Decrease the light to avoid destroying the dyes
- Vortex and spin down the dyes.
- Resuspend in **5µL of DMF** to reconstitute the dye  
*At this step, dye concentration must be 1nmol/µL*
- Mix together in a 1.5mL tube, **1µL of reconstituted dye** and **4µL of DMF**  
*At this step, dye concentration must be 200pmol/µL*
- Vortex and spin down
- Add **2µL of the mix to the 20µL solubilized proteins** (1µL / 50 µg of proteins)
- Incubate on ice **30min** in the dark
- Quench the reaction by adding **2µL of 10 mM Lysine** (18.265mg/10mL) to each cydye labeled tube
- Vortex and spin down
- Incubate on ice for **10min**
- Add an equal volume (**24µL**) of “**2X Sample Buffer**” and vortex
- Incubate on ice for **10min**
- **Pool the 3 samples together**

- Make up the volume with “**Rehydration Buffer** “ (for 18 cm-strips, **up to 340µL** [p59])

## **FIRST-DIMENSION ISOELECTRIC FOCUSING (IEF)** [p43-71]

- Wash all instruments with Strip Holder Cleaning Solution, rinse with deionized water
- Briefly centrifuge “Rehydration Buffer + sample”
- Add on a wall of Reswelling Tray **(A)**
- Discard plastic protection from the gel et put the immobilized pH gradient (IPG) strip on the Reswelling Tray **(B)** (gel face down, can read number **(C)**)  
*Avoid the bubbles between the gel and the solution*
- Protect from drying by adding 3mL of PlusOne DryStrip Cover Fluid
- Let for 16h-17h / cover with aluminium to protect from light
- Set the MultiTempIII Thermostatic Circulator cooling unit to 20°C, at least 30 min before use
- Add **10mL** PlusOne DryStrip Cover Fluid directly onto cooling plate **(1)**  
*At this step, we can use old oil recycled from previous IEF*
- Place DryStrip Reswelling Tray **(2)** on cooling plate **(1)** with anodic (red) electrode at the top. Remove any large air bubbles from underneath the plate to ensure good thermal contact
- Connect anode (red) and cathode (black) electrode strip tray leads to the unit
- Pipette **15mL** of cover fluid onto DryStrip tray **(2)**
- Cut two IEF electrode contact strips as large as the DryStrip tray **(2)**
- Moisten each strip with MQ water and let them dry on a filter paper  
*The strips should be damp; too much moisture within the strips will cause uneven focusing of the sample*
- Remove rehydrated IPG strips **(3)** from Reswelling Tray
- Discard excess oil from the strips with a paper without touching the gel
- Place individual rehydrated IPG strips **(3)** (acidic/”+” end up) into wells of the DryStrip aligner **(4)** (gel face up, can’t read number)  
*The strips should be aligned and placed next to each other in the center lanes of the tray*
- Position each DryStrip Kit electrode **(5)** at its respective end over each contact strip **(3)** (anode=red/top; cathode=black/bottom)  
*Make sure the red=right / black=left) ends correspond to the side of the tray providing electrical contact*
- Add **80-100mL** of cover fluid  
*The strips should be covered to ensure effective focusing and prevent dehydration of strips*
- Attach lid to the base, making sure the electrode leads are firmly in place.
- Turn on power supply and begin the preset focusing gradient program [p66-69]  
*After IEF, the strips can be conserved at -80°C until use or used immediately*



## SECOND DIMENSION SDS-PAGE [p73-91]

- Wash all the material with MQ water and lint-free wipes. Wash well the gels with deionized water to avoid any unpolymerized acrylamide
- Prepare at least 11mL of “Equilibration Buffer w/ DTT” and 11mL “EB w/ Iodoacetamide”
- Prepare at least 5L of “1X Laemmli SDS Buffer” and 1L of 2X.  
*Prepare 4X SDS Buffer to be conserved longer at RT.  
 1X is the buffer for the anode (bottom), 2X is for the cathode (upper).*
- Add 4L 1X buffer on the lower tank and turn power on to mix it.
- Set the MultiTemp III Thermostatic Circulator cooling unit to **22 °C**
- Get the strip out of the -80°C and let it 5min at RT.
- Add “**Equilibration Buffer with DTT**” in the tube and let **15min** under 1D agitation.  
*DTT will oxidize the protein by breaking disulfic bonds.  
 SDS will give to all the protein a global negative charge allowing them not to move. After this step, no need to hurry as proteins are stabilized on the strip.*
- Remove “EB-DTT” (use paper and tap on it to avoid every remaining drops)
- Add “**EB with Iodoacetamide**” in the tube and let **15min** under 1D agitation.  
*Iodoacetamide alkylates thiol groups on proteins, preventing their reoxidation during electrophoresis (no disulfic bonds can be done again).*

During this step, prepare the ladder:

- Add **2 x 2.5µL** of the **ladder** on the strip
- Seal it with “**Agarose Sealing solution**”, add **20µL on each face** of the strip and let it dry
- Remove “EB-IODO” (use paper and tap on it to avoid every remaining drops)
- Wash the strip with “1X Laemmli SDS Buffer” with 1mL-pipette  
*Wash with about 3mL and immerse it into the tank to well wash it*
- Install the strip in the gel using a small regular to avoid any bubbles between the strip and the gel

- Install the Ladder strips.
- Seal with the “Agarose Sealing Solution”
- Install the gel in the tank
- Launch the migration at **22°C** for about 5h (or overnight at 15°C, 1.5W/gel) [p82]  
**2.5 W/gel until the migration is all entering the gel (~1h)**  
**17 W/gel until the migration front is going to the bottom of the gel (~5h).**
- Cover the tank to avoid long exposure with light.

## SCAN THE GEL

- Turn ON the scanner at least 30min before the scan and start Typhoon software
- Clean scanner platen with MQ Water and with 70% ethanol, dry with Kimwipes
- Wash the gels plates with MQ Water and with 70% ethanol, dry with Kimwipes
- Put gel “gripper” in right and left part of the plate, metal parts will be on the bottom
- Carefully lower gel sandwich onto scanner platen, avoid water or buffer getting under glass sandwich, note orientation
- Launch the program described as follows

The screenshot shows the Typhoon Scanner Control software interface. The main window displays a grid for gel scanning, with columns numbered 1-22 and rows labeled R through A. The 'Setup' panel on the right contains various configuration options:

- User Name:** krishna
- Acquisition Mode:** Fluorescence
- Tray:** User Select (set to 1)
- Phosphor Mode:** Best Sensitivity (selected)
- Options:** Orientation (checked), Press Sample (checked)
- Pixel size:** 200 microns
- Focal Plane:** +3 nm
- Image Analysis:** None
- DIGE File Naming Format:** (checked)

Annotations provide additional context:

- Because Cy are fluorescent dyes [p117]
- « User Select » allows you to determine which coordinates to read
- Machine press plates to avoid bubbles
- Because gels are between glass plates
- Choose sensibility. 200µm is good for pre-scan, 100µm gives better resolution
- Export each dye in a .gel file and both in another file
- See manual [p117 ; 115-118]

A diagram shows a grid with 'Up' and 'Down' arrows, and 'Acidic' and 'Basic' labels, with a large 'R' indicating the orientation.

Scanning Information:

Chan	Filter	Laser	Sensitivity	FMT	Splitter
1	520 BP 40	Blue (488 nm)	Normal	600 V	
2	580 BP 30	Green (532 nm)	Normal	600 V	
3	670 BP 30	Red (633 nm)	Normal	600 V	

## STAIN THE GEL

- Silver staining → + best resolution  
- spots not pickable (need special treatment)
- Deep Purple → + less high resolution [Appendix IV, p141-144]  
- spots pickable
- Coomassie Brilliant Blue → + intermediate in resolution between silver and deep  
- spots pickable

## ANNEXE IV

### Protocoles de mesure des activités protéolytiques

#### I. ACTIVITE PROTEOLYTIQUE TOTALE

<i>Produit</i>	<i>Stockage</i>	<i>Masse molaire/Taille</i>	<i>Référence</i>
Azocaséine	4°C	23,6 kDa	A2765 (Sigma Aldrich)
Acide Trichloroacétique (TCA)	RT	163,4 g.mol <sup>-1</sup>	T6399 (Sigma Aldrich)
NaOH	RT	40 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide acétique	RT	60 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide phosphorique	RT	98 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide borique	RT	61,8 g.mol <sup>-1</sup>	

#### Préparation des solutions :

- Préparer le **tampon universel** constitué de 40 mM d'acide acétique, 40 mM d'acide phosphorique et 40 mM d'acide borique. Equilibrer au pH désiré avec du NaOH.  
*Préparer le tampon universel de préférence la veille, afin de pouvoir contrôler la stabilité du pH le lendemain et le rééquilibrer au besoin.*
- Préparer une solution d'**azocaséine à 2%** dans le tampon universel au pH souhaité.  
*L'azocaséine se dissout difficilement. Homogénéiser à l'aide d'un vortex pendant plusieurs minutes à puissance maximum. La solution peut être orange clair (pH acide) à rouge foncé (pH basique).*
- Préparer une solution de **TCA à 10%**.
- Préparer une solution de **NaOH 1M**.
- Diluer les extraits enzymatiques dans le tampon universel à la concentration finale de **0.67 µg/µL** (soit 20 µg de protéines totales dans 30µL).

#### Protocole :

- Ajouter **30µL de l'échantillon** dilué (contenant 20 µg de protéines totales) à **80µL d'azocaséine 2%**.
- Incuber à **60°C** pendant **1 heure**.
- Ajouter **300µL de TCA à 10%**.  
*Cela permet de stopper la réaction et de faire précipiter l'azocaséine non hydrolysée.*
- Incuber à **4°C** pendant **2 heures**.
- Centrifuger **16.000g** pendant **10 minutes** à 4°C.
- Déposer **100µL de surnageant** et **100µL de NaOH 1M** dans un puits d'une plaque de 96 puits.
- Lire l'absorbance à **440nm**.  
*Le NaOH va réagir avec les peptides présents dans le surnageant et émettre à une longueur d'onde de 440nm.*

## II. ACTIVITE PROTEOLYTIQUE SPECIFIQUE – substrats à p-nitroanilide

Produit	Spécificité	Stockage	Masse molaire/Taille	Référence
N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BApNA)	Trypsines	-20°C	434,88 g.mol <sup>-1</sup>	B4875 (Sigma Aldrich)
N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide (SAApNA)	Chymotrypsines	-20°C	624,64 g.mol <sup>-1</sup>	S7388 (Sigma Aldrich)
leucine p-nitroanilide	Leucine-aminopeptidases	-20°C	251,28 g.mol <sup>-1</sup>	L9125 (Sigma Aldrich)
DMSO		RT		
Acide acétique		RT	60 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide phosphorique		RT	98 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide borique		RT	61,8 g.mol <sup>-1</sup>	
NaOH		RT	40 g.mol <sup>-1</sup>	

### Préparation des solutions :

- Préparer le **tampon universel** constitué de 40 mM d'acide acétique, 40 mM d'acide phosphorique et 40 mM d'acide borique. Equilibrer au pH désiré avec du NaOH.  
*Préparer le tampon universel de préférence la veille, afin de pouvoir contrôler la stabilité du pH le lendemain et le rééquilibrer au besoin.*
- Préparer des solutions mères de substrats dans du DMSO à 50 mM. Puis, préparer les solutions de substrats à **10 mM** dans le tampon universel au pH souhaité.
- Diluer l'échantillon à tester dans le tampon universel à la concentration finale de **0.33 µg/µL** (soit 10 µg de protéines totales dans 30µL).

### Protocole :

- Déposer **150µL de tampon universel** au pH désiré dans un puits d'une plaque de 96 puits.
- Ajouter **30µL de l'échantillon** dilué (contenant 10 µg de protéines totales)
- Incuber à **30°C** pendant **5 minutes**.
- Ajouter **20µL de substrat** à 10 mM pour initier la réaction.
- Lire l'absorbance à **400nm pendant 10 minutes** avec un pas de 5 secondes.
- **Calculer la pente** de la partie linéaire de la courbe obtenue.
- **Calculer l'activité enzymatique** en divisant la quantité de produit formé (nmol de produit formé) par le temps (10 minutes) et par la quantité de protéines totale (10 µg) pour obtenir des valeurs en nanokatal (nkat, unité du SI).

### III. ACTIVITE PROTEOLYTIQUE SPECIFIQUE – Carboxypeptidases

Produit	Spécificité	Stockage	Masse molaire/Taille	Référence
N-(3-[2-furyl]acryloyl)-phenylalaline-phenylalaline (FAPP)	Carboxypeptidases A	-20°C	432,47 g.mol <sup>-1</sup>	F7133 (Sigma Aldrich)
N-(3-[2-furyl]acryloyl)-alanine-lysine (FAAK)	Carboxypeptidases B	-20°C	337,37 g.mol <sup>-1</sup>	F5882 (Sigma Aldrich)
Acide acétique		RT	60 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide phosphorique		RT	98 g.mol <sup>-1</sup>	
Acide borique		RT	61,8 g.mol <sup>-1</sup>	
NaOH		RT	40 g.mol <sup>-1</sup>	

#### Préparation des solutions :

- Préparer le **tampon universel** constitué de 40 mM d'acide acétique, 40 mM d'acide phosphorique et 40 mM d'acide borique. Equilibrer au pH désiré avec du NaOH.  
*Préparer le tampon universel de préférence la veille, afin de pouvoir contrôler la stabilité du pH le lendemain et le rééquilibrer au besoin.*
- Préparer des solutions mères de substrats dans du DMSO à 50 mM. Puis, préparer les solutions de substrats à **10 mM** dans le tampon universel au pH souhaité.

#### Protocole :

- Déposer **150µL de tampon universel** au pH désiré dans un puits d'une plaque de 96 puits.
- Ajouter **30µL de l'échantillon** dilué (contenant 10 µg de protéines totales)
- Incuber à **30°C** pendant **5 minutes**.
- Ajouter **20µL de substrat** à 10 mM pour initier la réaction.
- Lire l'absorbance à **330nm pendant 10 minutes** avec un pas de 5 secondes.
- **Calculer la pente** de la partie linéaire de la courbe obtenue.
- **Calculer l'activité enzymatique** en divisant la quantité de produit dégradé (nmol de produit dégradé) par le temps (10 minutes) et par la quantité de protéines totale (10 µg) pour obtenir des valeurs en nanokatal (nkat, unité du SI).





## Résumé

Le *Bti* est un bioinsecticide mondialement utilisé pour contrôler les populations de moustiques. La toxicité du *Bti* est due à un cristal constitué de plusieurs toxines, produit par la bactérie éponyme *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Qualifié de peu persistant dans l'environnement et sans résistance connue en populations naturelles, le *Bti* représente une alternative « propre » aux insecticides chimiques. Cependant, une litière végétale prélevée plusieurs mois après un traitement insecticide a montré une forte toxicité contre les larves de moustiques, due à la présence de *Bti*. La sélection d'une souche de moustique de laboratoire *Aedes aegypti* avec cette litière (souche LiTOX) a permis d'obtenir une résistance modérée au *Bti* (3,5 fois) mais plus élevée aux toxines testées séparément (jusqu'à 60 fois).

La présente thèse se décompose en trois axes. 1. Un test permettant le suivi du *Bti* dans l'environnement a été développé et breveté. Il a permis de mettre en évidence un recyclage du *Bti* dans les litières toxiques et une persistance différentielle des toxines. 2. La résistance au *Bti* de la souche LiTOX a été étudiée par des approches globales et fonctionnelles, permettant de mieux caractériser les mécanismes de résistance multigéniques impliqués. 3. La résistance a été recherchée en populations naturelles par des bioessais aux toxines du *Bti* testées séparément, outil plus sensible que les bioessais « classiques » au *Bti*, et a permis de mettre en évidence une tolérance accrue de certaines populations. Cette thèse apporte les connaissances et les outils nécessaires pour mieux caractériser les paramètres favorisant la prolifération du *Bti* en milieu naturel et les mécanismes de résistance potentiellement sélectionnés chez les moustiques.

Mots-clés : *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Aedes aegypti*, persistance, résistance, outils diagnostic.

## Abstract

*Bti* is a bioinsecticide used worldwide for mosquito control. *Bti* toxicity is due to a toxins-containing crystal, produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Bti* is known to have a low persistence in the environment and no firm resistance has been found yet in the field, therefore representing a “safe” alternative to chemical insecticides. Nevertheless, leaf litters collected several months after a treatment exhibited high toxicity against mosquito larvae, due to persistent *Bti*. The selection of a laboratory mosquito strain of *Aedes aegypti* with this litter (LiTOX strain) led to a moderate 3.5-fold resistance to *Bti* but to higher resistance (until 60-fold) to *Bti* toxins tested separately.

This thesis is structured in three main axes. 1. A test has been developed and patented to follow the fate of *Bti* in the environment. We showed that *Bti* has recycled in the collected toxic leaf litters and that the different *Bti* toxins persist differently. 2. The *Bti*-resistance of the LiTOX strain has been studied by global and functional approaches, leading to a better understanding of the multigenic mechanisms implicated in the resistance phenotype. 3. Cryptic *Bti*-resistance has been investigated performing bioassays with separate *Bti* Cry toxins, showing that some populations exhibit increased Cry tolerance. This thesis gives the knowledge and new tools necessary to better understand how *Bti* can persist and recycle in the environment and how mosquitoes can develop resistance.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Aedes aegypti*, persistence, resistance, diagnostic tools.