

Vers une meilleure compréhension des bases moléculaires de la résistance des moustiques au Bti (Bacillus thuringiensis subsp. israelensis)

Renaud Stalinski

► To cite this version:

Renaud Stalinski. Vers une meilleure compréhension des bases moléculaires de la résistance des moustiques au Bti (Bacillus thuringiensis subsp. israelensis). Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT: 2015GREAV054. tel-01685380

HAL Id: tel-01685380 https://theses.hal.science/tel-01685380

Submitted on 16 Jan 2018 $\,$

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.

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biodiversité, Écologie, Environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Renaud STALINSKI

Thèse dirigée par Mme Laurence DESPRES

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

Vers une meilleure compréhension des bases moléculaires de la résistance des moustiques au *Bti* (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*).

Thèse soutenue publiquement le **10 décembre 2015**, devant le jury composé de :

Mme Mireille KALLASSY

Professeure associée à l'Université Saint Joseph, Beyrouth – Rapporteur **M. Yannick MORET** Chargé de recherche CNRS, Dijon – Rapporteur **M. Fabrice VAVRE** Directeur de recherche CNRS, Lyon – Examinateur et <u>Président du jury</u> **Mme Christina NIELSEN-LEROUX** Directrice de recherche INRA, Jouy-en-Josas – Examinateur **Mme Eve DE ROSNY** Maître de conférences, Université Grenoble Alpes – Examinateur **M. Guillaume TETREAU** Post doctorant, Université de Perpignan – Membre invité **Mme Laurence DESPRES** Professeure, Université de Grenoble Alpes – Directrice de thèse



Remerciements

Je suis au Laboratoire d'Ecologie Alpine depuis plus de 6 ans (Master 1) et de nombreuses personnes m'ont accompagné et aidé durant toutes ces années. Il est grand temps de leur dire un GRAND MERCI.

Je souhaite remercier **Laurence DESPRES**, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance pour réaliser cette thèse. Tu as su être disponible pour me faire évoluer dans le monde de la recherche. Aussi, grâce à toi j'ai pu interagir avec de nombreuses personnes, ce qui m'a beaucoup apporté.

J'aimerais également remercier **Guillaume TETREAU**, pour les nombreuses interactions que l'on a eues depuis ce premier stage de master 1. Tu as su me faire confiance et me former à la recherche et ainsi me donner confiance pour réaliser ces travaux de thèses. Malgré la distance tu as toujours été là pour discuter de mes travaux de recherche et de plein d'autres sujets ce qui m'a beaucoup apporté tout au long de ma thèse. Tu as toutes les qualités requises pour obtenir un poste de chercheur, tant par ton dynamisme que par ta capacité à travailler en équipe, et j'espère que tu l'obtiendras prochainement. Un grand merci à toi !

Je souhaite aussi remercier Mireille KALLASSY et Yannick MORET pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse ainsi que les membres du jury Fabrice VAVRE, Christina NIELSEN-LEROUX et Eve DE ROSNY. Merci aussi à Eve DE ROSNY pour son aide sur la modélisation des ALPs. Aussi pas de thèse sans comité de thèse, merci à Christophe LAGNEAU, Roger FRUTOS, Louis LAMBRECHTS et Christophe BOETE.

Il est de mise de remercier la **région Rhône-Alpes** qui m'a permis de faire cette thèse en me finançant moi et les différentes expérimentations. Aussi, merci à **l'école doctorale Chimie et Science du Vivant** et ses membres (**Magalie POURTIER** et la directrice **Christelle BRETON**) pour leur travail de très grande qualité.

Je voudrais remercier **Stéphane REYNAUD** pour sa bonne humeur naturelle, pour ses conseils, son aide sur l'étude de l'immunité des insectes et de m'avoir permis d'enseigner à ses côtés. De même, merci à **Jean-Philippe DAVID** pour nos

nombreuses discussions qui m'ont beaucoup apporté et son aide pour l'analyse des données. Vous êtes de brillants chercheurs et j'espère que l'avenir vous réserve encore le meilleur.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé sur l'étude de l'immunité des insectes. En particulier **Christophe BOETE** pour nous avoir lancé sur ce projet très passionnant et **Patrick MERESSE** pour m'avoir donné accès au CUBE (centre Universitaire de Biologie Expérimentale). Merci aussi à **Christophe REGNAULT** pour avoir pris du temps pour phagocyter ces petites billes.

Merci à tous mes collègues de l'équipe P3E (Bello MOUHAMADOU, Sophie PERIGON, Lucile SAGE, Sophie SRODA et Sylvie VEYRENC), équipe avec laquelle j'ai le plus travailler tant sur les plateaux techniques que pour réaliser cette thèse. Je voudrais remercier plus particulièrement Sophie PRUD'HOMME, Claire BLONDEL, Alexia CHANDOR-PROUST, Thierry GAUDE, Idir G. AKHOUAYRI, Christophe REGNAULT et Frédéric FAUCON, pour les bons moments passés en votre compagnie et votre soutient tout au long de la thèse. Merci pour l'aide dans les manipulations (nombreux bioessais, extraction d'ADN et super manips de phagocytose), vous avez toujours été disponibles même dans les moments de galères. Je sais que je vous l'ai bien rendu en vous offrant des œuvres d'arts quand je m'essayais à la fusion des boîtes de Petri !!! J'espère continuer à vous voir encore longtemps et que vos/nos projets se réaliseront très vite. Ah oui Christophe je me souviens plus bien sais-tu comment fonctionne le rotor de l'ultra centri ?

Je voudrais remercier aussi le personnel technique et plus particulièrement **Christian MIQUEL** et **Delphine RIOUX** pour nous rendre le travail plus facile par votre rigueur couplé à une bonne humeur toujours présente. Aussi je souhaite remercier **Frédéric BOYER** et **Olivier LONTIN** qui savent se rendre disponible quand les problèmes informatiques persistent. Enfin je souhaite remercier celles qui facilitent fortement la vie de tous les employés du LECA les secrétaires. Un grand merci à **Florence SAGNIMORTE**, **Kim PLA**, **Marie COSTARIGOT et Nancy IACONO** pour répondre rapidement et aimablement à nos demandes parfois urgentes. Merci Nancy pour ce beau voyage à la réunion ;).

Durant cette thèse j'ai aussi pu faire des séjours dans différentes structures. Je souhaite remercier l'ARS (agence régionale de santé de la Réunion) pour m'avoir

permis de venir sur cette belle île. Un merci particulier à Jean-Sébastien DEHECQ, entomologiste passionné, qui m'a accueilli durant tout mon séjour et qui m'a fait découvrir tous les gîtes à moustique de l'île ! Aussi merci à l'institut Pasteur et Louis LAMBRECHTS pour cette collaboration très enrichissante. Un grand merci aussi pour votre accueil qui m'a permis de me sentir très rapidement à l'aise dans votre structure. Je remercie tout particulièrement Isabelle CONCLOIS avec qui j'ai travaillé durant ce séjour pour sa grande motivation, son professionnalisme et sa sympathie. Enfin, merci aux EIDs (entente interdépartementale pour la démoustication) et en particulier Delphine REY et Gilles BESNARD pour leur collaboration sur la région Rhône-Alpes.

Enfin j'ai eu la chance d'encadrer trois stagiaires qui par leur dynamisme et leur motivation m'ont permis de voir un autre aspect du travail de chercheur que j'affectionne particulièrement. Un grand merci aux « drôles de dames » (Marie COLLET, Delphine CORVET-BIRON et Lucie CONTAMIN), je vous souhaite plein de réussites.

Merci aussi à tous ceux qui m'ont fait confiance pour dispenser le Savoir ! Enseigner est une expérience très enrichissante, ainsi merci à **Rolland DOUZET**, **Muriel RAVETON**, **Stéphane REYNAUD et Françoise CORNILLON**.

Merci aussi à tous les doctorants post-doctorants et les collègues de bureau rencontrés durant ma thèse. Un remerciement particulier à **Thibaut CAPBLANCQ**, mon voisin de bureau, continue comme ça tu es au top ! Aussi merci à **TIC & TAC** pour m'avoir montré tout ce que l'on peut faire avec de la carboglace. Enfin merci aux potes de Master avec qui on a travaillé, rigolé et trinqué ! Un merci particulier à **Hicham CHAHTANE, Johan PANSU, Jérémy PUISSANT et Sébastien MONTAGNIER**.

Enfin je remercie tous les joueurs de foot du LECA avec qui chaque année les tournois étaient un grand plaisir autant sur le terrain que pour la petite bière d'après match. Un merci tout particulier à **Frédéric LAPORTE** qui a été et qui reste un coéquipier sur le terrain (avec notre équipe de choc dont le nom est équivoque : DIRBBLE AND GOAL) lors des différentes expérimentations effectuées durant cette thèse. Une dernière chose si tu déménages à nouveau n'oublie pas que je serai surement en train de faire du poney aquatique.

Enfin je finirais mes remerciements par ceux qui comptent le plus à mes yeux pour avoir une vie heureuse et épanouie. Ce sont bien entendu **mes amis**, **ma famille** (en particulier mes parents, mon frère et ses deux petits marmots qui rayonnent de vie) et ma **belle-famille** toujours très accueillante. Un grand merci à ma petite chérie **Mélissa** qui a su me soutenir, me réconforter, me faire rire et aussi corriger mes fautes d'orthographes.

.

Avant-propos

Cette thèse déposée à l'école doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV) de l'Université Grenoble Alpes résume le travail réalisé au Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) depuis Octobre 2012.

Les trois années de cette thèse ont été financées par un contrat d'allocataire de recherche dans le cadre d'une bourse régionale financée par la région Rhône-Alpes (CIBLE 2012). Les expérimentations ont été aussi financées par un financement CIBLE 2012 de la région Rhône-Alpes. Ce travail a donné lieu à la rédaction de dix articles (7 publiés, 1 soumis et 2 en préparation), à une communication orale dans le cadre de « Ma thèse en 180 secondes » (3^{ème} prix du jury), à une communication écrite lors d'un congrès international (prix du meilleur poster) et à l'encadrement de trois stagiaires (1^{ère} année de Master UJF « Biodiversité, Ecologie et Environnement » et 2^{ème} année de Matser de l'École Normale Supérieure). Durant cette thèse, j'ai également pu m'exercer au métier d'enseignant par le biais de vacations en première année de licence et de master.



Table des matières

LIST	TE DES ABREVIATIONS	1
LIST	TE DES FIGURES	3
LIST	TE DES TABLEAUX	7
INTE	RODUCTION GENERALE	8
I.	Le moustique	8
A.	Maladies transmises par les moustiques du genre Aedes	8
B.	La lutte contre le moustique	
II.	Bacillus thuringiensis (Bt)	11
A.	Le <i>Bt</i> une bactérie entomopathogène	
	1. Les facteurs de virulences	
	2. Les toxines Cry	
B.	. Bacillus thuringiensis subsp. israelensis	14
	1. Description	14
	2. Mode d'action des toxines Cry	
	3. Les toxines Cyt	21
	4. Synergie entre les toxines du <i>Bti</i>	
III.	La résistance au <i>Bt</i>	
A.	La sélection de la résistance	23
	1. Les allèles de résistances présents avant ou après traitement ?	
	2. La sélection de la résistance en laboratoire	
	3. Etudier la résistance	
В.	Les mécanismes de résistance au <i>Bt</i>	27
C.	2. La résistance au <i>Bti</i>	29
IV.	Contexte et objectif de la thèse	
СНА	APITRE 1 : CARACTERISATION DE LA RESISTANCE CONSTITUTION	E DES
SOL	UCHES	35
I.	Contexte de l'étude	
Ш.	Article 1	
III.	Article 2	
Α	Matériel et méthodes	43
, (,	1. Production des toxines	43
	2. Mesure de la résistance	
	3. Analyse RNA-seq	
	4. Modélisation des protéines	

Ę	5. Validation des SNPs	47
6	6. Extraction des enzymes de la lumière intestinale	48
, S	 Activation des protoxines Cry par les proteases intestinales	49
B	Résultate et discussion	50
D.		51
	2 Analyse spécifique	60
-	3 Coûts de la résistance	69
C	Conclusion	70
CHA	PITRE 2 · PART DE L'INDUCTION DANS LA RESISTANCE	72
	Contexte de l'étude	
		72 74
		/4
	RESISTANCE SUR LA COMPETENCE VECTORIELLE)E 90
I. I	Le système immunitaire des insectes	90
A.	Barrières contre l'infection	91
В.	Distinguer le soi du non soi	92
C.	La réponse humorale	92
D.	La réponse cellulaire	93
II. I	Implication de l'immunité dans la défense contre <i>Bt</i> et les toxines Cry	94
Α.	La réparation de la membrane épithéliale	94
В.	L'activation de la réponse immunitaire	95
III.	Implication de l'immunité dans la défense contre les arbovirus chez Aedes	97
Α.	Le rôle des voies de signalisation	97
IV.	Contexte de l'étude	98
V. /	Article 4	99
V	I. Etude 1: Rôle de la réponse immunitaire dans la résistance et répon	se
imm	unitaire après exposition au <i>Bti</i>	106
Α.	Matériel et méthodes	106
	1. Souches de moustiques	106
	1. Mortalité en fonction du temps	106
	2. Elevage et extraction de l'hémolymphe	106
3	3. Comptage des hémocytes	107
4	4. Activité des phénoloxidases	107
Ę	5. Activité des lysozymes	108
6	6. Mesure de la prolifération bactérienne	108
В.	Résultats	109

Table des matières

4		100
1.	viortaille en fonction du temps	
2.	Comptage des hemocytes	
3.	Activité les phenoloxidases	
4.	Activite lysozyme	
5.		
vii. vectori	Etude 2 : Impact de la resistance et de l'exposition au <i>Bti</i> sur la comp elle	etence
A. I	Matériels et méthodes	116
1.	Elevage des moustiques	116
2.	Infection des femelles	117
3.	Compétence vectorielle	118
4.	Persistance du <i>Bti</i> au stade adulte	118
B. F	Résultats	119
1.	Proportion de femelles infectées	119
2.	Proportion de femelles vectrices	120
3.	Persistance du <i>Bti</i> au stade adulte	120
C. [Discussion	120
DISCU	SSION GENERALE ET PERSPCETIVES	124
I. Ca	ractérisation de la résistance	124
A. I	a méthode RNA-seq	125
В. (Quels mécanismes mis en jeu ?	126
1.	Implication des récepteurs	126
2.	Une modification des gènes cuticulaires ?	131
3.	Une modification de l'immunité ?	132
4.	Autres modifications	133
5.	Conclusion	134
C. (Juelles perspectives 2	136
1.		
	Une approche protéomique	
2.	Une approche protéomique Les techniques de validation	
2. II. Co	Une approche protéomique Les techniques de validation mment détecter la résistance en population naturelle	130
2. II. Co A. L	Une approche protéomique Les techniques de validation mment détecter la résistance en population naturelle 'utilisation des bioessais	136 136 137 141 141
2. II. Co A. L 1.	Une approche protéomique. Les techniques de validation. mment détecter la résistance en population naturelle . L'utilisation des bioessais Détecter une résistance cryptique au <i>Bti</i> .	136 137 141 141 142
2. II. Co A. L 1. 2.	Une approche protéomique Les techniques de validation mment détecter la résistance en population naturelle L'utilisation des bioessais Détecter une résistance cryptique au <i>Bti</i> Un outil pertinent pour détecter la résistance ?	136 137 141 141 142 143
2. II. Co A. L 1. 2. B. U	Une approche protéomique. Les techniques de validation. mment détecter la résistance en population naturelle . L'utilisation des bioessais Détecter une résistance cryptique au <i>Bti</i> Un outil pertinent pour détecter la résistance ? Jne autre voie pour étudier et détecter la résistance au <i>Bti</i>	136 137 141 141 142 143 146
2. II. Co A. L 1. 2. B. U 1.	Une approche protéomique Les techniques de validation mment détecter la résistance en population naturelle L'utilisation des bioessais Détecter une résistance cryptique au <i>Bti</i> Un outil pertinent pour détecter la résistance ? Jne autre voie pour étudier et détecter la résistance au <i>Bti</i> Le choix de l'espèce	136 137 141 141 142 143 146 146

III. Conclusion générale	148
BIBLIOGRAPHIE	150
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	168
ANNEXE 1	168
ANNEXE 2	182
ANNEXE 3	196
ANNEXE 4	203
ANNEXE 5	214

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
-----	---------------------------

ALP	Alkaline	phos	phatase

- AMP Peptide anti-microbien
- APN Aminopeptidase N
- ARN Acide ribonucléique
- ARNm ARN messager

BBMV Brush border membrane vesicles (vésicules de membranes intestinales)

BSA	Bovine serum albumin
Bs	Bacillus sphaericus
Bti	Bacillus thuringiensis subsp. israelensis
Btj	Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan
Btk	Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki
CHIKV	Chikungunya
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DENV	Dengue
dsRNA	double strand RNA
DTT	Dithiothréitol
e.g	<i>exempli gratia</i> (= par exemple)
et al	<i>et alii</i> (= et les autres)
Fst	Indice de différenciation génétique
GPI	Glycosyl-phosphatidyl inositol
LB	Lysogeny broth
LC ₅₀	Lethal concentration for 50% of the population
L-Dopa	3,4-dihydroxy-L-phenylanaline

- MAPK Mitogen-activated protein kinase
- OMS Organisation mondiale de la santé
- PAGE Polyacrylamid gel electrophoresis
- PAMP Pathogen-associated molecular patterns
- PCR Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaine)
- PRP Primer recognition proteins
- QTL Quantitative trait loci
- RNAi ARN intérférant
- RNS Reactive nitrogene species
- ROS Reactive oxygene species
- RPKM Reads per kilobase per million
- RR₅₀ Ratios de résistance calculés à partir des LC₅₀
- RT-qPCR Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction
- SDS Sodium dodecylsulfate
- siRNA small interfering RNA
- SNP Single nucleotide polymorphisms
- TGiP Trans-generational immune priming

Liste des Figures

Figure 1 : Interactions entre le <i>Bt</i> et sa cible après ingestion et pénétration dans l'hémolymphe. La figure représente une coupe transversale d'une chenille et les différentes barrières et facteurs immunitaires rencontrés par le <i>Bt</i> . Du centre vers l'extérieur de la larve : la membrane péritrophique est représentée par une ligne (bleu), les cellules épithéliales sont représentées en orange, l'hémolymphe se trouve entre la barrière intestinale et la cuticule de l'insecte (ligne verte). Le cristal protéique est représenté par un losange (rose), les spores par un ovale (jaune), les formes végétatives de <i>Bt</i> par un rectangle (rouge) et les bactéries intestinales de l'insecte par un rond (bleu). Traduit et simplifié de (Raymond et al., 2010)
Figure 2 : Principales toxines Cry actives contre les différents ordres d'insectes (Coléoptères, Diptères, Hyménoptères, Hémiptères, Lépidoptères) et contre les Nématodes et la structure tridimensionnelle de la toxine Cry4Ba active contre les Diptères. Le domaine 1 (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine 2 (feuillets bêta) est coloré en vert et le domaine 3 (feuillets bêta) est coloré en violet. Adapté de (Boonserm et al., 2005; Palma et al., 2014)14
Figure 3 : <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> en phase de sporulation (gauche) et cristal de <i>Bti</i> (droite). Sp, spore ; IC, inclusion cristalline. Repris de (Tetreau, 2012) adapté de (Federici et al., 2003)
Figure 4 : Mode d'action simplifié des toxines Cry chez une larve d'insecte. Les chiffres romans indiquent les différentes étapes du mode d'action. Les toxines sont représentées en vert et les spores en bleu. Repris de (Tetreau, 2012) adapté de (Bravo et al., 2007)15
Figure 5 : Modèles de fixation des toxines Cry aux récepteurs de la membrane épithéliale d'insectes. (a) Le modèle « pore-forming » et (b) le modèle « cascade signal » adapté de : (Pardo-López et al., 2013; Zhang et al., 2006)20
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1Aa. Les feuillets bêta sont indiqués par « β » suivi du numéro du feuillet et les hélices alpha sont indiquées par « α » suivi du numéro de l'hélice. Repris de (Cohen et al., 2011).
Figure 7 : Schématisation de la différence de sélection exercée en laboratoire et sur le terrain. La courbe représente la proportion de la population tolérante à l'insecticide en fonction de la concentration d'insecticide. (a) À la première génération de traitement à l'insecticide, la concentration d'insecticide (Y) utilisée en laboratoire permet la survie des individus les plus tolérants (partie rouge de la courbe : 10 à 30%) sélectionnant plusieurs allèles permettant de mieux tolérer l'insecticide. (b) Pour tuer la même proportion d'individus à la génération suivante il faudra appliquer une concentration d'insecticide légèrement plus forte (Y'). La concentration d'insecticide (X) utilisée sur le terrain est faite pour tuer 100% de la population (a) seule une faible proportion des individus ayant des allèles rares de résistances peuvent survivre. Au traitement suivant (b) la concentration d'insecticide appliquée sur le terrain (X) n'aura pas changé. Une plus grande proportion de la population va survivre (partie rouge de la courbe) car le traitement précédant a sélectionné des allèles de résistances rares qui confèrent une forte résistance. Adapté de (Ffrench-Constant et al., 2004)25
Figure 8 : Mécanismes de résistance développés par les lépidoptères. Adapté de (Pardo-López et al., 2013)

Figure 9 : Mode d'action des toxines Cry ainsi que l'implication potentielle des principaux gènes et protéines/enzymes sur les différentes étapes de l'intoxication aux toxines Cry. Les flèches vers le haut représentent une augmentation d'expression/abondance et celles vers le bas une diminution. Les résultats obtenus en enzymologie sont représentés en orange, en protéomique en bleu et en transcriptomique en violet. Les astérisques (*) verts représentent une diminution de

Figure 10 : Résumé du plan de thèse ainsi que des différentes souches et de la génération utilisée pour réaliser les expérimentations. Les souches LR (4A, 4B et 11) proviennent dans mélange de la souche LiTOX (génération 13) et de la souche senisble (Bora), elles ont ensuite été sélectionnées à chaque toxine Cry. Ces souches (génération 18) ont ensuite été mélangées avec la souche senisble pour obtenir une souche composite (LR3) sélectionnée au Bti (LR3Bti) au mix des toxines Cry (LR3ToX) et non sectionnée pendant 5 générations (LR3NS). L'étude de la résistance des souches LR4A, 4B, 11 (génération 22) et de LR3Bti, 3ToX et 3NS (génération 5) est présentée dans le chapitre 1 (article 1). L'étude de la régulation de la transcription à l'aide du RNA-seg sur les souches LR4A, 4B et 11 (génération 29) et sur LR3Bti (génération 10) est présentée dans le chapitre 1 (article 2). L'étude de la régulation de la transcription de la souche sensible exposée au Bti a permis d'identifier des gènes impliqués dans la réponse aux toxines chez les différentes souches sélectionnées : LR4A, 4B et 11 (génération 33) et LR3Bti (génération 14), les résultats sont présentés dans le chapitre 2 (article 3). Les étudex de traits immunitaires et de la sensibilité aux virus de la DENV et du CHIKV chez souches résistantes (LR4A, génération 33 et LR3Bti, génération 14) en comparaison de la souche sensible sont

Figure 11 : Protocole illustré de l'approche transcriptomique réalisée sur les larves de moustiques ...45

- Figure 13 : (a) Évolution du ratio de résistance (RR₅₀) de la souche LR4A, LR4B et LR11, sélectionnée respectivement à Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa, à leur toxine de sélection au cours des générations (2 à 29). (b) Ratios de résistances (RR₅₀ et RR₉₀) de la souche LR4A, LR4B, LR11 et LR3Bti à la génération 29.
- Figure 14 : (a) Analyse de transcription différentielle des gènes : nombre et proportion des gènes significativement sur- et sous-transcrits et avec une différence d'expression de +/-2 (FC) dans chaque souche résistante et au total comparé à la souche sensible. (b) Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes sur- et sous-transcrits spécifiques et en commun dans chaque souche résistante et les termes GO associées à chaque case du diagramme (flèches noires)...53

Figure 16 : (a) Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes affectés par des mutations différentielles (plus de 40% de différence avec la souche sensible) spécifiques ou communes entre les souches résistantes. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de gènes affectés par au moins une mutation non synonyme. (b) Proportion de chaque catégorie parmi tous les gènes détectés (12587) et proportion de chaque catégorie parmi les gènes présentant un ou plusieurs SNPs différentiel dans chaque souche résistante comparée à la souche sensible Les gènes sont catégorisés en 10 catégories : Bti candidat (Bti) ; Cuticule (Cut) ;
Détoxication (Detox); Hormone et signal de neurotransmission (HSN) ; Immunité (Imu) ; Intra et extra cellulaire échange/ protéine chaperonne (IECE/PC) ; Autres enzymes (Autres) ; Structure (Stru) ; Facteur de transcription (FT) ; Fonction non connue (NC) ; Nouveau gène (NG). L'enrichissement de ces catégories est comparé à tous les transcrits détectés en utilisant un test exact de Fisher. Le pourcentage des catégories significativement (p-valeur < 0.05) enrichies est indiqué.

Figure 18 : Représentation de l'expression des gènes décrits comme potentiel récepteur aux toxines Cry. Un dièse (#) représente une protéine retrouvée dans les radeaux lipidiques (Bayyareddy et al., 2012). Une différence d'expression de +/-2 fois et un test de wilcoxon significatif (pvaleur<0.05) est représenté par une étoile (*). La valeur du ratio d'expression par rapport à Bora est indiquée quand le test est significatif mais la valeur n'est pas supérieure à 2 ou inférieur à -2.

- Figure 25 : Activité lysozyme dans l'hémolymphe dans les souches Bora (n=10), LR4A (n=10), et LR3Bti (n=10) exposées (LC₂₀) ou non au *Bti*. Les résultats représentent la moyenne de dix réplicas biologiques et les erreurs standards associées. La significativité des différences d'activité

Liste des figures

entre conditions a été testé par un test de wilcoxon. Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative111
Figure 26 : Prolifération bactérienne après une exposition au <i>Bti</i> (LC ₅₀), effectuée sur 15 larves de chaque souche ; (a) nombre de bactéries de la flore intestinale par larve et (b) nombre de <i>Bti</i> par larve. Les valeurs ont été testées par un test de Wilcoxon (p-valeur <0.05, * ; <0.01, **)112
Figure 27 : Résumé des étapes d'élevage, d'infection et d'évaluation de l'infection des moustiques 117
Figure 28 : Proportion de femelles infectées dans chaque souche avec ou sans exposition au <i>Bti</i> pour les deux virus. Les proportions sont comparées à l'aide d'un test exact de Fischer (*, p-valeur<0.05 ; **, p-valeur<0.01 et ***, p-valeur<0.001). Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%
Figure 29 : Proportion de femelles potentiellement vectrices dans chaque souche avec ou sans exposition au <i>Bti</i> pour les deux virus. Les proportions sont comparées à l'aide d'un test exact de Fischer (*, p-valeur<0.05 ; **, p-valeur<0.01 et ***, p-valeur<0.001). Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.
Figure 30 : (a) Représentation du mode d'action des toxines Cry, de la prolifération du <i>Bti</i> dans l'hémolymphe et des mécanismes de résistance potentiels. (b) Les récepteurs peuvent être sous- exprimés ou leur séquence protéique changée, induisant une plus faible fixation des toxines. (c) L'exposition des souches résistantes à leur toxine de sélection entraine une induction de deux groupes d'ALPs (flèches vertes et violettes) différentes par rapport à la souche sensible, pouvant contribuer à la résistance. (d) La modification de la membrane péritrophique peut altérer la fixation des toxines aux cellules épithéliales et/ou la rendre moins sensibles aux chitinases produites par le <i>Bti.</i> (e) Les souches résistantes peuvent avoir une modification des facteurs immunitaires permettant une meilleure tolérance à l'infection par le <i>Bti.</i>
Figure 31 : Principe de la technique de « ligand blot ». Les protéines migrent en fonction de leur taille et de leur point isoélectrique (étape 1). Les points bleus représentent les protéines ayant migré dans le gel. Les toxines Cry se fixent à leur récepteur (étape 2) puis sont détectées par des anticorps anti-Cry (étape 3) couplés à une protéine permettant leur détection. Les points noirs représentent les protéines révélées par la technique de ligand blot. Figure reprise de (Tetreau, 2012).
Figure 32 : Représentation des différentes étapes de la technique CRISPR-Cas9. Le sgRNA et la protéine Cas9 sont injectés dans l'embryon. La protéine Cas9 couplée au sgRNA vont reconnaitre et cliver le gène cible, à noter que pour obtenir un clivage il faut être proche d'un site PAM (contenant trois nucléotides : NGG). La rupture de l'ADN va activer la machinerie de réparation cellulaire qui soit réparé l'ADN par jonction non homologue ou par recombinaison homologue avec un fragment d'ADN exogène ou endogène. Figure adaptée de (Basu et al., 2015; Dong et al., 2015; Kistler et al., 2015).
Figure 33 : Mesure de la tolérance au <i>Bti</i> et aux toxines séparées du <i>Bti</i> . (a) Mortalité calculée à 24h pour les populations naturelles d' <i>A. albopictus</i> provenant de l'île de la réunion exposées à des doses de toxines Cry4Aa (59.9 ng.μl ⁻¹), Cry4Ba (36.6 ng.μl ⁻¹), Cry11Aa (54.2 ng.μl ⁻¹) et au <i>Bti</i> commercial Vectobac WG (0.7 μg.mL ⁻¹). Les différences ont été testées à l'aide d'un test de Wilcoxon (p-valeur<0.05, *). Les populations traitées sont indiquées en rouge et la population non traitée est indiquée en vert. (b) LC ₅₀ calculées à 24h pour les populations de <i>C. quinquefasciatus</i> exposées à des concentrations croissantes de Cry4Aa, Cry11Aa et au <i>Bti</i> commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculés à l'aide du logiciel probit sont non-chevauchants, *. Les populations traitées sont indiquée en vert

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales maladies transmises par A. aegypti. La nature du pathogène, sa prévalence et les traitements sont indiquées.			
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour la validation des SNPs 48			
Tableau 3 : Nombre et répartition des SNPs dans tous les gènes affectés par des SNPs différentiels et dans les gènes de la catégorie « Bti candidat » de chaque souche résistante. L'enrichissement est effectué par un test exact de Fisher, les valeurs significatives sont représentées par une étoile (*)			
 Tableau 4 : Mutations non synonymes dans des récepteurs potentiels aux toxines Cry, avec dans l'ordre la fonction du gène, son identifiant (vector base) et entre parenthèses le numéro de la mutation en correspondance avec le Tableau 6, sa présence dans les radeaux lipidiques (Li Ra ; * : présent, 0 : absent), le nombre d'outlier dans le gène (out), la base de référence et la base variante, la fréquence de chaque SNP (l'écart type) et le nombre de lectures à cette position (lec) pour chaque souche, la position dans la protéine, le changement d'acide aminé et si l'acide aminé est à la surface de la protéine (+). Les valeurs en rouge indiquent une différence de fréquence supérieure à 40% (entre chaque réplicats deux à deux) entre la souche sensible et la souche résistante. 			
Tableau 5 : Validation par séquençage génomique des SNPs détectés en RNA-seq dans certains récepteurs potentiels. Dans l'ordre, le nom du gène ; la taille du fragment et le nombre d'intron amplifié ; la souche testée (les parenthèses indiquent que les individus les plus tolérants à l'insecticide indiqué sont testés), N (nombre total d'haplotypes séquencés), la différence de fréquence du SNP (1 ou 2 en référence au tableau 4) entre Bora et les autres conditions ; Hap (le nombre d'haplotypes différents) ; π (la diversité nucléotidique) ; k (nombre moyen de nucléotides différents dans la souche) ; résultats des tests de neutralité (*<0.05 ; **<0.01 ; ***<0.001)67			
Tableau 6 : Synthèse des traits d'histoire de vies étudiés, les valeurs en rouge indiquent une valeur significativement différente de la souche sensible (p-valeur<0.05). Lorsque la différence est significative, l'augmentation ou la diminution relative du trait mesuré est indiquée entre parenthèses			
Tableau 7 : Gènes cuticulaires retrouvés sur-transcrits chez au moins une souche résistante,exprimés dans les intestins de larves et/ou contenant un domaine à péritrophine-A132			

I. Le moustique

Le plus vieux fossile de moustique (Culicidés) a été retrouvé en Birmanie et date du Crétacé moyen (environ 100 millions d'années) (Borkent et Grimaldi, 2004). Les moustiques appartiennent à l'ordre des diptères, caractérisés par une seule paire d'ailes qui assure la fonction de vol. Le moustique se développe dans deux milieux radicalement différents en fonction du stade de vie : aérien au stade adulte et aquatique aux stades larvaire et nymphal (Clements, 1992). Il existe plus de 3500 espèces réparties en 111 genres dont les trois genres principaux sont *Aedes, Culex* et *Anopheles*. Outre les nuisances occasionnées, le moustique est vecteur de nombreuses maladies responsables de millions de morts chaque année.

A. Maladies transmises par les moustiques du genre Aedes

Parmi les moustiques, *Aedes aegypti* et *A. albopictus* sont les vecteurs de la dengue (DENV), du chikungunya (CHIKV) et de la fièvre jaune (Tableau 1). L'augmentation du nombre et de l'amplitude des épidémies de DENV et de CHIKV couplée à l'expansion de la zone de répartition *d'Aedes albopictus* font de ces deux maladies, classées comme « maladies tropicales négligées », une source de préoccupation sanitaire mondiale (Morrison, 2014; Rougeron et al., 2015). Le virus entre dans le moustique femelle lors d'un repas sanguin sur une personne infectée par le virus. Après plusieurs jours d'infection le virus peut se multiplier et atteindre les glandes salivaires du moustique. Au cours d'un nouveau repas de sang la femelle injecte de la salive contenant des anticoagulants, des anesthésiques et le virus provoquant sa transmission chez des personnes saines (Ribeiro et Francischetti, 2003).

Tableau 1. Principales maladies transmises par *A. aegypti.* La nature du pathogène, sa prévalence et les traitements sont indiquées.

Maladie	Pathogène	Prévalence	Traitement	Référence
Fièvre jaune	Virus	200000 cas par an et 30000 décès	Vaccin efficace, pas de traitement spécifique	OMS
Dengue	Virus	50-100 millions de cas par an 25000 décès	première mise sur le marché du vaccin programmé en 2016, pas de traitement spécifique	OMS
Chikungunya	Virus	pas de données précises augmentation des cas depuis 2005	Vaccin en préparation, pas de traitement spécifique	OMS

Pour mieux comprendre les étapes de l'infection de cellules du moustique par un virus, prenons l'exemple de la DENV. La DENV est un arbovirus à ARN positif simple brin appartenant à la famille des Flaviviridae. Il existe quatre sérotypes distincts transmissibles à l'homme : DENV-1, 2, 3 et 4. L'étape d'infection commence par l'attachement du virus à un récepteur présent à la surface des cellules cibles intestinales. Plusieurs récepteurs ont été identifiés selon les sérotypes en utilisant des cellules modèles ou des tissus prélevés sur A. aegypti (Cruz-Oliveira et al., 2014). Après fixation du virus, le génome viral peut pénétrer directement dans la cellule par translocation (en empruntant des canaux ioniques pour pénétrer dans la cellule) médié par une protéine de la capside virale via la protéine C. Le virus peut aussi pénétrer entièrement (génome et capside) en détournant les mécanismes d'endocytose qui servent normalement à faire entrer des macromolécules indispensables au fonctionnement de la cellule. L'acidification du pH dans l'endosome va changer la conformation d'une protéine de la capside virale (protéine E). La protéine E peut ainsi perturber la membrane de l'endosome et provoquer la fusion de la membrane de l'endosome et du virus (hémifusion). Le génome viral est ensuite libéré via des pores ou par translocation (protéine C). Le génome ainsi libéré dans le cytoplasme va être traduit en utilisant la machinerie cellulaire. Le génome peut être ensuite répliqué, et les nouvelles copies d'ARN incorporées dans le virion. L'assemblage du virion se fait dans le réticulum endoplasmique puis il est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi puis sécrété pour infecter de nouvelles cellules (Mukhopadhyay et al., 2005). Le génome viral peut aussi être disséminé aux cellules voisines par translocation. Ce n'est qu'une fois que les virions infectent les cellules

présentes dans les glandes salivaires que le virus pourra être transmis à l'homme : ici encore des récepteurs spécifiques ont été identifiés mais leur fonction est encore inconnue (Cao-Lormeau, 2009). Pour se défendre face aux différentes maladies transmises par le moustique, l'homme a développé plusieurs stratégies, incluant l'utilisation d'insecticides.

B. La lutte contre le moustique

L'utilisation d'insecticides est actuellement le moyen le plus efficace pour lutter contre le moustique et endiguer les épidémies et les maladies qu'ils transmettent. L'utilisation du DDT (insecticide chimique) a commencé à partir de la seconde guerre mondiale, notamment pour lutter contre la DENV et la malaria. Néanmoins, les premiers cas de résistance au DDT chez le moustique ont été rapportés peu de temps après le début de son utilisation (Hemingway et Ranson, 2000). De nouveaux insecticides chimiques ont été développés pour contourner ces résistances. Les insecticides chimiques 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). Leur utilisation massive a entrainé une adaptation rapide des moustiques conduisant à de fortes résistances observées en population naturelle (Hemingway et Ranson, 2000). De plus, ces molécules persistent longtemps dans l'environnement de par leur nature chimique très stable et ont un impact sur l'ensemble de la chaine trophique.

La prise de conscience des enjeux environnementaux liés à l'utilisation d'insecticides a conduit au développement de nouveaux insecticides dits biologiques. L'utilisation des toxines produites par les bactéries *Bacillus sphaericus* (*Bs*) et *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) dans la lutte contre les moustiques a commencé dans les années 80, notamment en France et au Canada. Néanmoins l'utilisation de *Bs* a conduit à de forts niveaux de résistance en population naturelle et il est actuellement autorisé en démoustication uniquement en combinaison avec le *Bti* (Nielsen-Leroux et al., 2002; Regis et al., 2001). Aujourd'hui le *Bti* est le seul larvicide autorisé et commercialisé en France pour la lutte antimoustique et son utilisation des moustiques, la caractérisation du mode d'action du *Bti* et de son comportement dans

l'environnement est essentielle afin d'anticiper l'apparition de résistance en population naturelle.

II. Bacillus thuringiensis (Bt)

Bacillus thuringiensis est une bactérie sporulante Gram positive appartenant à la famille des Bacillaceae et au groupe *cereus*. Elle se distingue des autres bactéries du groupe par sa capacité à produire lors de la sporulation des inclusions cristallines toxiques pour les larves d'insectes. Elle fût découverte pour la première fois au Japon en 1901 dans des cadavres de chenilles de papillons *Bombyx mori* par Shigetane Ishiwata (Aizawa, 2001). C'est seulement en 1951 que la toxicité de la bactérie est attribuée à l'inclusion cristalline parasporale (Bulla et al., 1980). Le *Bt* contient 82 sous-espèces. Cette classification est basée sur les propriétés chimiques et la composition de l'antigène du flagelle H mais ne tient pas compte des profils de toxicité (Lecadet et al., 1999; Xu et Côté, 2008).

- A. Le *Bt* une bactérie entomopathogène
 - 1. Les facteurs de virulences

Bacillus thruringiensis est une bactérie ubiquitaire, les différentes sous-espèces de *Bt* sont couramment retrouvées dans une grande diversité d'environnements et d'hôtes (sol, eau, plantes, insectes morts, etc.) à travers le monde. Le *Bt* peut se développer sous une forme végétative dans des milieux riches en nutriments et en carbone en absence de son hôte, mais sa multiplication est moindre en comparaison de celle opérée dans des cadavres d'insectes (Argôlo-Filho et Loguercio, 2013). Cette bactérie est donc classée comme entomopathogène et développe un arsenal de mécanismes participant à sa virulence (Figure 1) (Raymond et al., 2010). Parmi ces facteurs de virulence, les toxines Cry et Cyt sont responsables de l'essentiel de la toxicité et sont donc largement utilisées pour lutter contre les insectes ravageurs ou vecteurs de maladies.



Figure 1: Interactions entre le *Bt* et sa cible après ingestion et pénétration dans l'hémolymphe. La figure représente une coupe transversale d'une chenille et les différentes barrières et facteurs immunitaires rencontrés par le *Bt*. Du centre vers l'extérieur de la larve : la membrane péritrophique est représentée par une ligne (bleu), les cellules épithéliales sont représentées en orange, l'hémolymphe se trouve entre la barrière intestinale et la cuticule de l'insecte (ligne verte). Le cristal protéique est représenté par un losange (rose), les spores par un ovale (jaune), les formes végétatives de *Bt* par un rectangle (rouge) et les bactéries intestinales de l'insecte par un rond (bleu). Traduit et simplifié de (Raymond et al., 2010).

2. Les toxines Cry

Les différentes sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* produisent une grande diversité de toxines Cry. À ce jour, on dénombre 770 protéines séquencées (Crickmore et al., 2014). La diversité de ces toxines est liée à une grande plasticité génétique du *Bt*. La plupart des gènes codant pour ces toxines sont localisés dans des plasmides conjugatifs qui contiennent des éléments d'insertion qui facilitent la mobilité des gènes Cry entre plasmides (Schnepf et al., 1998). Le transfert de ces plasmides par conjugaison entre différentes sous-espèces favorise la diversité génétique (Thomas et al., 2001).

Les toxines Cry furent classées en premier lieu en fonction de leur activité insecticide (Cryl toxique contre les coléoptères, Cryll contre les lépidoptères et diptères, etc.) (Höfte et Whiteley, 1989). Aujourd'hui, la nomenclature est basée sur l'identité des séquences protéiques entre toxines (Crickmore et al., 1998). Ainsi, trois rangs sont utilisés, le premier chiffre différencie les toxines avec moins de 45% d'identité (Cry1, Cry2...), la première lettre (majuscule) indique une identité comprise entre 45 et 78% (Cry4A, Cry4B...) et la seconde lettre (minuscule) indique une identité comprise entre 78 et 95% (Cry11Ba, Cry11Bb...). Bien que leur pourcentage d'identité ne reflète pas toujours la toxicité spécifique pour un ordre d'insecte, cette classification permet d'orienter le test de nouvelles toxines pour déterminer leur activité insecticide.

Les toxines Cry partagent une homologie de leur structure tridimensionnelle et sont composées de trois domaines principaux : un domaine à hélices alpha (domaine 1) et deux domaines à feuillets beta (domaine 2 et 3) (Bravo et al., 2011). Le domaine 1 participe à la formation d'un pore par l'insertion de certaines hélices alpha dans la membrane des cellules. Les domaines 2 et 3 sont responsables de la fixation au récepteur membranaire et de la spécificité des toxines Cry contre les différents ordres d'insectes (Palma et al., 2014) (Figure 2).



Figure 2: Principales toxines Cry actives contre les différents ordres d'insectes (Coléoptères, Diptères, Hyménoptères, Hémiptères, Lépidoptères) et contre les Nématodes et la structure tridimensionnelle de la toxine Cry4Ba active contre les Diptères. Le domaine 1 (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine 2 (feuillets bêta) est coloré en vert et le domaine 3 (feuillets bêta) est coloré en violet. Adapté de (Boonserm et al., 2005; Palma et al., 2014).

B. Bacillus thuringiensis subsp. israelensis

1. Description

Plusieurs souches de *Bt* (subsp. *israelensis, jegathesan, medellin* et *morrisoni*) ont montré une forte activité larvicide contre les moustiques. Parmi elles, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* est la plus toxique, en particulier contre *A. aegypti* (Ragni et al., 1996). Cette bactérie a été isolée pour la première fois en Israël en 1976 dans un étang présentant une forte mortalité de larves de moustiques (Goldberg et Margalit, 1977). Lors de la sporulation, le *Bti* produit une spore et un cristal qui contient quatre toxines principales (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa) codées par les gènes du même nom contenu dans le plasmide pBtoxis (Berry et al., 2002) (Figure 3). Des gènes codants pour Cry10Aa, Cyt2Ba et Cyt1Ca ont aussi été décrits mais ces toxines sont peu ou pas produites (Ben-Dov, 2014).



Figure 3 : *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* en phase de sporulation (gauche) et cristal de *Bti* (droite). Sp, spore ; IC, inclusion cristalline. Repris de (Tetreau, 2012) adapté de (Federici et al., 2003).

2. Mode d'action des toxines Cry

Le mode d'action des toxines Cry du *Bti* est encore mal connu. La compréhension du mode d'action des toxines Cry1, actives contre les lépidoptères a néanmoins fait l'objet de nombreuses études (Bravo et al., 2011). Comme les toxines Cry possèdent une structure tridimensionnelle similaire, il semble donc que les mécanismes d'action soient partagés entre ces toxines (de Maagd et al., 2001). Dans cette partie, nous allons donc faire un état des connaissances sur les toxines Cry du *Bti* en nous appuyant sur le mode d'action décrit chez les lépidoptères comprenant sept étapes (Figure 4).



Figure 4 : Mode d'action simplifié des toxines Cry chez une larve d'insecte. Les chiffres romans indiquent les différentes étapes du mode d'action. Les toxines sont représentées en vert et les spores en bleu. Repris de (Tetreau, 2012) adapté de (Bravo et al., 2007).

a) Etapes I : ingestion

Le *Bti* est épandu dans les gîtes larvaires sous forme de poudre, granules ou liquide. Le choix de la formulation dépend de l'environnement à traiter, de l'espèce à contrôler et de la persistance de toxicité visée par l'applicateur. Les formulations ne contenant pas de spores étant moins toxiques, les cristaux et spores sont généralement épandus conjointement dans l'environnement et ingérés par les larves de moustiques (Becker, 2002).

b) Etape II et III : solubilisation et activation

Après ingestion par la larve, le cristal protéique se solubilise dans l'intestin alcalin (allant de 7.6 dans les cæca gastriques jusqu'à 11 dans la partie antérieure de l'intestin moyen) des larves de moustiques par cassure des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes qui assurent sa stabilité (Gill et al., 1992; Okech et al., 2008).

Les protoxines alors solubilisées doivent être clivées par des protéases pour être actives. Les protéases impliquées dans l'activation des protoxines sont généralement des protéases à sérine plus spécifiquement des trypsines et chymotrypsines (Oppert, 1999). L'activation de Cry4Aa (135 kDa) et Cry4Ba (130 kDa) *in vitro* et *in vivo* génère deux fragments d'environ 45 et 20 kDa (Beltrão et Silva-Filha, 2007; Yamagiwa et al., 1999). En revanche, celle de Cry11Aa, plus petite (72 kDa), donne deux fragments de 30 et 38 kDa (Yamagiwa et al., 2004).

c) Etape IV fixation au(x) récepteur(s)

Les trois toxines Cry se fixent aux membranes à bordure en brosse des cellules de l'intestin moyen chez *Anopeles gambiae* et sur les microvillosités des cellules de l'intestin moyen chez d'*A. aegypti* (Beltrão et Silva-Filha, 2007; Ravoahangimalala et Charles, 1995). Plus précisément, les radeaux lipidiques, régions membranaires enrichies en protéines possédant une partie transmembranaire (ancre GPI : glycosyl-phophatidylinositol), ont un rôle central dans la toxicité de Cry1C sur des cellules de lépidoptères sensibles à Cry1C (Sf9) (Avisar et al., 2005). Chez *A. aegypti*, Cry4Ba a été montrée comme principalement associée aux radeaux lipidiques (Bayyareddy et al., 2012).

Pour déterminer quels récepteurs interagissent avec les toxines Cry, plusieurs techniques sont utilisées. La première approche consiste à extraire les protéines contenues dans les cellules en brosse de l'intestin, à les séparer sur gel d'acrylamide et à déterminer quelle(s) protéine(s) fixe(nt) la toxine Cry d'intérêt (Bayyareddy et al., 2009). Aussi, la modification génétique de bactéries exprimant une protéine spécifique permet de déterminer si la protéine candidate peut servir de récepteur à la toxine Cry (Chen et al., 2009a). Par ces méthodes, on obtient une liste de protéines capables de fixer la toxine. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier que ces protéines sont des récepteurs fonctionnels (capables d'induire de la toxicité *in vivo*). Deux modèles sont utilisés :

- Des cellules d'insectes insensibles à la toxine Cry d'intérêt modifiées génétiquement pour exprimer le récepteur à tester (Dechklar et al., 2011). Si les cellules modifiées deviennent sensibles à la toxine alors on considère la protéine comme un récepteur fonctionnel.

- Des larves d'insectes sensibles à la toxine Cry d'intérêt dans lesquelles on éteint l'expression de la protéine à tester par la méthode d'ARN interférant (principe détaillé pages 110-111, Chapitre 3), (Saengwiman et al., 2011). Si les larves sont plus tolérantes à la toxine, alors on considère que la protéine est un récepteur fonctionnel.

Une même toxine Cry peut se fixer à plusieurs récepteurs différents et plusieurs toxines peuvent partager le même récepteur (Ferré et van Rie, 2002). Les cadhérines, les phosphatases alcalines (ALP) et N-aminopeptidases (APN) sont les principaux récepteurs aux toxines Cry chez les lépidoptères (Bravo et al., 2011). Ces trois types de protéines sont ancrées dans la membrane par une ancre GPI (ALP, APN) ou un domaine transmembranaire (cadhérines).

(1) Les cadhérines

Les cadhérines, glycoprotéines présentes à la surface des cellules, ont un rôle dans la jonction cellulaire (Ivanov et al., 2001). Elles ont été identifiées comme récepteur et montrées comme impliquées dans la toxicité des toxines Cry chez *Manduca sexta, B. mori, Heliothis virescens, Helicoverpa armigera, Pectinophora gossypiella et Ostrinia nubilalis* (Flannagan et al., 2005; Morin et al., 2003; Nagamatsu et al., 1999; Vadlamudi et al., 1995; Xu et al., 2005). L'expression d'une cadhérine d'A. aegypti (AAEL018140) dans une bactérie (Escherichia coli) a permis de montrer que cette cadhérine fixe avec une grande affinité la toxine Cry11Aa (Chen et al., 2009a). Une lignée cellulaire (c6/36) de moustigues (A. albopictus) n'exprimant pas naturellement la cadhérine a également été transformée pour exprimer la cadhérine (Lee et al., 2015). Ces cellules ont montré une augmentation de leur sensibilité à Cry4Aa et Cry11Aa. Néanmoins les niveaux de toxicité étant modérés (37% de cellules mortes), d'autres récepteurs pourraient être nécessaires pour obtenir une toxicité maximale. De plus, après inhibition de l'expression de cette cadhérine chez des larves sensibles, une tolérance accrue a été observée seulement pour Cry11Aa. Ce résultat montre que cette cadhérine est un récepteur fonctionnel de Cry11Aa mais pas de Cry4Aa et Cry4Ba. En revanche, chez An. gambiae la toxine Cry4Ba a montré une forte affinité à une cadhérine (AgCad-1) (Hua et al., 2008) et la capacité d'induire de la cytotoxicité après fixation à une autre cadhérine (Bt-R3) (Ibrahim et al., 2013). L'inhibition d'une cadhérine chez An. gambiae conduit également à une tolérance accrue à la toxine Cry11Ba (Bt subp. jegathesan) (Zhang et al., 2015).

(2) Les N-aminopeptidases (APNs)

Les aminopeptidases sont des métalloprotéases, clivant la région N-terminale des protéines, qui ont un rôle important dans la digestion des aliments par la larve (Taylor, 1993). Chez les insectes, les APNs sont des protéines membranaires localisées dans les radeaux lipidiques et ont été décrites comme récepteurs aux toxines Cry1 chez les lépidoptères (Pigott et Ellar, 2007). Elles ont été indiquées comme récepteurs à la toxine Cry11Ba (*Btj*) chez *A. aegypti, An. quadrimaculatus* et *An. gambiae* (Abdullah et al., 2006; Likitvivatanavong et al., 2011a; Zhang et al., 2008). Chez *A. aegypti*, une APN a été décrite comme récepteur à Cry11Aa et trois autres ont montré qu'une fois inhibées, les larves présentaient une meilleure tolérance à Cry4Ba (Saengwiman et al., 2011; Chen et al., 2009b; Chen et al., 2013). Le rôle de deux APNs dans la toxicité a été confirmé sur des cellules de lépidoptères (Sf9) transformées pour exprimer des APNs, induisant leur sensibilité à Cry4Ba (Aroonkesorn et al., 2015).

(3) Les phosphatases alcalines

Les phosphatases alcalines, impliquées dans le clivage des liaisons phosphates, ont été décrites comme récepteurs aux toxines Cry1 chez les lépidoptères (Guo et al., 2015a; Jurat-Fuentes et al., 2011). Chez *A. aegypti* et *An. gambiae*, les ALPs ont été décrites comme récepteurs fonctionnels aux toxines Cry4Ba, Cry11Aa (*Bti*), et Cry11Ba (*Btj*) (Hua et al., 2009; Jiménez et al., 2012; Dechklar et al., 2011; Fernandez et al., 2006; Fernandez et al., 2009).

(4) Autres récepteurs

D'autres récepteurs potentiels ont été décrits comme fixant les toxines Cry4Ba, tels que des V-ATPases, l'actine ou des glycosidases (Bayyareddy et al., 2009). Une alpha-amylase a été décrite comme fixant Cry4Ba et Cry11Aa chez *An. albimanus* (Fernandez-Luna et al., 2010). Aussi, chez *An. gambiae* une alpha-amylase et une alpha glucosidase apparaissent comme récepteurs fonctionnels de Cry11Ba (Zhang et al., 2013). Le manque d'étude de la toxine Cry4Aa ne nous permet pas d'identifier de potentiels récepteurs.

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

Deux modèles ont été développés pour décrire la fixation des toxines Cry1 aux récepteurs membranaires des lépidoptères. Le premier modèle, dit « pore-forming », est élaboré à partir des travaux de Knowles et Ellar (1987). Il implique la fixation à au moins deux récepteurs consécutifs (ALP/APN et cadhérine). Dans sa dernière version (Figure 5-a), les toxines se fixent selon un modèle « ping-pong », d'abord à une ALP/APN puis à une cadhérine où les toxines s'oligomérisent, pour revenir sur une ALP/APN avant de s'insérer dans la membrane pour former un pore provoquant la mort cellulaire (Pardo-López et al., 2013). Le deuxième modèle, dit « cascade signal », propose que la fixation de la toxine à une cadhérine induise des mécanismes de mort cellulaire (Zhang et al., 2006) (Figure 5-b). Ces modèles sont néanmoins soumis à de vives critiques et leur réalité biologique est encore à déterminer (Vachon et al., 2012).



Figure 5 : Modèles de fixation des toxines Cry aux récepteurs de la membrane épithéliale d'insectes. (a) Le modèle « pore-forming » et (b) le modèle « cascade signal » adapté de : (Pardo-López et al., 2013; Zhang et al., 2006).

Concernant les toxines Cry du *Bti*, aucun modèle n'a été proposé à ce jour mais on sait que plusieurs récepteurs (ALPs, APN, et cadhérine) sont impliqués dans la mort cellulaire, ce qui va dans le sens du modèle « pore-forming ». Aussi, l'implication de l'activation de la voie de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) dans la défense cellulaire contre la toxine Cry11Aa chez *A. aegypti* a été démontrée (Cancino-Rodezno et al., 2010). Plusieurs voies de signalisation cellulaire sont activées en réponse à des toxines Cry mais leur contribution dans la défense ou la toxicité des toxines reste largement inconnue (Vachon et al., 2012).

d) Etapes V à VII de l'oligomérisation et l'infection

L'absence d'oligomérisation peut affecter la toxicité des toxines Cry (Jiménez-Juárez et al., 2007). Pour Cry11Aa, une mutation dans l'hélice alpha-3 impliquée dans l'oligomérisation affecte sa toxicité envers *A. aegypti* (Muñoz-Garay et al., 2009). La structure en trimère de Cry4Ba et Cry4Aa semble pouvoir se former en solution aqueuse, ce qui pourrait faciliter leur insertion dans la membrane (Boonserm et al., 2005; Likitvivatanavong et al., 2006; Taveecharoenkool et al., 2010)

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 membrane (Pardo-López et al., 2013). Cela permet aux spores de *Bti* de passer dans l'hémolymphe de l'insecte, milieu extrêmement riche dans lequel elles vont pouvoir germer et proliférer (Broderick et al., 2006).

3. Les toxines Cyt

Les toxines Cyt sont composées de feuillets bêta entourés d'hélices alpha et ne partagent pas d'homologie de séquence avec les toxines de la famille Cry (Cohen et al., 2011) (Figure 6). Bien que le mode d'action des toxines Cry et Cyt diffère, les toxines Cry et Cyt sont ingérées par la larve sous forme de cristal et doivent être activées par les protéases intestinales. La protoxine (environ 30 kDa) est trois fois moins toxique que la forme activée (22-25 kDa) (Yahyaee et al., 1995). La toxine Cyt1Aa se fixe chez An. gambiae sur les membranes à bordures en brosse des cellules intestinales et aux cæcea gastriques sans la participation de récepteurs spécifiques (Ravoahangimalala et Charles, 1995). La spécificité de la toxicité de Cyt1Aa pour les diptères pourrait provenir de sa forte capacité à se fixer aux acides gras insaturés qui composent les membranes des cellules épithéliales des diptères (Cantón et al., 2014; Gill et al., 1987). Néanmoins, il a été montré que toutes les étapes d'activation, fixation, et d'oligomérisation de Cyt1Aa pouvaient se faire chez M. sexta (lépidoptère) sans induire de toxicité (Cantón et al., 2014). Il est proposé que la plus faible fixation de Cyt1Aa, dû à une plus faible proportion des acides gras insaturés dans les cellules épithéliales de M. sexta, ne soit pas suffisante pour induire de la toxicité (Cantón et al., 2014).



Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1Aa. Les feuillets bêta sont indiqués par « β » suivi du numéro du feuillet et les hélices alpha sont indiquées par « α » suivi du numéro de l'hélice. Repris de (Cohen et al., 2011).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer la toxicité des toxines Cyt. Le premier est un modèle « pore-forming » dans lequel les toxines se fixent sur les acides gras

insaturés, s'oligomérisent et forment un pore entrainant le gonflement cellulaire et sa mort (Rodriguez-Almazan et al., 2010). Le deuxième modèle, dit modèle « détergent », propose que la toxine Cyt se fixe à la membrane sans s'y insérer ce qui provoque une déstructuration des lipides induisant l'éclatement de la cellule (Butko et al., 1997). Ces deux modèles peuvent coexister selon les doses et le temps d'exposition ; la perforation pourrait intervenir à faible concentration avec un court temps d'exposition alors que la déstructuration de la membrane nécessiterait une plus forte concentration et/ou un temps d'exposition plus long (Butko, 2003).

4. Synergie entre les toxines du Bti

Le pouvoir insecticide et la haute spécificité du *Bti* contre les moustiques sont attribués aux interactions complexes entre ses quatre toxines principales (Bravo et al., 2007). La toxine Cyt est faiblement toxique seule comparée aux toxines Cry mais son ajout augmente considérablement la toxicité des toxines Cry ; on parle alors de synergie (Wirth et al., 2003). Il a été montré que la fixation de la toxine Cyt1Aa facilitait la fixation des toxines Cry11Aa et Cry4Ba aux cellules épithéliales (Elleuch et al., 2015; Pérez et al., 2005). Comme la toxine Cyt1Aa se fixe de manière non spécifique à la membrane intestinale, elle pourrait agir comme un récepteur pour les autres toxines (Elleuch et al., 2015; Pérez et al., 2005). Il a aussi été montré qu'une mutation de la toxine Cyt1Aa, affectant son oligomérisation, son insertion dans la membrane et son activité insecticide, peut quand même favoriser l'oligomérisation de Cry11Aa (Perez et al., 2007). Ces différents résultats expliquent la forte capacité de Cyt1Aa à synergiser l'activité des toxines Cry du *Bti*.

III. La résistance au Bt

La résistance aux insecticides se définit comme la capacité des individus à survivre à des doses létales pour les individus sensibles de la même espèce. Pour mesurer la résistance, des bioessais standardisés sont réalisés selon les procédures de l'OMS. Des lots de 20 larves sont placés dans 50 mL d'eau et exposés à 6 doses d'insecticide tuant de 5% à 95% des insectes. Chaque dose est testée sur trois lots de 20 larves (triplicats). Les résultats nous permettent de calculer la LC₅₀ (dose létale pour 50% de la population). On peut alors calculer un rapport entre la LC₅₀ de la

population testée et celle de la population sensible et obtenir des ratios de résistance (RR).

- A. La sélection de la résistance
 - 1. Les allèles de résistances présents avant ou après traitement ?

Lorsqu'une nouvelle mutation apparaît dans une population, elle est soumise à la sélection naturelle. Elle peut être avantageuse et sélectionnée dans la population (sélection directionnelle), être délétère et contre-sélectionnée induisant son élimination de la population (sélection purificatrice) ou alors être neutre (aucun impact sur la fitness de l'individu, *i.e.* sur le nombre de descendants viables et fertiles qu'il produira à la génération suivante). Dans le cas d'une mutation neutre, elle peut être maintenue dans la population en faible proportion car elle n'apporte ni avantage ni désavantage pour l'individu. Elle va donc participer au polymorphisme génétique de la population.

L'apparition de nouvelles mutations est positivement corrélée à plusieurs facteurs : la taille de la population, la durée du cycle de vie de l'espèce et le taux de mutation de l'espèce. Les bactéries par exemple ayant un cycle de vie court, un taux de mutation fort et une grande taille de population développent rapidement de forts niveaux de résistances aux antibiotiques (Sánchez, 2015). Dans le cas de la résistance aux insecticides, deux modèles sont proposés pour expliquer leur apparition au niveau moléculaire (Ffrench-Constant, 2007).

Une nouvelle mutation peut apparaître après l'introduction de l'insecticide. Les individus sont initialement hétérozygotes sur le locus. Dans le cas d'une mutation dominante conférant une résistance à un insecticide, les individus mutants vont survivre en présence de l'insecticide et la mutation va s'implanter dans la population. Ces mutations sont souvent délétères en l'absence de pression insecticide car la fonction de la protéine mutée est généralement affectée, induisant une fitness réduite chez les individus résistants (Raymond et al., 2001). A l'inverse, si la mutation est récessive, seuls les individus homozygotes vont résister impliquant une plus faible probabilité d'implantation de la mutation.

Un polymorphisme déjà présent dans la population avant l'introduction de l'insecticide peut aussi participer à la résistance (Barrett et Schluter, 2008). Ces mutations neutres ou faiblement délétères sont maintenues en faible proportion dans la population grâce à un équilibre entre mutation, sélection et dérive génétique (Przeworski et al., 2005; Hermisson et Pennings, 2005). De telles mutations connues pour induire de la résistance à Cry1Ac et Cry3Aa, respectivement chez H. virescens et Chrysomela tremulae, ont été retrouvées en faible proportion dans des populations naturelles non traitées au Bt (Gould et al., 1997; Wenes et al., 2006). Néanmoins, chez C. tremulae, la mutation semble affecter la fitness des individus résistants car en l'absence de pression de sélection, sa fréquence diminue. En revanche, le traitement insecticide va favoriser la fixation de l'allèle résistant par sélection directionnelle. La vitesse de fixation de la résistance est proportionnelle à la fréquence initiale de la mutation et à la pression de sélection exercée par l'insecticide. Par exemple, chez Lucilia cuprina, l'évolution rapide de la résistance au malathion est probablement due à la forte fréquence initiale (19%) de l'allèle de résistance (Hartley et al., 2006).

2. La sélection de la résistance en laboratoire

Les doses d'insecticide épandues dans l'environnement sont choisies pour induire la mortalité de la totalité des individus dans la zone traitée. Au contraire, la sélection de la résistance en laboratoire, dont le but est de détecter les mécanismes impliqués dans la résistance tout en évitant l'effet de la dérive génétique lié à de faibles effectifs, est effectuée en induisant environ 70% de mortalité dans la population (Figure 7). Les populations naturelles traitées vont donc être soumises à une forte pression de sélection qui va favoriser l'implantation d'allèles rares permettant de forts niveaux de résistance (monogénique) (McKenzie et Batterham, 1998, 1994; Roush et McKenzie, 1987). De plus, contrairement aux populations de laboratoire, la taille des populations naturelles est virtuellement infinie, ce qui va maximiser les chances d'apparition de nouvelles mutations. Si la pression insecticide est constante et homogène, l'implantation de ces allèles va se faire rapidement. On retrouve donc chez les populations naturelles de moustigues résistants aux insecticides chimigues un nombre restreint d'allèles à effets majeurs (Hemingway et al., 2004). Au contraire, la pression de sélection étant plus faible en laboratoire, elle va favoriser la sélection de plusieurs allèles ayant des effets modérés sur la résistance mais cumulatifs
(polygénique). La sélection d'un allèle de résistance majeur va donc prendre plus de temps et sera accompagnée de plusieurs autres allèles permettant de mieux tolérer l'insecticide.



Figure 7: Schématisation de la différence de sélection exercée en laboratoire et sur le terrain. La courbe représente la proportion de la population tolérante à l'insecticide en fonction de la concentration d'insecticide. (a) À la première génération de traitement à l'insecticide, la concentration d'insecticide (Y) utilisée en laboratoire permet la survie des individus les plus tolérants (partie rouge de la courbe : 10 à 30%) sélectionnant plusieurs allèles permettant de mieux tolérer l'insecticide. (b) Pour tuer la même proportion d'individus à la génération suivante il faudra appliquer une concentration d'insecticide légèrement plus forte (Y'). La concentration d'insecticide (X) utilisée sur le terrain est faite pour tuer 100% de la population (a) seule une faible proportion des individus ayant des allèles rares de résistances peuvent survivre. Au traitement suivant (b) la concentration d'insecticide appliquée sur le terrain (X) n'aura pas changé. Une plus grande proportion de la population va survivre (partie rouge de la courbe) car le traitement précédant a sélectionné des allèles de résistances rares qui confèrent une forte résistance. Adapté de (Ffrench-Constant et al., 2004).

3. Etudier la résistance

L'identification de mécanismes de résistance passe généralement par la comparaison d'une population d'insectes résistants à une population d'insectes sensibles. La comparaison de ces populations peut se faire au niveau génomique, transcriptomique, protéomique et enzymologique.

Les scans génomiques permettent d'identifier des régions qui subissent l'effet de la sélection naturelle. Lorsqu'une région est soumise à la sélection naturelle, notamment une sélection directionnelle favorisant un allèle 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 qu'on appelle un balayage sélectif. L'utilisation de marqueurs génétiques (séquence polymorphe d'ADN facilement détectable) répartis sur l'ensemble du génome permet de repérer une signature de sélection. Si le marqueur génétique présente un polymorphisme plus faible dans la

Introduction générale

souche résistante par rapport aux autres marqueurs non soumis à la sélection naturelle (neutres) alors ce marqueur est dit « outlier ». L'approche QTL (Quantitative Trait Loci) est une autre méthode permettant d'étudier le degré d'association entre des marqueurs moléculaires (*e.g.* des SNPs : single nucleotide polymorphisms) répartis sur l'ensemble du génome et un trait phénotypique quantitatif associé (*e.g.* temps mis par la larve pour mourir à une dose d'insecticide) (Gahan et al., 2001). Cette approche permet de générer une cartographie physique de l'emplacement des marqueurs et de relier directement chaque génotype au phénotype de résistance.

L'étude du transcriptome permet d'identifier si un gène est sur-transcrit ou soustranscrit dans la souche résistante. On quantifie alors l'expression d'un gène en dénombrant le nombre de copies d'ARN messagers (ARNm) présents dans l'organisme au moment de l'extraction d'ARN. Les méthodes de transcriptomique comprennent généralement une étape de rétro-transcription de l'ARNm pour obtenir les brins d'ADN complémentaires plus stables. On peut ainsi étudier l'expression d'un gène en particulier par RT-qPCR (Reverse Transcription and real-time quantitative polymerase chain reaction) ou alors l'ensemble des transcrits de l'organisme grâce aux technologies de séquençage à haut débit. Par exemple, la technique de séquençage (RNA-seq) dite de « seconde génération » est particulièrement adaptée à l'étude de la résistance car elle donne accès à la quantification de l'expression de chaque gène transcrit et aussi à la séquence nucléotidique des exons du gène. On peut ainsi quantifier la sur- et soustranscription des gènes et la présence de mutations plus fréquentes dans la souche résistante.

Au contraire de la transcriptomique, l'étude du protéome permet de mettre en évidence des modifications post-traductionnelles subies par les protéines qui peuvent changer leur abondance. L'utilisation de gels en 2-dimensions permet après extraction des protéines de les faire migrer selon leur taille et leur point isoélectrique (pH pour lequel la charge de la protéine est nulle). Il est ainsi possible d'identifier les spots (protéines) différentiellement abondants entre les souches de les identifier à l'aide de la spectrophotométrie de masse.

Pour valider les données obtenues par ces différentes méthodes, on peut utiliser des techniques d'enzymologie. Par exemple, si ces techniques ont révélé une plus forte

abondance (ARNm, protéines) des protéases à sérines ou un outlier sur un gène codant pour une protéase à sérine chez la souche résistante, après extraction des protéines on mesurera l'activité de cette classe de protéines à l'aide d'un substrat spécifique.

B. Les mécanismes de résistance au *Bt*

Au moins 27 espèces différentes ont développé des mécanismes de résistance au *Bt* en laboratoire (Siegwart et al., 2015). Des mécanismes de résistances ont été décrits chez les lépidoptères, les coléoptères et les nématodes (Bravo et Soberón, 2008; Heckel et al., 2007). Les mécanismes de résistances identifiés chez les lépidoptères permettent une bonne synthèse de la diversité des mécanismes développés par les insectes (Figure 8).



Figure 8 : Mécanismes de résistance développés par les lépidoptères. Adapté de (Pardo-López et al., 2013)

La résistance peut être expliquée par une modification au niveau de l'étape d'activation des protoxines. La diminution de l'activité des protéases à sérine, responsables de l'activation des toxines, induit une diminution de l'activation de la toxine Cry1Ac en partie responsable de la résistance chez *Plodia interpunctella* (Oppert et al., 1997; Herrero et al., 2001). Plus récemment, l'implication d'une

trypsine dans la résistance d'une souche d'*He. armigera* a été validée par ARN interférant ; son inhibition entraine une réduction de la sensibilité des larves sensibles de plus de moitié (Liu et al., 2014). Il a été aussi montré que la sous-expression d'une sérine protéase impliquée dans l'activation de Cry1Ac chez *He. armigera* induisait un défaut de clivage des 28 acides aminés de la partie N-terminale de la toxine (Rajagopal et al., 2009). La précision du clivage des protoxines étant essentiel à leur toxicité (Bravo et al., 2002), il a été proposé que ce défaut de clivage soit responsable de la résistance modérée (72 fois) à cette toxine. Enfin, les enzymes digestives peuvent induire une résistance en dégradant les toxines après leur activation, tel qu'il a été démontré chez *H. virescens* (Forcada et al., 1996).

La résistance peut aussi être expliquée par la production accrue de protéines empêchant la toxine de se fixer. Ainsi la sur-expression d'estérases intestinales, capables de séquestrer la toxine, induirait une résistance chez *He. armigera* (Gunning et al., 2005). De même, une production accrue de protéines coagulantes (hexamerines), capables de s'agréger autour de pathogènes et de toxines, a été décrit chez des larves de *He. armigera* résistantes à Cry1Ac (Ma et al., 2005).

La modification des récepteurs membranaires est le mécanisme le plus étudié car il permet d'atteindre des niveaux de résistance très élevés (Bravo et Soberón, 2008). Des altérations de 4 classes de récepteurs majeurs (cadhérines, ALPs, APNs et ABC transporteurs) ont été décrites chez de nombreuses espèces (Figure 8). Ainsi, des mutations non synonymes dans des cadhérines (Fabrick et al., 2014), APNs (Zhang et al., 2009) et ABC transporteurs (Xiao et al., 2014) ont été décrites comme affectant la fixation des toxines Cry chez plusieurs espèces. Aussi, la diminution de l'expression de cadhérines (Jin et al., 2014), d'APNs (Herrero et al., 2005), d'ALPs (Jurat-Fuentes et Adang, 2006) et d'ABC transporteurs (Guo et al., 2015b) a été décrite comme impliquée dans la résistance aux toxines Cry.

On remarque néanmoins qu'une espèce peut présenter plusieurs mécanismes de résistance pour résister à une toxine Cry et qu'un seul mécanisme ne suffit généralement pas pour expliquer la totalité de la résistance. Par exemple la souche YHD2 d'*H. virescens* (résistante 10000 fois à Cry1Ac) présente une diminution de son activité protéolytique (Karumbaiah et al., 2007), une diminution de l'expression de l'activité des phosphatases alcalines (Jurat-Fuentes et Adang, 2004) et une

mutation dans une cadhérine (expliquant 40 à 80% de la résistance) (Gahan et al., 2001).

C. La résistance au *Bti*

Un seul cas de résistance au *Bti* a été observé dans une population naturelle de *Culex pipiens*. La résistance était de plus de 30 fois en comparaison avec la souche (S-Lab) de laboratoire et de 6 fois en comparaison avec une autre souche de terrain (Paul et al., 2005). Néanmoins, aucun autre cas de résistance en population naturelle n'a été détecté à ce jour. De plus, la sélection au *Bti,* pendant 20 à 30 générations de souches *d'A. aegypti, C. pipiens* et *C. quinquefasciatus* en laboratoire n'a permis d'obtenir que des faibles niveaux de résistances (2-6 fois) (Georghiou et Wirth, 1997; Goldman et al., 1986; Mittal et al., 2005; Paris et al., 2011b; Saleh et al., 2003; Wirth et al., 1998).

La sélection de *C. quinquefasciatus* à Cry11Aa pendant 28 générations a permis d'obtenir une résistance de plus de 1000 fois à Cry11Aa et une résistance croisée avec Cry11Ba (environ 10 fois) (Wirth et al., 1998). Néanmoins, la sélection avec Cyt1Aa et Cry11Aa ne permet d'obtenir que des niveaux de résistance faibles (environ 5 fois) à Cry11Aa et à la combinaison des deux toxines, soulignant ainsi l'effet de Cyt dans le retardement du développement de la résistance aux toxines Cry du *Bti* (Wirth et al., 2005). Les mécanismes de résistance des différentes souches sélectionnées de *C. quinquefasciatus* n'ont jamais été décrits, ne permettant pas d'identifier des candidats potentiels chez *A. aegypti.* En revanche, une souche *d'A. aegypti* (SSC11) a été sélectionnée à Cry11Aa et une résistance croisée à Cry4Aa et Cry4Ba (66 et 13 fois, respectivement) (Lee et al., 2014). Son transcriptome a été étudié, à l'aide de RNA-seq révélant la sous-trasncription de 2 ALPs, 2 APNs et 2 ABC transporteurs.

Au laboratoire, la souche d'*A. aegypti* LiTOX a été sélectionnée pendant 30 générations avec une litière végétale composée de feuilles en décomposition présentant une forte toxicité contre les larves de moustiques (David et al., 2000). La toxicité de cette litière végétale est attribuée à la rémanence du *Bti* dans un gîte à moustiques plusieurs mois après un traitement au *Bti* (Tilquin et al., 2008). La souche LiTOX présentait entre la génération 18 et 30 une augmentation de la résistance à

Cry4Aa (de 30 à 68 fois) et au *Bti* (de 2 à 3.5 fois) quand la résistance aux toxines Cry4Ba et Cry11Aa n'évoluait pas (environ 10 fois) (Tetreau et al., 2012b; Paris et al., 2011b). Cette souche a fait l'objet de plusieurs études en utilisant des approches de génomique, transcriptomique, protéomique et enzymologique (Figure 9).

Une approche par « scan génomique » (DarT : Diversity Array Technology) a été utilisée. Elle a permis d'identifier deux « outliers », l'un proche d'un gène codant pour une métalloprotéase et l'autre proche d'un gène codant pour une cadhérine (Bonin et al., 2009).

Des approches de transcriptomique ont aussi été utilisées, d'abord sur larves entières, telles que la méthode de DGETP (Digital Gene expression Tag profiling), (Paris et al., 2012) et de RNA-seq (Després et al., 2014), puis sur les intestins de larves avec des puces à ADN (microarrays) (Tetreau et al., 2012b). Lors de ma thèse, j'ai analysé des données provenant de l'approche RNA-seq (Després et al., 2014), (Annexe 1). Ces différentes techniques nous ont permis d'identifier des mutations et/ou des altérations de l'expression de plusieurs classes de gènes potentiellement impliquées dans la fixation des toxines Cry du *Bti* (cadhérine, APNs, ALPs, alpha amylases et glycosides hydrolases). On a aussi observé une sous-expression des gènes impliqués dans la détoxication et dans l'immunité indiquant une possible réallocation d'énergie entre ces gènes et les gènes impliqués dans la résistance au *Bti*. Enfin, nous avons observé des modifications des gènes impliqués dans la digestion avec une diminution des métalloprotéases et une variation de l'expression des sérines protéases.

Une approche de protéomique a également été utilisée, identifiant la différence d'abondance de certains récepteurs potentiels (APNs, ALPs et V-ATPases) aux toxines Cry du *Bti* (Tetreau et al., 2012b). La sous-expression des V-ATPases pourrait participer à l'acidification du pH intestinal (Okech et al., 2008; Onken et Moffett, 2009). Or, comme le pH affecte la solubilisation du cristal (Lacey, 2007), la conformation des toxines (Venugopal et al., 1992), l'activité des enzymes digestives (Karumbaiah et al., 2007) et la formation de pores dans la membrane intestinale (Fortier et al., 2005), la sous-expression de ces protéines membranaires pourrait aussi participer à la résistance.

Enfin lors de mon master 2 (encadré par Guillaume Tetreau et Laurence Després), j'ai utilisé une approche d'enzymologie pour identifier le rôle des protéases dans la résistance en caractérisant l'activité protéolytique des enzymes intestinales de la souche LiTOX et la cinétique d'activation des toxines Cry par ces enzymes. Ce travail a mis en évidence une activité protéolytique des protéases à sérine plus forte chez la souche résistante et leur potentielle implication dans la dégradation de la forme activée de la toxine Cry4Aa. Nous avons aussi confirmé une baisse de l'activité des métalloprotéases en corrélation avec une diminution de l'expression de plusieurs gènes codants pour des métalloprotéases en transcriptomique (microarrays). Ce travail de master a été valorisé par deux articles publiés (Tetreau et al., 2012b), dont un lors de ma première année de thèse (Tetreau et al., 2013b), (Annexe 2).

Tous les résultats obtenus à partir de ces approches sur la souche LiTOX pointent des différences avec la souche sensible et des mécanismes potentiellement impliqués dans différentes étapes du mode d'action du *Bti*, suggérant que la résistance est multigénique (Figure 9).



Figure 9 : Mode d'action des toxines Cry ainsi que l'implication potentielle des principaux gènes et protéines/enzymes sur les différentes étapes de l'intoxication aux toxines Cry. Les flèches vers le haut représentent une augmentation d'expression/abondance et celles vers le bas une diminution. Les résultats obtenus en enzymologie sont représentés en orange, en protéomique en bleu et en transcriptomique en violet. Les astérisques (*) verts représentent une diminution de la diversité génétique (résultats obtenus en génomique) et les dièse (#) violets représentent des mutations non synonymes (résultats obtenus en RNA-seq).

IV. Contexte et objectif de la thèse

Nous avons démontré que la toxicité du Bti (formulé ou non) était fortement réduite après seulement 3 heures de contact avec de la matière organique présente dans les litières végétales échantillonnées dans les gîtes à moustiques (Tetreau et al., 2012c) (Annexe 3). Cette baisse d'efficacité du bioinsecticide est attribuée à une forte réduction de la biodisponibilité de la toxine Cyt. Aussi, il a été démontré qu'après contact avec de la litière, les toxines du Bti présentaient des profils de persistance très différents (Tetreau et al., 2012a). Ainsi, les toxines Cry11Aa et Cyt1Aa ont un temps de demi-vie allant de 24 à 86 heures guand les toxines Cry4Aa et Cry4Ba ont un temps de demi-vie allant de 140 heures à plus de 22 jours. La litière toxique, utilisée pour sélectionner la souche LiTOX confirme cet effet en milieu naturel, les proportions de Cry4Aa+Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa passent respectivement de 2%, 12% et 86% dans le Bti à 60%, 25% et 15% dans la litière toxique. L'altération de la biodisponibilité de Cyt en contact avec de la matière organique ainsi que son changement de proportion dans les litières pourrait faciliter l'apparition de résistance aux toxines Cry sur le terrain. En effet, la souche LiTOX est la preuve que le Bti peut, sous une forme persistante environnementale, entrainer une résistance jusqu'à 70 fois aux toxines séparées.

Nous avons vu que la résistance de la souche LiTOX est multigénique, ce qui peut s'expliquer par la variété des toxines présentes dans le *Bti* et par la complexité de leur mécanisme d'action. Il est donc difficile d'établir une liste courte des gènes candidats responsables de la résistance de la souche LiTOX. Comme la résistance de la souche LiTOX au *Bti* est faible (3 fois) mais qu'elle peut aller jusqu'à 70 fois à Cry4Aa, il est nécessaire d'étudier la résistance aux toxines Cry du *Bti* séparément pour pouvoir détecter une résistance naissante dans les populations naturelles. La sélection de trois souches à chaque toxine Cry du *Bti* (Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa) a été initiée dans le cadre de la thèse de Guillaume Tetreau.

Mon travail de thèse s'articule autour de trois axes structurés en trois chapitres (Figure 10).

Axe 1 : Caractérisation de la résistance constitutive des souches. Les bases moléculaires de la résistance à chaque toxine Cry n'étant pas connues, il est

nécessaire de les caractériser chez nos différentes souches. La technique de RNAseq a été utilisée pour analyser le transcriptome de chaque souche. De plus, les résistances croisées entre les toxines Cry du *Bti* ont été recherchées. Enfin, le *Bti* étant constitué aussi d'une toxine Cyt ayant un fort effet synergique, il est nécessaire de mieux comprendre son effet sur les mécanismes sélectionnés pour résister aux toxines Cry. Pour ce faire, une sélection au *Bti* a été initiée pendant ma thèse permettant de comparer les mécanismes de résistances sélectionnés au *Bti* avec ceux sélectionnées par chaque toxine.

Axe 2 : Part de l'induction dans la résistance. L'induction de mécanismes de résistance pour limiter les coûts associés à une expression constitutive est un mécanisme connu (Després et al., 2007). Néanmoins, ils n'ont jamais été décrits dans la résistance à des toxines Cry chez les insectes. Pour identifier les gènes induits en réponse au *Bti*, nous avons exposé la souche sensible (Bora) au *Bti* puis nous avons analysé l'impact de cette exposition sur l'expression des gènes à l'aide du RNA-seq. Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence l'implication de l'induction de certains gènes dans la résistance des différentes souches.

Axe 3 : Caractérisation de l'immunité des souches avec ou sans exposition au *Bti*. L'implication de la réponse immunitaire dans la résistance / tolérance aux toxines Cry est aussi soupçonnée (Grizanova et al., 2014; Hwang et Kim, 2011). La caractérisation de différentes réponses immunitaires larvaires chez les souches résistantes et la souche sensible exposées ou non au *Bti* a été effectuée. Nous avons également caractérisé l'effet de la résistance et de l'exposition au *Bti* sur l'immunité des adultes. Enfin, nous avons recherché si la résistance et/ou l'exposition au *Bti* au stade larvaire induisait un changement de potentiel de transmission de deux maladies majeures transmises par *A. aegypti* (DENV et CHIKV).



Figure 10: Résumé du plan de thèse ainsi que des différentes souches et de la génération utilisée pour réaliser les expérimentations. Les souches LR (4A, 4B et 11) proviennent dans mélange de la souche LiTOX (génération 13) et de la souche senisble (Bora), elles ont ensuite été sélectionnées à chaque toxine Cry. Ces souches (génération 18) ont ensuite été mélangées avec la souche senisble pour obtenir une souche composite (LR3) sélectionnée au *Bti* (LR3Bti) au mix des toxines Cry (LR3ToX) et non sectionnée pendant 5 générations (LR3NS). L'étude de la résistance des souches LR4A, 4B, 11 (génération 22) et de LR3Bti, 3ToX et 3NS (génération 5) est présentée dans le chapitre 1 (article 1). L'étude de la régulation de la transcription à l'aide du RNA-seq sur les souches LR4A, 4B et 11 (génération 29) et sur LR3Bti (génération 10) est présentée dans le chapitre 1 (article 2). L'étude de la régulation de la souche sensible exposée au *Bti* a permis d'identifier des gènes impliqués dans la réponse aux toxines chez les différentes souches sélectionnées : LR4A, 4B et 11 (génération 33) et LR3Bti (génération 14), les résultats sont présentés dans le chapitre 2 (article 3). Les étudex de traits immunitaires et de la sensibilité aux virus de la DENV et du CHIKV chez souches résistantes (LR4A, génération 33 et LR3Bti, génération 14) en comparaison de la souche sensible sont présenté »es dans le chapitre 3.

Chapitre 1 : Caractérisation de la résistance constitutive des souches

I. Contexte de l'étude

Plusieurs facteurs peuvent jouer sur la probabilité d'apparition et l'évolution de résistance aux toxines de *Bt* en population naturelle.

Certaines toxines Cry peuvent partager des récepteurs membranaires entrainant des phénomènes de résistances croisées entre les toxines. Ainsi, une souche d'H. virescens et deux de Pe. gossypiella, résistantes à Cry1Ac, ont montré une résistance croisée à Cry1Aa et Cry1Ab (entre 500 et 10.000 fois), due à un récepteur commun aux trois toxines (Gould et al., 1995; Tabashnik et al., 2002, 2000). 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). Etant donné que le Bti perd rapidement sa toxicité en présence de litière végétale du fait de la forte baisse de la biodisponibilité de Cyt1Aa et que la rémanence de la toxicité du Bti dans les litières végétales montre une diminution drastique de la proportion en toxine Cyt1Aa, il est possible que la pression insecticide du Bti soit exercée en majorité par les toxines Cry. Si le mode d'action des toxines Cry du *Bti* est similaire et que la sélection à une toxine Cry du *Bti* entraine de forts niveaux de résistances croisées aux autres toxines Cry alors la sélection de résistance en population naturelle peut être facilitée. Il a été montré chez C. quinquefasciatus que la sélection au mélange de Cry4Aa et Cry4Ba entrainait une résistance de 117 fois à Cry4Aa et Cry4Ba mais également une résistance croisée de 156 fois à Cry11Aa (Wirth et al., 2010). Le genre Culex n'étant pas sensible à Cry4Ba (Delécluse et al., 1993), ce résultat suggère une forte résistance croisée entre Cry4Aa et Cry11Aa. La souche SSC11 d'A. aegypti, résistante 124 fois à Cry11Aa présente aussi une forte résistance croisée à Cry4Aa (66 fois) mais une faible résistance croisée à Cry4Ba (13 fois) (Lee et al., 2014). Dans ce chapitre (articles 1 et 2), nous avons caractérisé la résistance croisée de trois souches sélectionnées respectivement à Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa.

La résistance aux toxines Cry du *Bt* est également connue pour altérer la fitness des insectes sélectionnés en laboratoire ou échantillonnés sur le terrain (Gassmann et al., 2009). Les traits d'histoire de vie les plus touchés sont le temps de développement, la survie, la fécondité et la viabilité des œufs. Chez la souche LiTOX résistante au Bti, des coûts ont été détectés à tous les stades de vie du moustique (œuf, larve, adulte) comprenant un temps de développement larvaire plus long, une plus faible fécondité des femelles et une moins bonne conservation des œufs (Paris et al., 2011a). Aussi, la résistance au Bti n'étant pas fixée, les coûts sur la fitness entrainent une diminution drastique de la résistance en seulement 5 générations sans sélection au Bti. Ces données sont nécessaires pour adapter la stratégie de gestion des populations lorsqu'une résistance apparaît sur le terrain. En effet, si on sait que la résistance est coûteuse en termes de fitness, alors l'arrêt des traitements va favoriser les individus les plus sensibles et en quelques générations le traitement peut redevenir efficace. Dans cette étude (article 2), nous avons mesuré plusieurs traits d'histoire de vie ainsi que l'évolution de la résistance lorsque la pression de sélection est relâchée sur les souches résistantes aux toxines séparées et au Bti.

Dans le cas du *Bti*, l'absence de résistance en population naturelle est attribuée à l'interaction complexe entre ses quatre toxines principales (Bravo et al., 2007). Néanmoins, nous avons vu que la rémanence du *Bti* en milieu naturel montre une forte diminution de la proportion de la toxine Cyt, qui augmente normalement l'activité toxique des toxines Cry par synergie. Cette rémanence différentielle des toxines peut entrainer une résistance modérée au *Bti* mais une forte résistance aux toxines Cry testées individuellement (Paris et al., 2011b). L'apparition de résistance aux toxines Cry du *Bti* en population naturelle pourrait donc être masquée par une faible résistance au *Bti*. Il est donc nécessaire de mieux caractériser la résistance aux toxine et pouvoir identifier une résistance précoce sur le terrain, avant qu'elle n'impacte l'efficacité des traitements insecticides. Dans cette étude (article 2) nous avons caractérisé les gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines Cry à l'aide de RNA-seq.

La toxine Cyt1Aa est connue pour retarder l'évolution de la résistance à Cry11Aa chez *C. quinquefasciatus* quand la souche est sélectionnée avec une combinaison de Cyt1Aa et de toxine(s) Cry (Wirth et al., 2005). Néanmoins, on ne sait pas si son

activité synergique peut prévenir l'évolution de la résistance chez des moustiques déjà résistants aux toxines Cry. La souche LR3Bti provenant d'un mélange des souches sélectionnées à une toxine Cry, puis sélectionnée au *Bti*, nous a permis de répondre à cette question. De plus, la toxine Cyt1Aa pourrait s'insérer spontanément dans la membrane épithéliale et semble agir comme un « récepteur » pour les autres toxines Cry du *Bti* (Elleuch et al., 2015; Pérez et al., 2005). Selon cette hypothèse, l'altération des récepteurs naturellement présents chez les individus sensibles ne devrait pas être un mécanisme responsable de la résistance aux toxines Cry. Nous avons donc étudié les mécanismes de résistances potentiels de cette souche à l'aide de RNA-seq (article 2).

II. Article 1

Renaud Stalinski, Guillaume Tetreau, Thierry Gaude, Laurence Després

Pre-selecting resistance against individual Bti Cry toxins facilitates the development of resistance to the Bti toxins cocktail.

Journal of Invertebrate Pathology 119 (2014) 50-53

Contribution : J'ai conçu le plan expérimental et réalisé les bioessais. J'ai rédigé l'article.

Cet article montre qu'il y a de la résistance croisée entre toutes les toxines Cry chez les souches sélectionnées à une toxine Cry suggérant qu'elles partagent des mécanismes de résistance communs. Néanmoins, on retrouve une résistance croisée plus forte entre Cry4Ba et Cry11Aa qu'entre Cry4Aa et les autres toxines Cry suggérant que LR4B et LR11 partagent plus de mécanismes de résistance qu'avec LR4A.

Le mélange des trois souches sélectionnées à une toxine a donné une souche composite appelée LR3. La souche LR3 a été sélectionnée avec un mélange des trois toxines Cry (LR3Tox), au *Bti* (LR3Bti) ou non sélectionnée pendant 5 générations. Une augmentation similaire et significative de la résistance de LR3Tox et LR3Bti au mix de toxines Cry est observée. Ces résultats suggèrent que lorsqu'une résistance aux toxines séparées est présélectionnée, la résistance aux

toxines Cry continue d'augmenter indépendamment de la présence de Cyt dans le mélange de toxines utilisé pour la sélection.

La résistance constitutive

Journal of Invertebrate Pathology 119 (2014) 50-53

Contents lists available at ScienceDirect



Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip

Short Communication

Pre-selecting resistance against individual Bti Cry toxins facilitates the development of resistance to the Bti toxins cocktail



Cross Mark

Renaud Stalinski^{a,1,1}, Guillaume Tetreau^{a,b,1}, Thierry Gaude^a, Laurence Després^a

^a Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041. Grenoble cedex 09, France ^b Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

article info

Article history: Received 4 February 2014 Accepted 3 April 2014 Available online 21 April 2014

Keymords: Aedes aegypti Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Resistance Bioassay

abstract

The bioinsecticide Bacillus thuringiensis subsp. israelensis is a larvicide used worldwide for mosquito control, which contains three Cry toxins and one Cyt toxin. We investigated for the first time in Aedes aegypti (1) the evolution of resistance and cross-resistance of strains selected with each Cry toxin, and (2) the effect of pre-selection with Cry toxin on the evolution of resistance to a mix of Bti toxins. Cross resistance was higher between Cry4Ba and Cry11Aa than between Cry4Aa and either Cry4Ba or Cry11Aa, suggesting both common and specific mechanisms of resistance. Pre-selecting resistance to each Cry toxins facilitated the development of resistance to the full Bti toxins cocktail.

Ó 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) is a bioinsecticide considered as a safe and efficient alternative to chemical insecticides for mosquito control (Lacey, 2007). Mosquito larvae are killed after the ingestion of a crystal, produced by the bacteria during its sporulation, which contains four main toxins: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa (Margalith and Ben-Dov, 2000). Despite its use for decades in several countries, no firm case of Bti resistance has been detected in the field to date. This lack of resistance is generally attributed to the strong synergistic interaction between Cry and Cyt toxins (Wirth et al., 1997). Cyt toxins are known to delay the evolution and expression of resistance to Cry proteins (Wirth et al., 2005, 2000). Although the mode of action of Cyt toxins and their synergistic interactions with Cry toxins are poorly understood (Butko, 2003), it has been suggested that Cyt toxins interact with Cry toxins to facilitate their oligomerization and insertion into the gut epithelium, critical steps in Cry mode of action and therefore in Bti toxicity for mosquitoes (Cantón et al., 2011; Perez et al., 2007).

It was shown recently that in contact with organic matter, such as leaf litter, Bti toxicity for mosquitoes dramatically decreases due to a strong decrease in Cyt bioavailability (Tetreau et al., 2012c). The low environmental persistence of Cyt compared to Cry toxins might lead to altered proportions of Cyt/Cry toxins persisting in mosquito breeding sites and facilitates resistance development to Cry toxins in exposed mosquitoes (Paris et al., 2011; Tetreau et al., 2012a). Indeed, selection of mosquitoes for 30 generations with leaf litter containing altered proportions of Bti toxins led to a moderate resistance to Bti but up to 70-fold resistance to individual Cry toxins in the selected resistant strain (LiTOX strain) as compared to the susceptible parental strain (Tetreau et al., 2012b). Cvt toxin is known to delay resistance development when mosquitoes are selected with Cry and Cyt toxins simultaneously (Wirth et al., 2005), but it is unknown if its synergistic activity can prevent Bti resistance evolution in mosquitoes already resistant to Cry toxins.

Three strains were selected for 22 generations with each of the three Bti Cry toxins in order to evaluate their cross-resistance to other Cry toxins, to a cocktail of the three Cry toxins and to the full Bti toxin mixture (Cry +Cyt toxins). Then, individuals from these three strains were cross-bred in order to generate a composite strain that was further selected for five generations with a mixture of Cry toxins, with Bti or not selected. The resistance status of the two selected strains was compared to their non-selected counterpart for each Cry toxin, for a mixture of Cry toxins, and for Bti in order to determine if pre-selecting resistance to individual Cry toxins, even in presence of Cyt.

Corresponding author. Address: Laboratoire d'Ecologie Alpine, Université de Grenoble 1, 2233 rue de la Piscine, 38400 Saint-Martin d'Hères, France. Fax: =33 (0)4 76 51 42 79.

 $^{^{-1}\,}$ These authors contributed equality to the work

http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.002 0022-2011/Ó 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and insecticide production

Protoxins were produced separately using a strain of B. thuringiensis subsp. israelensis (4Q2-81) transformed with the plasmids pHT606, pHT618 and pWF53 for Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, respectively. These strains were obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) or from B. Federici (University of California, Riverside, USA). To suppress any effect of the insecticide formulation, we used a non-formulated B. thuringiensis subsp. israelensis toxins/spores suspension produced in the laboratory using spores isolated from commercial Bti VectoBac WG. Spore and crystal suspensions were produced and quantified as previously described and conserved in water at 20 °C until used (Tetreau et al., 2012b).

2.2. Mosquito strains

The Aedes aegypti LR4A, LR4B and LR11 strains used for this study were selected for 22 generations using Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11a toxins, respectively, from a strain constituted of 80% of the susceptible laboratory Bora-Bora strain and 20% of the Btiresistant $\$ iTOX strain at the generation 13. The composite $\$ LR3 strain was created by mixing together an equal amount of adults from each LR strain (30%each) at the generation 18 and 10%of adults from Bora-Bora strain. This composite strain was then selected for 5 generations with a mixture of Bti Cry toxins in proportions close to those found in Bti (12.5%Cry4Aa, 12.5%Cry4Ba, 75%Cry11Aa), with unformulated Bti, or not selected, to generate the LR3Tox, LR3Bti and LR3NS strains, respectively. Mosquito breeding and selection were done as previously described (Tetreau et al., 2012b). Levels of resistance of all strains to each of the three Cry toxins, to the mixture of Cry toxins and to Bti were measured by a bioassay; larvae from each strain were exposed to 6 concentrations for 24 h to obtain 5-95% 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 $\ensuremath{\mathbb{W}}\xspace{order}$ or $\ensuremath{\mathsf{Health}}\xspace{order}$ Organization (WHO, 2005). Lethal concentration for 50%(LC_{50}) and 90%(LC_{90}) individuals and their 95% confidence intervals (CI) were calculated for each strain and each toxin using a probit statistical model with the module 'dose' of XLSTAT v.2013 (Addinsoft). Differences between strains were considered significant when the 95%CI of lethal concentrations did not overlap. Resistance ratios (RR₅₀ and RR_{90}) were calculated by dividing ${}_{L}C_{50}$ and ${}_{L}C_{90}$ of the strain tested $b_{\rm Y}$ LC_{\rm 50} and LC_{\rm 90} of the reference Bora-Bora strain.

3. Results and discussion

The level of resistance of the LR4A, LR4B and LR11 strains to their selective toxin increased to reach respectively 65, 27 and 29-fold (RR₅₀) and 444, 31 and 32-fold (RR₉₀) to Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa after 22 generations of selection (Fig. 1A). Cross-resistance was observed between each pair of Cry toxins, suggesting that they share some common mechanism of resistance. However, the cross-resistance observed in LR4B to Cry11Aa (10.4-fold) and in LR11 to Cry4Ba (15.4-fold) was higher than that observed for both strains to Cry4Aa (2.8 and 6-fold, respectively), while LR4A exhibited low level of cross-resistance to Cry4Ba and Cry11Aa (10.2 and 4.9-fold) (Fig. 1B). The same patterns were observed with the RR₉₀. This suggests that there is more cross-resistance (i.e., more shared resistance mechanisms) between Cry11Aa. This pattern of



Fig. 1. Resistance ratio for the LR4A, LR4B and LR11 strains selected with Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11a, respectively: over generation (from 2 to 22) at each selected toxin (A) and resistance ratio and cross resistance at each Cry toxin, Cry toxin mixture and Bti at the generation 22 (B).

cross-resistance is congruent with the observation in the \mbox{LiTOX} strain of two resistance phenotypes: one resistant to all Bti Cry toxins and the other resistant to Cry4Ba and Cry11Aa but not to Cry4Aa, suggesting at least two different mechanisms of resistance involved (Paris et al., 2011). Mechanisms of resistance to Cry toxins seem to be different in Aedes and in Culex considering that Culex larvae are naturally tolerant to Cry4Ba but not to Cry4Aa and Crv11Aa (Delécluse et al., 1993). In Culex quinquefasciatus a 117fold resistance obtained by selecting with a mixture of Cry4Aa and Cry4Ba resulted in a 156-fold cross-resistance to Cry11Aa (Cq4AB strain), suggesting cross-resistance between Cry4Aa and Cry11Aa toxins in Culex (Wirth et al., 2012, 2010) as opposed to Aedes (present study). The specific pattern of cross-resistance observed in our strains is somewhat surprising given that Cry4Aa and Cry4Ba share 60% of amino acid sequence but less than 20% with Cry11Aa (Crickmore et al., 1998). Binding experiments performed with Cry4Ba and Cry11Aa revealed that they share multiple receptors in Aedes (Bayyareddy et al., 2009; Cancino-Rodezno et al., 2012; Chen et al., 2009) from which at least one was functionally validated by RNAi (Jiménez et al., 2012). Regarding Cry4Aa, only one study has been performed to date and revealed that Cry4Aa can compete with Cry4Ba and Cry11Aa binding sites, also suggesting common receptors between these toxins (de Barros Moreira Beltrão and Silva-Filha, 2007). Additional experiments are required to better characterize Cry4Aa binding sites and the molecular bases of the cross-resistance observed. To our knowledge, this is the first time such specific pattern of cross-resistance is reported between Bti Cry toxins.

These cross-resistances observed between Cry toxins explain the ability of all the single-toxin selected strains to show significant resistance ratio to the mix of Cry toxins (approximately 10fold) but the tolerance to Bti was low (less than 2-fold), confirming the ability of Cyt toxin to restore the toxicity of Cry toxins (Wirth et al., 2005, 1998, 1997).

The tolerance of the composite LR3 strain ranged from 0.8-fold (to Bti) to 14.3-fold (to Cry4Aa) (Table 1). Selection with either Cry mixture or Bti allowed maintaining the resistance level to Cry4Aa while relaxing the selective pressure resulted in a decrease in Cry4Aa resistance (from 14.3 and 4.4 to 3.5 and 3.2-fold for RR₉₀ and RR₅₀, respectively), suggesting that this resistance is costly. In contrast, the resistance levels of LR3 to Cry4Ba and to Cry11Aa remained stable in the absence of selection pressure, and the resistance to Cry4Ba increased when selected with the Cry toxins

La résistance constitutive

52

Table 1

R. Stalinski et al./Journal of Invertebrate Pathology 119 (2014) 50-53

Lethal concentrations and resistance ratio for the LR3, LR3NS, LR3ToX, LR3Bti and susceptible strains for Bti (| giml of spore and cristal) and Cry toxins (ngiml of protoxin)

⊺o×ins	Strain	LC50 (95%CI)	RR50 (95%CI)	LC90 (95%CI)	RR90 (95%CI)
Cry4Aa	Bora	146.7 (115.9-183.9)	/	703.2 (524.3-1024.7)	/
	LR3	640.6 (445.2-883.3)	4.4 (2.4-7.8)	10026.1 (5976.0-21196.6)	14.3 (5.8-40.9)
	LR3NS	463.6 (360,9-579.3)	3.2 (2.0-5.0)	2434.3 (1849,5-3459,4)	3.5 (1.8-6.6)
	LR3Tox	923 4 (696 8-1194 2)	6.3 (3.8-10.3)	7590.2 (5485.5-11385.0)	10.8 (5.4–21.7)
	LR3Bti	816.2 (623.0-1043.3)	5.6 (3.4-9.0)	5502.5 (4079.0-7973.2)	7.8 (4.0-15.2)
Cry4Ba	Bora	34.9 (29.5–41.6)	/	113.9 (87.8-164.0)	/
	LR3	130.7 (77.6-196.9)	3 .7 (1.7-7.6)	1263.4 (794.2-2321.8)	11.1 (4.3-29.1)
	LR3NS	240.3 (169.6-344.3)	6.9 (4.1-11.7)	4099.9 (2330.6-8876.7)	36 (14.2-101.1)
	L R3 ⊺o×	762.6 (579.7-1001.1)	21.8 (13.9-34.0)	5166 1 (3425 6-9294 8)	45 3 (20 9-105 9)
	LR3Bti	560.6 (426.4-725.7)	16.1 (10.2-24.6)	3403 .7 (2368.4-5617.7)	29.9 (14.4-64.0)
Cry11Aa	Bora	259.4 (206.5-319.3)	/	1200.9 (908.9-1741.8)	/
	LR3	421 2 (310 4 - 559 6)	1.6 (0.9-2.8)	2411.7 (1627.1-4060.7)	2 (0.8-4.9)
	LR3NS	1017.7 (830.3-1276.5)	3.9 (2.6-6.2)	4478.7 (3121.7-7665.9)	3.7 (1.8-8.4)
	L R3 To×	1215.6 (994.7-1480.6)	4 .7 (3.1-7.2)	4920.7 (3712.8-7214.8)	4.1 (2.1-7.9)
	LR3Bti	1358.3 (1115.6-1648.3)	5.2 (3.5-8,0)	5313.7 (4018,5-7802,9)	4,4 (2,3-8,6)
Cry mix	Bora	19.5 (15.3-25.1)	/	78.6 (56.6-122.7)	/
	LR3	65.3 (39.2-101.8)	3.3 (1.3-8.4)	552.9 (317.8-1131.8)	7 (2.3-22.5)
	LR3NS	69.7 (50.3-91.9)	3.6 (2.0-6.0)	405.6 (299.6-593.2)	5.2 (2.4-10.5)
	L R3 ⊺o×	246.4 (165.9-352.8)	12.6 (6.6-23.1)	2579.1 (1670.1-4497.7)	32.8 (13.6-79.5)
	LR3Bti	198.5 (141 ,7- 266.4)	10.2 (5 .7– 1 7. 5)	1831 (1306.6-2781.4)	23.3 (10 ,7- 49 ,1)
Bti	Bora	93,0 (83,7-102,9)	/	189.8 (165.3-227.9)	/
	LR3	73.3 (65.3-82.0)	0.8 (0.6-1.0)	144 (121.3-182.2)	0.8 (0.5-1.2)
	LR3NS	137.6 (120.8-157.8)	1.5 (1.2–1.9)	404.6 (325.0-547.3)	2.1 (1.4–3.3)
	L R3 ⊤o×	149 1 (134 3 - 166 3)	1.6 (1.3-2.0)	303.9 (261,1-371,1)	1.6 (1.1-2.2)
	LR3Bti	150.3 (132.0-172.2)	1.6 (1.3-2.1)	418.7 (338.8-560.0)	2.2 (1.5-3.4)

mixture (from 3.7 and 11.1 to 21.8 and 45.3-fold for RR₅₀ and RR₉₀, respectively) and with Bti (from 3.7 and 11.1 to 16.1 and 29.9-fold for RR₅₀ and RR₉₀, respectively). Such decreased resistance to Cry4Aa without selective pressure, but not to Cry4Ba and Cry11Aa, also suggests that different mechanisms of resistance are involved. Furthermore, these results also show that the presence of Cyt during the selection of the LR3 strain for 5 generations (i.e., the LR3Bti strain) did not affect the evolution of resistance to each Cry toxins when compared to selections with the Cry toxins mixture (i.e., the LR3Tox strain).

A significant increased resistance of LR3Tox and LR3Bti was observed to the Cry toxin mixture (from 3.3 to 12.6 and 10.2 for RR₅₀ and from 7 to 32.8 and 23.3 for RR₉₀, respectively). Although the presence of Cyt toxin in the bioassay conserved its synergistic activity on Cry toxins for all strains tested (i.e., tolerance to Bti was low, from 0.8 to 1.6), our results suggest that when a resistance to Cry toxins is pre-selected in mosquitoes, resistance against Cry toxins can continue to increase, even if the selective toxins mixture contains Cyt toxin.

In the presence of leaf litter, Cyt toxin is much less persistent than Cry toxins (Tetreau et al., 2012a). Therefore, resistance to Cry toxins of mosquito species developing in sites with leaf litter could be facilitated. Our results revealed that resistance to Cry4Aa differs from Cry4Ba and Cry11Aa resistance, which remained stable even without selective pressure. Pre-selected Cry resistance allows bypassing the synergistic effect of Cyt toxin and speeds up the development of resistance to the entire Bti mixture. Although the relatively low level of resistance in the field are reassuring, monitoring the resistance to each Cry toxin could allow anticipating the potential development of Bti resistance in field populations (Tetreau et al., 2013).

Acknowledgments

The authors would like to thank Brian Federici for providing recombinant Bt. They also thank Sophie M. Prud'homme and Alexia Proust for their help for the biological assay. Renaud Stalinski was supported by the French Rhône-Alpes region.

References

- 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 (Stegomyla) aegypti Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 279–286.
- Butko, P., 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2415-2422.
- Cancino-Rodeino, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J.L., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., Evans, A.E., Gill, S.S., Soberón, M., Jurat-Fuentes, J.L., 2012. Comparative proteomic analysis of Aedes aegypti larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from Badillus thuringiensis. PloS One 7, e37034.
- Cantón, P.E., Reyes, E.Z., De Escudero, I.R., Bravo, A., Soberón, M., 2011. Binding of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. Peptides 32, 595–600.
- Syntygian Epides 25, 555 600.
 Chen, J., Aimanova, K.G., Pan, S., Gill, S.S., 2009. Identification and characterization of Aedes aegypti aminopeptidase N as a putative receptor of Badillus thuringiensis Cry11A toxin, Insect Biochem, Mol. Biol., 39, 688–696.
- 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 posticidal gravital practicing. Microbiol. Not. Biol. Page 52, 202, 212
- pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 807–813. De Barros Moreira Beltrão, H., Siva-Filha, M.H.N.L., 2007. Interaction of Bacillus thuringiensis svar. israelensis Cry toxins with binding sites from Aedes aegypti (Diptera: Qulicidae) larvae midaut. FEMS Microbiol. Lett. 266, 163–169.
- (Diptera: Culicidae) larvae midgut, FEMS Microbiol, Lett, 266, 163–169. Delécluse, 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.
- Jiménez, A.I., Reyes, E.Z., Cancino-Rodezno, A., Bedoya-Pérez, L.P., Caballero-Flores, G.G., Muriel-Millan, L.F., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2012. Aedes aegypti alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of Badilus thuringiensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 683–689.
- Lacey, L.A., 2007. Badillus thuringiensis serovariety israelensis and Badillus sphaericus for mosquito control. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23, 133–163. Margalith. Y., Ben-Dov, E., 2000. Biological control by Badillus thuringiensis subsp.
- Margalith, Y., Ben-Dov, E., 2000. Biological control by Badilus thuringiensis subsp. israelensis. Insect Pest Manage. Tech. Environ. Prot. 200, 243–301.
- Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., David, J.-P., 2011. Persistence of Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. Pest Manage. Sci. 67, 122–128.
- Perez, C., Huñoz-Garay, C., Portugal, L.C., Sánchez, J., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2007. Badilus thuringiensis ssp. israelensis Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. Cell. Microbiol. 9, 2931–2937.
- Tetreau, G., Alessi, M., Veyrenc, S., Périgon, S., David, J.-P., Reynaud, S., Després, L., 2012a. Fate of Badilus thuringiensis subsp. israelensis in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter, Appl. Environ. Microbiol. 78, 8362–8367.
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C.M., Stalinski, R., Riaz, M.A., Paris, M., David, J.-P., Adang, M.J., Després, L., 2012b. Larval midgut modifications associated with Bti

La résistance constitutive

R. Stalinski et al./Journal of Invertebrate Pathology 119 (2014) 50-53

resistance in the <code>vellow</code> fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. BMC Genom. 13, 248.

Bacillus thuringienisis subsp. israelensis. Appl. Environ. $\mathbb M$ icrobiol. 64, 4174–4179.

- Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J-P., Reynaud, S., Després, L., 2012c. Decreased toxicity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis to mosquito larvae after contact with leaf litter. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5189–5195.
- Tetreau, G., Stalinski, R., David, J.-P., Després, L., 2013. Monitoring resistance to Bacillus thuringiensis subsp. israelensis in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately, Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio Jan. 108, 894–900, WHO, 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides.
- World Health Organization, Geneva,
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P., Federici, B.A., 1997. CytA enables CryIV endotoxins of Bacillus thuringiensis to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, Culex quinquefasciatus. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 10536–10540.
 Wirth, M.C., Delécluse, A., Federici, B.A., Walton, W.E., 1998. Variable cross-
- Wirth, M.C., Delécluse, A., Federici, B.A., Walton, W.E., 1998. Variable crossresistance to Crγ11B from Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan in Oulex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of

41/9. Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A., 2000. Cyt1A from Bacillus thuringiensis restores toxicity of Bacillus sphaericus against resistant Qulex quinquefasciatus

- (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 37, 401–407.
 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. Appl. Environ. Microbiol. 71, 185–189.
- Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A., 2010. 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. J. Med. Entomol. 47, 814–822.
- Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A., 2012. Inheritance, stability, and dominance of Cry resistance in Qulex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) selected with the three Cry toxins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. J. Med. Entomol. 49, 886–894.

III. Article 2

Contribution : J'ai conçu le plan expérimental, réalisé toutes les manipulations présentées dans cet article avec l'aide de Frédéric Laporte et analysé les données. J'ai supervisé la mesure des coûts de la résistance (dans le cadre du stage de master 1 de Delphine Corvet-Biron).

A. Matériel et méthodes

1. Production des toxines

Une souche de *Bti* ne produisant pas de cristaux (souche 4Q2-81) a été transformée, à l'institut Pasteur (Delécluse et al., 1993), à l'aide des plasmides pHT606, pHT618 et pWF53 pour produire les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, et Cry11Aa, respectivement. Ces souches nous ont été données par Pr Federici. 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 30°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 min puis resuspendus dans de l'eau distillée. Les toxines sont conservées ainsi à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2. Mesure de la résistance

Cinq souches ont été utilisées dans cette étude : Bora sensible au *Bti*, LR4A, LR4B et LR11 sélectionnées respectivement à Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa pendant 29 générations et LR3Bti sélectionnée au *Bti* pendant 10 générations. L'élevage et la sélection des souches résistantes ainsi que la quantification de la résistance de chaque souche à chaque toxine Cry et au *Bti* ont été faits comme décrit dans l'article précédent (page 39, Chapitre 1).

3. Analyse RNA-seq

Pour chaque souche, trois réplicats biologiques constitués d'ARN de 40 larves de stade 4 précoce ont été extraits avec un kit d'extraction "absolutely RNA" miniprep Kit (Agilent) en suivant les instructions du fabricant (Figure 11-1). La qualité et la quantité d'ARN ont été contrôlées à l'aide d'un Bioanalyzer (Agilent 2100). Les ARNs ont été envoyés à « Beckman Coulter Genomics » pour la préparation des librairies d'ADN complémentaires à l'aide du kit Illumina TruSEQ RNA-Seq kit (Illumina) et le séquençage sur un Illumina HiSEQ 2000, générant des millions de courtes lectures (reads) de 100 paires de bases (Figure 11-2).

La résistance constitutive



Figure 11 : Protocole illustré de l'approche transcriptomique réalisée sur les larves de moustiques Un indice de qualité est attribué à chaque base par le séquenceur correspondant à la confiance du logiciel pour la validité du séquençage à cette base : un indice de 30 correspond à une bonne confiance. Les lectures ont donc été filtrées sur leur qualité à l'aide du logiciel Trimmomatic 0.33 avec les paramètres suivants : Leading et Trailing 30 (coupe les bases ayant une gualité inférieure à 30 dans la partie 5' et 3' de la lecture); Slidingwindow 10: 30 (chaque fenêtre de 10 bases doit avoir une moyenne de qualité de 30) et Min length 80 (les lectures de taille inférieure à 80 paires de bases sont retirées) (Bolger et al., 2014) (Figure 11-3). Les lectures ont ensuite été alignées sur le génome d'A. aegypti (http://aegypti.vectorbase.org) avec l'algorithme Tophat 2.1.12 (https://ccb.jhu.edu/software/tophat) en utilisant les paramètres par défaut (autorisant jusqu'à 3 bases par lecture qui ne correspondent pas au génome de référence) (Figure 11-4). Les fichiers alignés sur le génome (Bam) ont été chargés dans Genspring NGS Version 12.5 (Agilent). Les lectures ont été filtrées sur la qualité de l'alignement (qualité d'alignement >250 et seul le premier alignement de chaque lecture est gardé). La couverture normalisée des lectures sur chaque gène a été calculée en utilisant les RPKM (lectures par kilobase par million de lectures), ce qui a permis de réannoter le génome pour chaque transcrit connu et de trouver des nouveaux transcrits en utilisant les paramètres par défaut (Figure 11-5) (Després et al., 2014). Les gènes retenus pour l'analyse ont un RPKM supérieur à 0.5 (~30 lectures par kilobase) pour au moins une souche. Les gènes ont été classés dans 10 catégories différentes; les gènes candidats à la résistance au Bti, (Bti candidat) basée sur la bibliographie (Lee et al., 2015; Likitvivatanavong et al., 2011b; Zhang et al., 2013) incluant 88 récepteurs potentiels (12 cadhérines, 13 ALPs, 39 APNs, 14 alpha amylase et 10 glycosides hydrolases) et 105 protéases à sérines ; Détoxication ; Autre enzyme ; Cuticule ; Immunité ; Hormone et signal de neurotransmission; Facteur de transcription; Intra et extra cellulaire échange/ protéine chaperonne ; Fonction non connue ; Nouveau gène.

Le ratio de transcription entre les souches résistantes et la souche sensible pour chaque gène est calculé : RPKM souche résistante / RPKM souche sensible. La différence d'expression pour chaque souche résistante est testée avec un test non paramétrique de wilcoxon (p-valeur<0.05) réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007). Seuls les gènes ayant un ratio d'expression supérieur à 2 fois (dans les deux sens) et une p-valeur inférieure à 0.05 sont considérés comme différentiellement exprimés.

Les fréquences alléliques à chaque position ont été quantifiées pour détecter du polymorphisme (SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide) entre les différentes souches (Figure 11-6). Les SNPs ayant au moins 15 lectures dans chaque réplicat et chaque souche ont été conservés pour l'analyse. Deux méthodes ont été utilisées

pour détecter les SNPs « outliers ». Les SNPs ayant une différence de fréquence de 40% avec la souche sensible sont considérés comme différentiellement représentés. Pour détecter des SNPs « outliers », l'utilisation du logiciel bayescan est particulièrement adaptée dans notre cas car toutes les populations proviennent de la même population source. Ce logiciel compare la valeur de Fst (indice de différenciation génétique) sur chaque SNP et indique si le SNP est sous sélection directionnelle dans au moins une des souches (Foll et Gaggiotti, 2008). L'effet génique des SNPs est obtenu en comparant la localisation du SNP avec le génome de référence et est défini comme 5'UTR, 3'UTR, synonyme, non synonyme ou autres (intronique ou intergénique).

Les gènes différentiellement sur- ou sous-transcrits et ceux comportant des SNPs différentiellement représentés sont associés à des catégories et des termes GO (Gene Ontology). L'enrichissement du nombre de gènes dans ces catégories et dans ces termes GO est testé en utilisant le test exact de Fisher.

4. Modélisation des protéines

Les protéines potentiellement impliquées dans la résistance au *Bti* ayant des mutations non synonymes ont été modélisées à l'aide du logiciel SWISS-MODEL (<u>http://swissmodel.expasy.org/</u>). Les modèles ainsi générés ont été ouverts dans le logiciel chimera 1.10 pour identifier la localisation (surface ou interne à la protéine) des acides aminés affectés par les mutations non synonymes (Pettersen et al., 2004).

5. Validation des SNPs

Pour valider les SNPs détectés en RNA-seq sur les lots de larves, nous avons effectué un séquenceçage individuel génomique (Sanger) de 10-20 larves (Tableau 5). Les larves individualisées ont été broyées dans un tampon contenant 2% de CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) puis l'ADN a été extrait par une méthode classique (phénol/chloroforme). Selon la ou les souches dans lesquelles un SNP d'intérêt a été trouvé, différentes conditions ont été testées (Tableau 5). Les amorces de deux ALPs (AAEL003286+AAEL003317 et AAEL003905), deux APNs (AAEL007201 et AAEL007204), et une alpha-amylase (AAEL013241) ont été

générées en se basant sur le génome d'*A. aegypti* en utilisant le logiciel primer design tool (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>) (Tableau 2).

Gène	N° vector base	séquence Amorce forward (5'-3')	séquence Amorce reverse (5'-3')	taille (pb)
ALP	AAEL003286+ AAEL003317	AGAGAGGTGTCAGTCGATCC	TGGATCACATCCGTCTTTCATA	741
ALP	AAEL003905	AGTCGTTTCTATTCCGAGAAGG	AAAGACCGATGGTTCCGTAG	1035
APN	AAEL007204	GGTCCTGTTTGCTTTTGTAATCTC	TAGGGTAACTGCTGGAGTACAATC	731
APN	AAEL007201	CATTACTTCCGAAGACTCTACTACA	CTTCGATACACTTAACACAAACGTA	1293
Alpha -amylase	AAEL013241	CTTCAATCCTCCTTGTGAAATCTAC	ATTGATATGAATGGCCAAGACAC	1030

Tableau 2 : Séquences des amorces u	utilisées pour la validation des SNPs
-------------------------------------	---------------------------------------

L'amplification d'ADN a été faite dans un volume final de 25 µL avec 2mM de MgCl2, 0.1mM de chaque dNTP, 0.2µM de chaque amorce, 2µg de BSA (albumine de sérum bovin), 0.6U d'AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et 50ng d'ADN. Le programme de PCR commence par l'étape de dénaturation, 10 min à 95°C; 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, fixation des amorces à 56°C pendant 30 sec et élongation pendant 2 min à 72 °C puis une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 min. Les séquences obtenues de « Beckman Coulter Genomics » ont été alignées en utilisant le logiciel Bioedit (Hall, 1999). Le logiciel DNASP 5.1 a été utilisé pour phaser chaque haplotype (n=2) ainsi que pour analyser la diversité génétique de chaque souche (diversité nucléotidique, la diversité haplotypique, et le nombre moyen de nucléotides différents dans chaque souche (Librado et Rozas, 2009)). La déviation de l'équilibre de neutralité a été testé en appliquant le test de D de Tajima (Tajima, 1989) et le D* et F* de Fu et Li (Fu et Li, 1993). Un test significatif pour un gène dans une des souches sélectionnées indique que ce gène est sous sélection (Paris et al., 2013)

6. Extraction des enzymes de la lumière intestinale

Pour chaque souche, trois réplicats biologiques ont été réalisés. Les intestins moyens de 10 larves ont été extraits sur glace puis déposés ensemble dans 50 µL d'eau distillée, homogénéisés 30 sec à l'aide d'un vortex puis centrifugés à 12.000g pendant 10 min à 4°C. 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.

7. Activation des protoxines Cry par les protéases intestinales

Les protoxines sont solubilisées et purifiées en centrifugeant la suspension cristal/spore à 16.000g pendant 15 min puis en les resuspendant dans du tampon Na₂CO₃ (50 mM) + DTT (Dithiothréitol, 10 mM), pH 9,5. La suspension est ensuite placée 1h à 60°C. Après une centrifugation à 10.000g pendant 10 min, le surnageant, contenant les toxines solubilisées, est récupéré dans un tampon TU (40mM acide phosphorique, 40mM acide acétique et 40mM acide borique) ajusté à pH 9 avec de la soude (NaOH). Les protoxines sont incubées à 37°C pendant 1, 3, 5, 10, 30, 60 et 180 min avec 0,5 µg de protéines totales extraites de la lumière intestinale des larves. Un témoin positif consistant en une digestion de 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 (Laemmli Sample Buffer) et du DTT ainsi que par un chauffage de l'échantillon à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite mis à migrer dans un gel d'acrylamide à 10% pendant 1h30 à 140V (Figure 12). Les gels sont colorés avec du bleu de Coomasie 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 12). Pour chaque temps, les différences d'activation entre la souche sensible et les souches résistantes à une toxine (e.g. activation de Cry4Aa par Bora comparée à l'activation de Cry4Aa par LR4A...) sont comparées à l'aide d'un test de Wilcoxon réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007).

La résistance constitutive



Figure 12: Protocole d'analyse de la capacité d'activation de la protoxine Cry4Ba du *Bti* par les protéases intestinales. Les protoxines sont incubées 1, 3, 5, 10, 30, 60, 180 min avec les extraits enzymatiques. Des témoins sans enzyme (T0) 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 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 T0, 10, 60 min et T+) et l'intensité des pics correspondant 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. Repris de (Tetreau, 2012)

8. Mesure des coûts de la résistance

La mesure des coûts de la résistance a été réalisée dans le cadre du stage de master 1 de Delphine Corvet-Biron. Les résultats de la souche LR11 ne sont pas présentés car nous avons observé une forte mortalité inexpliquée dans cette souche. Sur la génération 24 des souches LR4A et LR4B, un bioessai a été réalisé pour évaluer la résistance initiale et après 5 générations sans sélection. Cette mesure nous permet d'évaluer le maintien de la résistance sans pression de sélection. Les ceufs de la souche LR4A, LR4B, LR11 à la génération 24 et des œufs de la souche Bora ont été conservés pendant 4 mois pour évaluer les taux d'éclosion. Ils ont ensuite été comparés à l'aide d'un test de Wilcoxon réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007). Aussi, le temps de développement depuis l'éclosion des œufs jusqu'à l'émergence des adultes (en différenciant les mâles des femelles) a été mesuré à la génération 29 des souches LR4A, LR4B et à la génération 10 de la souche LR3Bti. Les temps de développement sont comparés à celui de la souche sensible à l'aide d'un test de wirtest de la souche sensible à l'aide d'un test de la souche sensible à l'aide d'un test de la souche le la souche le logiciel R 3.2.1 (P, 2007). Aussi, le temps de développement depuis l'éclosion des œufs jusqu'à l'émergence des adultes (en différenciant les mâles des femelles) a été mesuré à la génération 29 des souches LR4A, LR4B et à la génération 10 de la souche LR3Bti.

B. Résultats et discussion

Dans cette partie, je vais décrire les principaux résultats obtenus en transcriptomique sur un gène ou sur une catégorie particulière de gènes. Pour chacun, je décrirai leur implication potentielle dans la résistance des différentes souches. Etant donné le caractère descriptif de l'approche par RNA-seq, toutes ces interprétations sont forcément spéculatives et les hypothèses correspondantes nécessitent d'être validées par des approches fonctionnelles.

1. Analyse globale

Dans cette partie, je vais décrire les niveaux de résistances de chacune des souches sélectionnées ainsi que le rôle potentiel des modifications (transcription ou SNP), qui affecte différentiellement certaines classes (catégorie et terme GO) de gènes, dans la résistance.



a) Résistances aux toxines Cry et au Bti

Figure 13 : (a) Évolution du ratio de résistance (RR_{50}) de la souche LR4A, LR4B et LR11, sélectionnée respectivement à Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa, à leur toxine de sélection au cours des générations (2 à 29). (b) Ratios de résistances (RR_{50} et RR_{90}) de la souche LR4A, LR4B, LR11 et LR3Bti à la génération 29.

Les trois souches résistantes sélectionnées à une toxine Cry présentent des niveaux de résistance importants à leur toxine, supérieur à 10.000 fois pour LR4A à Cry4Aa, 329 fois pour LR4B à Cry4Ba et 83 fois pour LR11 à Cry11Aa. L'évolution de la

résistance est exponentielle pour les souches résistantes à une toxine bien que la résistance à Cry11Aa soit moins forte. Ces résultats de résistance sont cohérents avec la toxicité connue pour chaque toxine chez A. aegypti (Ben-Dov, 2014), Cry4Aa étant la moins toxique, le niveau de résistance atteint est le plus important alors que pour Cry11Aa, toxine la plus toxique, le niveau de résistance est le plus faible. Les trois souches présentent des résistances croisées avec les autres toxines du Bti ; LR4A est faiblement résistantes aux autres toxines (inférieur à 10 fois) alors que LR4B est résistante 48 fois à Cry4Aa et 24 fois à Cry11Aa. LR11 est cross-résistante 19 fois à Cry4Aa et 32 fois à Cry4Ba. Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux obtenus sur la souche SSC11 d'A. aegypti sélectionnée à Cry11Aa (résistante 124 fois) qui présente une plus faible résistance croisée à Cry4Ba (13 fois) qu'à Cry4Aa (66 fois), (Lee et al., 2015). Tous ces résultats indiquent que la résistance à chaque toxine induit des mécanismes de résistance spécifiques à la toxine avec laquelle la souche est sélectionnée mais aussi des mécanismes communs permettant de résister aux autres toxines Cry du Bti. Aussi, en accord avec les résultats présentés dans l'article 1, il semble que la souche LR4A développe des mécanismes très spécifiques à Cry4Aa car ils n'induisent que des niveaux de résistance modérés aux autres toxines Cry. En revanche, la résistance de LR4B et LR11 à la génération 29 induit aussi une résistance croisée à Cry4Aa, ce qui n'avait pas été observé dans l'article 1 (génération 22).

Après 5 générations de sélections supplémentaires la souche LR3Bti présente toujours des niveaux de résistance similaires (entre 8 et 13 fois). Les niveaux de résistances n'ont donc pas évolué, ce qui est cohérent avec le fait que la toxine Cyt retarde l'évolution de la résistance (Wirth et al., 2000; Wirth et al., 2005). De plus, les niveaux de résistances au *Bti* de toutes les souches sélectionnées restent faibles (entre 1.2 et 1.8 fois), en accord avec le fait que la toxine Cyt restaure la toxicité des toxines sur des larves résistantes par synergie, vraisemblablement en se substituant aux récepteurs des toxines Cry (Wirth et al., 1997).

b) Analyse du transcriptome par RNA-seq : alignement sur le génome et réannotation

Un total de 710.261.087 séquences de 100 paires de bases a été obtenu, avec une moyenne de 47 millions de lectures par réplicat. Le filtre sur la qualité des bases a

permis d'éliminer 14.6% des lectures. Les 71.6% des lectures qui se sont alignées sur le génome ont été utilisées pour l'analyse. Le filtre sur la qualité des bases ayant été stringent, le filtre sur la qualité de l'alignement n'a pas eu d'effet. Un total de 12.587 gènes présentant une couverture >0.5 RPKM dans tous les réplicats d'au moins une souche ont été conservés pour l'analyse. Ces gènes incluent 3665 (29.1%) gènes ayant une structure différente (introns/exons) de celle du génome de référence et 460 nouveaux gènes (3.7%).

c) Transcription différentielle des gènes



Gènes sur-transcrits (605)

Gènes sous-transcrits (543)

Figure 14 : (a) Analyse de transcription différentielle des gènes : nombre et proportion des gènes significativement sur- et sous-transcrits et avec une différence d'expression de +/-2 (FC) dans chaque souche résistante et au total comparé à la souche sensible. (b) Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes sur- et sous-transcrits spécifiques et en commun dans chaque souche résistante et les termes GO associées à chaque case du diagramme (flèches noires).

Parmi tous les gènes détectés, 1140 gènes (9.1%) sont différentiellement transcrits (Figure 14-a) dans au moins une souche résistante en comparaison de la souche sensible. On observe que la proportion de gènes sur- ou sous-transcrits est sensiblement la même pour chaque souche. Le nombre de gènes différentiellement transcrits varie en fonction des niveaux de résistance, ainsi la souche LR4A résistante plus de 10.000 fois à Cry4Aa présente le plus grand nombre de gènes différentiellement transcrits (796) alors que la souche LR3Bti faiblement résistante à chaque toxine Cry et au *Bti* présente seulement 274 gènes différentiellement transcrits spécifiques à chaque souche et en commun entre toutes les combinaisons de souches. L'étude des termes GO dans les différents « compartiments » du diagramme de Venn nous montre une sur-représentation de certains termes GO seulement dans les gènes sur-

On note une sur-représentation des gènes impliqués dans la conformation de l'ADN (10 gènes codants pour des histones) commun entre LR4B et LR3Bti. Ces gènes apparaissent aussi sur-transcrits dans les souches LR4A et LR11, mais de façon non significative dû à une trop grande variabilité de leurs expressions (données non montrées). Les histones sont impliqués dans la compaction de l'ADN mais aussi dans la médiation de la fixation des complexes protéiques impliqués dans la transcription et l'épissage des transcrits (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Luco et al., 2010; Nègre et al., 2011). Chez *A. aegypti*, il a été suggéré que leur modification pouvait affecter la sensibilité aux pathogènes en modifiant la régulation des gènes impliqués dans le développement, la reproduction et l'immunité (Sharakhov et Sharakhova, 2015). La sur-transcription des histones, potentiellement impliqués dans la régulation de plusieurs gènes simultanément, pourrait donc jouer un rôle dans la résistance. Néanmoins, au vu de la diversité du rôle des histones il serait nécessaire d'étudier plus précisément le rôle de ces gènes chez *A. aegypti*.

La résistance constitutive



Figure 15 : Proportion de chaque catégorie parmi tous les gènes détectés (12587) et proportion de chaque catégorie parmi les gènes sur- et sous-transcrits dans chaque souche résistante comparée à la souche sensible Les gènes sont catégorisés en 10 catégories : Bti candidat (Bti) ; Cuticule (Cut) ; Détoxication (Detox); Hormone et signal de neurotransmission (HSN) ; Immunité (Imu) ; Intra et extra cellulaire échange/ protéine chaperonne (IECE/PC) ; Autres enzymes (Autres) ; Structure (Stru) ; Facteur de transcription (FT) ; Fonction non connue (NC) ; Nouveau gène (NG). L'enrichissement de ces catégories est comparé à tous les transcrits détectés en utilisant un test exact de Fisher. Le pourcentage des catégories significativement (p-valeur < 0.05) enrichies est indiqué.

De plus, le terme GO associé aux gènes cuticulaires apparaît sur-représenté chez toutes les souches résistantes (Figure 14-b). Ce résultat est confirmé par une augmentation significative de la proportion de gènes appartenant à la catégorie « cuticule » chez toutes les souches résistantes (Figure 15, test exact de Fischer <0.05). La cuticule est un exosquelette constitué de chitine qui sert de support physique et protège les insectes de la dessiccation et des infections. La cuticule est divisée en deux catégories, la cuticule dite « rigide », généralement sclérifiée et dure et la cuticule dite « souple », plus flexible permettant la locomotion (Iconomidou et al., 2005). La chitine est toujours associée à des protéines liées à la chitine, certaines de ces protéines jouent un rôle important dans le métabolisme de la cuticule et la préservation de sa structure (Jasrapuria et al., 2010). On retrouve aussi de la chitine dans la membrane péritrophique qui sépare le contenu intestinal des cellules épithéliales (Terra, 2001). Pour infecter l'insecte, le Bt doit passer à travers cette membrane et il est proposé que la production de chitinases par le Bt perfore la membrane pour faciliter le passage des bactéries et des spores (Liu et al., 2009). Une altération des gènes liés à la chitine pourrait donc affecter cette étape. Néanmoins, la totalité des gènes affectés sont des protéines liées à la chitine possédant un motif RR1 ou RR2 (Rebbers-Riddiford), qui sont généralement peu ou pas exprimés dans l'intestin des insectes (Dittmer et al., 2015). Pour aller plus loin, nous avons recherché dans la séquence protéique des gènes à la fonction non connue, des domaines de fixation à la chitine de type peritrophine-A (domaine ChBD2). Les gènes possédant ce type de domaine sont connus pour être exprimés dans l'intestin et/ou dans d'autres organes sécrétant de la chitine (Jasrapuria et al., 2010). Nous avons détecté cinq gènes contenant un domaine à peritrophine-A dont un sur-transcrit chez toutes les souches résistantes, trois sur-transcrits uniquement dans les souches sélectionnées à une toxine et un sous-transcrit chez LR4A et LR4B. Une meilleure compréhension du rôle de ces protéines pourrait nous aider à proposer un rôle de la modification de leur expression dans la résistance au Bti.

La catégorie des nouveaux gènes apparaît sur-représentée dans les gènes sur- et sous-transcrits chez toutes les souches résistantes (Figure 15, test exact de Fischer <0.05). Une recherche de la correspondance de leur séquence d'ARN sur les bases de données génomiques (NCBI) n'ayant rien donné, il est difficile de conclure sur le rôle de ces différences de transcription dans la résistance.

Enfin, nous observons une sur-représentation des gènes correspondant à la catégorie « détoxication » dans les gènes sous-transcrits chez la souche LR3Bti. Il a été proposé chez la souche LiTOX que la sous-transcription de ces gènes pouvait être due, en l'absence de pression de sélection exercée par un insecticide chimique, à une réallocation d'énergie permettant la compensation de l'energie allouée aux mécanismes de résistance au *Bti* (Després et al., 2014; Tetreau et al., 2012b). De plus, au cours de ma thèse, nous avons montré que l'exposition des larves aux UV-A induisait la sur-transcription d'enzymes de détoxication et une augmentation de leur activité (Tetreau et al., 2013a) (Annexe 4). Nous avons également montré que les larves exposées aux UV-A étaient moins tolérantes au *Bti*. La sur-transcription corrélée avec une augmentation de l'activité de détoxication se traduit donc par une moindre tolérance au *Bti* et d'autre part que leur coût de production affecte la tolérance de l'insecte au *Bti*.

d) Analyses et détection des SNPs

Un total de 142226 SNPs a été trouvé avec une couverture supérieure à 15 dans chacun des réplicats de l'analyse. Ces SNPs sont présents sur 6753 gènes (53% des gènes exprimés) et sont distribués sur plus de 76% (1253/1636) des supercontigs annotés dans le génome d'*A. aegypti.* Un total de 1914 gènes est affecté par 7110 SNPs et 461 gènes sont affectés par 670 SNPs non synonymes (mutation qui change un acide aminé de la séquence protéique). Une faible correspondance a été trouvée entre les gènes différentiellement transcrits dans les souches résistantes et les gènes affectés par des SNPs différentiels (112 gènes). Ce résultat est attendu en RNA-seq car cette méthode ne couvre pas les régions régulatrices souvent localisées à l'extérieur du transcrit dans lesquelles des mutations sont susceptibles d'affecter l'expression des gènes plutôt que la séquence génique.

LR4A est la souche présentant le plus de gènes affectés par des SNPs différentiels (1307 gènes dont 322 affectés par des mutations non synonymes) alors que LR3Bti est la souche qui en présente le moins (394 gènes dont 72 affectés par des mutations non synonymes) (Figure 16-a). Nous observons que 226 gènes (dont 37 affectés par des mutations non synonymes) sont affectés par au moins un SNP dans chaque souche. Dans ces gènes affectés par des SNPs, la catégorie « autre

enzyme » est sur-représentée dans toutes les souches résistantes. Cette surreprésentation indique que le métabolisme de toutes les souches sélectionnées est profondément affecté par l'exposition aux toxines Cry du Bti ou au Bti au cours des générations. Les catégories « immunité » et « Intra et extra cellulaire échange/ protéine chaperonne » sont sur-représentées uniquement dans les souches sélectionnées à une toxine (Figure 16-b). Le rôle du système immunitaire dans la résistance/tolérance au Bt étant soupçonné, il est nécessaire de mieux caractériser les traits immunitaires des souches résistantes (Grizanova et al., 2014; Hwang et Kim, 2011) (développé dans le Chapitre 3). Aussi, la catégorie « cuticule » est surreprésentée dans la souche LR4A. Cette souche est la seule à avoir cette catégorie sur-représentée dans les gènes sur- et sous-transcrits (Figure 15) et on retrouve 8.9% de gènes associés à la cuticule dans les gènes affectés à la fois par des SNPs et par des modifications de leur transcription. Il se peut que la forte sélection sur l'expression de ces gènes affecte aussi la diversité génomique des transcrits. On note aussi une sur-représentation des gènes de la catégorie « détoxication » uniquement chez LR11. Même si les enzymes de détoxication ne sont pas impliquées dans la résistance au Bti, il n'est pas exclu que certains produits de dégradation d'une toxine particulière (e.g. Cry11Aa) soient mieux pris en charge par certaines formes d'enzymes de détoxication.

La résistance constitutive



Figure 16 : (a) Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes affectés par des mutations différentielles (plus de 40% de différence avec la souche sensible) spécifiques ou communes entre les souches résistantes. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de gènes affectés par au moins une mutation non synonyme. (b) Proportion de chaque catégorie parmi tous les gènes détectés (12587) et proportion de chaque catégorie parmi les gènes présentant un ou plusieurs SNPs différentiel dans chaque souche résistante comparée à la souche sensible Les gènes sont catégorisés en 10 catégories : Bti candidat (Bti) ; Cuticule (Cut) ; Détoxication (Detox); Hormone et signal de neurotransmission (HSN) ; Immunité (Imu) ; Intra et extra cellulaire échange/ protéine chaperonne (IECE/PC) ; Autres enzymes (Autres) ; Structure (Stru) ; Facteur de transcription (FT) ; Fonction non connue (NC) ; Nouveau gène (NG). L'enrichissement de ces catégories est comparé à tous les transcrits détectés en utilisant un test exact de Fisher. Le pourcentage des catégories significativement (p-valeur < 0.05) enrichies est indiqué.

2. Analyse spécifique

Comme nous l'avons vu précédemment (pages 27-28, Introduction), deux mécanismes de résistance principaux sont développés par les insectes pour résister à des toxines Cry du *Bt*. Dans cette partie, nous avons cherché si une modification de l'activité des protéases et/ou de la transcription ou de la séquence protéique des potentiels récepteurs aux toxines Cry pouvait expliquer la résistance des souches.




Figure 17: (a) Représentation de la différence de transcription des gènes identifiés comme protéases à sérine dans chaque souche résistante. Un dièse (#) représente une protéine retrouvée dans les radeaux lipidiques (Bayyareddy et al., 2012). Une différence d'expression de +/-2 fois et un test de Wilcoxon significatif (p-valeur<0.05) est représenté par une étoile (*). Pourcentage d'activation des protoxines de Cry4Aa (b), Cry4Ba (c) par les extraits enzymatiques de LR4A respectivement, en fonction du temps. (d) Pourcentage de protoxine de Cry11Aa restante après activation par les extraits enzymatiques de LR11. Les souches résistantes sont représentées par des carrés (vert, violet et rouge respectivement pour LR4A, LR4B et LR11) et la souche sensible est représentée par des losanges noirs. Erreur : erreur standard.

Dans cette étude, nous observons que le terme GO associé aux protéases à sérine est sur-représenté dans les gènes sur-transcrits chez LR4B associé avec la surreprésentation de ces gènes dans la catégorie « Bti candidat » (Figure 14-b et Figure 15). De plus, on observe que 9 protéases à sérine et 4 trypsines sont sur-transcrites et que 3 protéases à sérine et 4 trypsines sont sous-transcrites dans au moins une souche résistante (Figure 17-A). On remargue aussi que seulement 1 protéase à sérine est sur-transcrite dans la souche LR3Bti. Pour étudier le rôle potentiel de la différence d'expression des protéases dans la résistance des souches sélectionnées à une toxine, nous avons étudié la cinétique d'activation de chaque souche à sa toxine. Aucune différence significative entre la capacité d'activation des toxines par les souches résistantes et par la souche sensible n'a été détectée (Figure 17-B, C, D). Néanmoins, il a 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 entrainé une résistance chez He. armigera (Rajagopal et al., 2009). Dans notre cas, la résolution des gels ne permet pas de voir une différence aussi faible de la taille des toxines activées liée à une potentielle dégradation postactivation. Pour confirmer l'absence d'implication des protéases dans la résistance, il serait nécessaire de déterminer la séquence des toxines activées par la souche sensible et les souches résistantes.

b) Implication des récepteurs dans la résistance

Les modifications de la transcription ou de la séquence protéique des récepteurs peuvent entrainer de forts niveaux de résistances (Bravo et Soberón, 2008). On peut observer que le nombre de mutations non synonymes dans la catégorie « Bti candidat » est significativement augmenté (test exact de Fisher < 0.05) pour toutes les souches résistantes à une toxine, suggérant que la modification des récepteurs pourrait jouer un rôle dans la résistance aux toxines séparées (Tableau 3).

Tableau 3: Nombre et répartition des SNPs dans tous les gènes affectés par des SNPs différentiels et dans les gènes de la catégorie « Bti candidat » de chaque souche résistante. L'enrichissement est effectué par un test exact de Fisher, les valeurs significatives sont représentées par une étoile (*).

	LR4A		LR4	В	LR1	.1	LF	LR3Bti			
	Total	Bti candidats	Total	Bti Total		Bti candidats	Total	Bti candidats			
Nombre de gènes	1307	26	962	18	1029	17	394	11			
Nombre SNPs (%)	4872 (100)	86 (100)	2877 (100)	53 (100)	3200 (100)	66 (100)	1182 (100)	31 (100)			
Synonymes (%)	2247 (46.1)	65 (75.6)*	1290 (44.8)	41 (77.4)*	1530 (47.8)	45 (68.2)*	530 (44.8)	24 (77.4)*			
Non synonymes (%)	457 (9.4)	17 (19.8)*	255 (8.9)	10 (18.9)*	333 (10.4)	16 (24.2)*	104 (8.8)	6 (19.4)			
5'-UTR (%)	217 (4.5)	3 (3.5)	132 (4.6)	1 (1.9)	124 (3.9)	1 (1.5)	68 (5.8)	1 (3.2)			
3'UTR (%)	763 (15.7)	1 (1.2)	490 (17)	1 (1.9)	519 (16.2)	4 (6.1)	169 (14.3)	0 (0)			
Autres (%)	1188 (24.4)	0 (0)	710 (24.7)	0 (0)	694 (21.7)	0 (0)	311 (26.3)	0 (0)			



Figure 18: Représentation de l'expression des gènes décrits comme potentiel récepteur aux toxines Cry. Un dièse (#) représente une protéine retrouvée dans les radeaux lipidiques (Bayyareddy et al., 2012). Une différence d'expression de +/-2 fois et un test de wilcoxon significatif (p-valeur<0.05) est représenté par une étoile (*). La valeur du ratio d'expression par rapport à Bora est indiquée quand le test est significatif mais la valeur n'est pas supérieure à 2 ou inférieur à -2.

(1) Les ALPs (phosphatases alcalines)

Plusieurs ALPs ont été déjà décrites comme des récepteurs potentiels ou avérés pour les toxines Cry4Ba et Cry11Aa (Bayyareddy et al., 2009; Fernandez et al., 2006; Fernandez et al., 2009; Dechklar et al., 2011; Jiménez et al., 2012). Parmi les

5 ALPs décrites (AAEL000931, AAEL003298, AAEL003313, AAEL009077 et AAEL015070) comme pouvant interagir avec Cry4Ba et/ou Cry11Aa, aucune ne présente de sous-transcription ou de SNPs différentiels entre les souches résistantes et la souche sensible. Au contraire, AAEL015070, une ALP décrite comme récepteur fonctionnel à Cry4Ba (Dechklar et al., 2011), est significativement 2.74 et 2.30 fois sur-transcrite respectivement chez LR4A et LR4B (Figure 18). De plus, nous observons la sur-représentation du terme GO associé à l'activité phosphatase alcaline dans les gènes sur-transcrits associée avec l'augmentation des gènes de la catégorie « Bti candidat » chez LR4A (Figure 14-b et Figure 15). La sur-transcription de 6 ALPs chez LR4A est surprenante sachant que chez 3 souches résistantes de lépidoptères, la sous-expression des ALPs, bien que non directement impliquée dans la résistance, a été retrouvée et proposée comme marqueur de la résistance aux toxines Cry (Jurat-Fuentes et al., 2011).

Néanmoins, une ALP (AAEL003286+AAE003317, annoté comme deux ALPs dans le génome de référence mais démontré comme étant une ALP unique (pages 81-82, Chapitre 2) montre deux SNPs non synonymes chez la souche LR4A (Tableau 5). La fréquence de ces mutations n'a pas été confirmée par le séquençage mais tous les tests de neutralité montrent que le gène est significativement sous sélection directionnelle chez LR4A (Tableau 6). Ce gène a été retrouvé chez la souche LiTOX (résistante 72 fois à Cry4Aa) fortement sous-transcrit (-7.57 fois) et pourrait donc être relié à la résistance à Cry4Aa (Després et al., 2014).

Enfin, le gène AAEL003905 présente 5 mutations non synonymes présentes dans au moins une souche résistante (Tableau 5). Le séquençage a confirmé la différence de fréquence de deux mutations dans les souches résistantes et au moins un test de neutralité est significatif dans chaque souche montrant que ce gène est sous sélection directionnelle (Tableau 6). De plus, le séquençage de ce gène chez larves de la souche Bora les plus tolérantes à Cry4Ba, Cry11Aa et au *Bti,* montre qu'au moins un test de neutralité est significatif. Aussi, les deux mutations recherchées sont en moyenne 10% plus fréquentes que dans l'ensemble de la souche Bora. Ces résultats indiquent que ce gène pourrait être sous sélection après seulement une génération de sélection et que les différentes combinaisons de mutations pourraient permettre de mieux tolérer chaque toxine Cry du *Bti.*

Aucune mutation dans les ALPs n'a été décrite à ce jour comme responsable de la résistance aux toxines Cry chez les insectes mais ce mécanisme est commun dans la résistance liée à d'autres récepteurs (Pardo-López et al., 2013). La résistance aux toxines Cry liée à une sous-expression des ALPs (Guo et al., 2015a; Jurat-Fuentes et Adang, 2004) est avérée chez les lépidoptères et soupçonnée chez la souche SSC11 d'*A. aegypti* (Lee et al., 2014). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour valider le rôle de ces mutations dans la résistance.

(2) Glycosides hydrolases et alpha-amylases

Certaines glycosides hydrolases (Agm3) et alpha-amylases (Agamy1 ; Aaamy1) ont été décrites comme récepteurs à Cry4Ba et Cry11Aa chez An. albimanus et comme récepteur à Cry11Ba chez An. gambiae (Fernandez-Luna et al., 2010; Zhang et al., 2013). Dans cette étude, nous observons la sur-transcription de 2 alpha-amylases (AAEL013421 et AAEL003434) respectivement chez LR4A et LR11 et la soustranscription 3 glycosides hydrolases (AAEL009237; AAEL0015573; de AAEL015020; 2 chez LR4A, 3 chez LR4B et 1 chez LR11) (Figure 18). Ces trois glycosides hydrolases ont été également trouvées sous-transcrites chez la souche LiTOX et pourraient jouer un rôle dans la résistance aux toxines Cry du Bti (Després et al., 2014). On retrouve aussi des mutations non synonymes dans 4 alphaamylases et 2 glycosides hydrolases (Tableau 4). Parmi les alpha-amylases, 3 (AAEL010532, AAEL010540 et AAEL0010537) partagent une identité supérieure à 40% avec Aaamy 1, connue pour fixer Cry4Ba et Cry11Aa (Fernandez-Luna et al., 2010). Les mutations pourraient changer l'affinité des récepteurs pour les toxines et ainsi participer à la résistance. On retrouve un SNP non synonyme dans une alphaamylase et dans une glycoside hydrolase seulement chez LR11 (AAEL013421 et AAEL009243) (Tableau 4). Le séquençage de AAEL013421 a permis de confirmer les fréquences du SNP chez LR11 et qu'il y a sélection directionnelle sur ce gène pour LR11 (pval<0.05; F* de Fu et Li) (Tableau 5). Ces mutations pourraient réduire l'affinité de Cry11Aa et participer à la résistance. Néanmoins, les autres altérations (SNPs ou expression différentielle) des glycosides hydrolases et alpha-amylases sont partagées par les souches résistantes à une toxine mais pas par LR3Bti. Les niveaux de résistances de chaque souche à sa toxine de sélection étant forts, il est peu probable que l'altération commune de ces protéines explique une grande part de la résistance spécifique de chaque souche à sa toxine de sélection.

La résistance constitutive

Tableau 4 : Mutations non synonymes dans des récepteurs potentiels aux toxines Cry, avec dans l'ordre la fonction du gène, son identifiant (vector base) et entre parenthèses le numéro de la mutation en correspondance avec le Tableau 6, sa présence dans les radeaux lipidiques (Li Ra ; * : présent, 0 : absent), le nombre d'outlier dans le gène (out), la base de référence et la base variante, la fréquence de chaque SNP (l'écart type) et le nombre de lectures à cette position (lec) pour chaque souche, la position dans la protéine, le changement d'acide aminé et si l'acide aminé est à la surface de la protéine (+). Les valeurs en rouge indiquent une différence de fréquence supérieure à 40% (entre chaque réplicats deux à deux) entre la souche sensible et la souche résistante.

			Bora LR4A LR4B LR11 LR3Bti															
Récepteur	Gene ID	Li Ra	out	ref	Var	%	lec	%	lec	%	lec	%	lec	%	lec	pos	аа	PS
ALP3	AAEL003286+ AAEL003317 (1)	*	1	т	с	78.9(+/-1.1)	261	22.2(+/-2.6)	506	61.9(+/-5.6)	410	81.2(+/-0.8)	462	84.3(+/-1)	507	207	N->D	
	AAEL003286+ AAEL003317 (2)	*	1	т	A	72.9(+/-1.8)	117	17.4(+/-1)	230	75.9(+/-0.4)	200	83.1(+/-4.2)	299	69.3(+/-1.8)	186	8	I->F	+
ALP5	AAEL003905	0	8	G	А	9(+/-1.4)	129	86.9(+/-2.6)	244	40.3(+/-7.8)	93	34.4(+/-4.7)	110	55.9(+/-1.7)	108	551	S->F	
	AAEL003905	0	8	G	т	32.1(+/-2.5)	318	100(+/-0)	649	100(+/-0)	181	100(+/-0)	152	99.5(+/-0.3)	256	359	Q->K	+
	AAEL003905	0	8	С	А	66.3(+/-1.9)	357	0(+/-0)	1322	0.8(+/-0.4)	354	0(+/-0)	301	0(+/-0)	471	319	G->V	+
	AAEL003905 (1)	0	8	А	С	83.4(+/-8.4)	101	6.1(+/-1.1)	994	25.1(+/-5.4)	251	64.8(+/-1.7)	132	9.6(+/-1.2)	268	110	F->V	-
	AAEL003905 (2)	0	8	А	т	89.2(+/-6.7)	204	7.7(+/-1.3)	1149	22(+/-2.9)	349	68(+/-3.6)	260	25.2(+/-2.9)	372	59	S->T	
APN5	AAEL007204 (1)	*	6	G	С	23(+/-4.5)	283	100(+/-0)	280	43.6(+/-1.4)	259	67.7(+/-1.1)	222	58.5(+/-5.9)	306	72	E->D	
	AAEL007204 (2)	*	6	С	Т	3.4(+/-6.4)	172	69.5(+/-2.9)	71	38.3(+/-5.6)	93	42.5(+/-0.9)	95	40.4(+/-7.7)	128	95	H->Y	+
APN5	AAEL003666	0	0	А	т	12.6(+/-0.8)	335	45(+/-1.8)	335	43.8(+/-6.3)	312	71.1(+/-1.8)	333	45(+/-2.6)	387	25	D->E	-
APN2	AAEL005821	*	2	А	G	33.3(+/-4.5)	135	8.3(+/-0.8)	354	100(+/-0)	56	36.4(+/-1.6)	141	64.1(+/-2.5)	106	254	K->R	+
APN7	AAEL007201 (1)	*	4	А	G	14(+/-3.2)	335	100(+/-0)	62	52.5(+/-12)	52	48.3(+/-8.4)	64	66.7(+/-19.2)	101	740	N->S	-
Alpha-amylase	AAEL013421 (1)	0	1	С	G	28.7(+/-2.3)	1580	56.3(+/-3.9)	4797	40.2(+/-3.6)	2716	90.7(+/-2.7)	2188	33.4(+/-5)	2956	210	A->G	+
Alpha-amylase	AAEL010532	*	6	G	т	44.4(+/-1)	2745	92.6(+/-1.4)	3541	98.9(+/-0.3)	3170	99(+/-0.4)	3612	75.8(+/-0.2)	3394	13	L->F	
Alpha-amylase	AAEL010537	*	1	Т	С	16.4(+/-0.8)	903	36(+/-2.1)	916	27.8(+/-5.2)	960	66(+/-0.8)	756	42.2(+/-2.1)	944	571	V->A	
	AAEL010537	*	1	G	А	36(+/-2.3)	659	96.8(+/-1.3)	481	99.2(+/-0.4)	494	82(+/-3.9)	636	86.4(+/-2.5)	629	150	V->I	
Alpha-amylase	AAEL010540	*	1	А	Т	43.6(+/-1.2)	1275	0.1(+/-0)	1370	0.3(+/-0.1)	1375	0(+/-0)	1572	7.5(+/-0.9)	1516	586	S->T	
	AAEL010540	*	1	G	т	47.7(+/-0.7)	1355	0(+/-0)	1473	0.5(+/-0.3)	1320	0.1(+/-0)	1530	6.7(+/-0.3)	1564	374	D->E	+
Glucoside hydrolase	AAEL009243	0	14	Т	G	97.4(+/-3.6)	887	0(+/-0)	1231	3.6(+/-1.6)	3035	15.8(+/-4.7)	2587	1.2(+/-1.4)	60	209	D->E	+
	AAEL009243	0	14	А	т	3.7(+/-1)	1005	0(+/-0)	799	29.4(+/-9.3)	499	63.6(+/-3.7)	728	3.1(+/-4.4)	1958	325	R->W	+
Glucoside hydrolase	AAEL015021	0	7	G	С	0.4(+/-0.6)	883	98.9(+/-0.7)	1047	98.5(+/-0.6)	2330	91(+/-2.8)	2012	82.1(+/-10.2)	263	335	D->H	+

Tableau 5: Validation par séquençage génomique des SNPs détectés en RNA-seq dans certains récepteurs potentiels. Dans l'ordre, le nom du gène ; la taille du fragment et le nombre d'intron amplifié ; la souche testée (les parenthèses indiquent que les individus les plus tolérants à l'insecticide indiqué sont testés), N (nombre total d'haplotypes séquencés), la différence de fréquence du SNP (1 ou 2 en référence au tableau 4) entre Bora et les autres conditions ; Hap (le nombre d'haplotypes différents) ; π (la diversité nucléotidique) ; k (nombre moyen de nucléotides différents dans la souche) ; résultats des tests de neutralité (*<0.05 ; **<0.01 ; ***<0.001).

Gene	taille	Nb Int	Souches	N	SNP (1)	SNP (2)	Нар	п	k	tajima's D test	fu&li's D test	fu&li's F test
			Bora	22			2	0.003	2.424	-1.32	1.51*	0.78
AAEL003286+	704	1	Bora (Cry4Aa)	24	0.0	0.0	3	0.009	6.406	1.19	1.58*	1.7*
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			LR4A (Cry4Aa)	24	4.9	20.8	2	0.002	1.250	-2.43**	-3.94*	-4.07*
			Bora	30			6	0.018	5.343	1.71	0.69	1.18
			Bora (Cry4Aa)	20	1.7	5.0	6	0.020	6.000	0.69	0.98	1.04
			Bora (Cry4Ba)	24	3.3	10.8	6	0.019	5.674	1.80	1.51*	1.86*
			Bora (Cry11Aa)	20	10.3	30.0	3	0.012	3.505	1.87	1.34	1.73*
AAEL003905	271	0	Bora (Bti)	20	3.3	10.0	4	0.015	4.653	0.66	1.5*	1.46
			LR4A (Cry4Aa)	16	90.4	53.8	2	0.004	1.125	-2.15**	-2.93*	-3.12*
			LR4B (Cry4Ba)	14	25.2	1.7	6	0.022	6.538	1.57	1.51*	1.75*
			LR11 (Cry11Aa)	16	3.3	40.0	4	0.011	3.267	-0.06	1.44*	1.18
			LR3Bti (Bti)	16	40.4	16.3	4	0.022	6.717	1.90	1.51*	1.86*
			Bora	24			7	0.015	10.043	0.79	0.91	1.02
A A EL 007204	602	2	Bora (Cry4Aa)	24	4.2	0.0	9	0.014	9.663	0.23	-0.27	0.13
AALL007204	092	2	LR4A (Cry4Aa)	24	54.2 (fixé)	50.0	5	0.008	5.833	2.34 *	1.49 *	2.04 *
			LR4B (Cry4Aa)	22	22.3	23.5	13	0.015	10.329	1.70	1.21	1.58
			Bora	22			13	0.021	19.788	2.1*	1.48*	1.95*
A A EL 007201	020	2	Bora (Cry4Aa)	22	0.0		11	0.022	20.524	1.73	0.93	1.38
AALL007201	535	2	LR4A (Cry4Aa)	24	31.8 (Fixé)		7	0.009	8.391	3.02***	1.56*	2.34*
			LR4B (Cry4Aa)	24	31.8 (Fixé)		5	0.007	6.453	1.80	1.58*	1.9*
			Bora	18			6	0.009	7.399	-1.11	-0.65	-0.91
A A EL 0122/1	805	0	Bora (Cry11Aa)	24	12.5		9	0.013	10.467	0.70	1.15	1.18
AALLU13241	655	0	LR11 (Cry11Aa)	24	75.0		10	0.015	12.547	1.76	1.32	1.7*
			LR4B (Cry11Aa)	22	51.5		15	0.017	13.896	1.17	0.64	0.94

(3) Les APNs (N-aminopeptidases)

Certaines APNs ont été décrites comme fixant la toxine Cry11Aa (AAEL008155, AAEL012774, AAEL012776, AAEL012778) (Chen et al., 2009b; Chen et al., 2013) et comme récepteurs fonctionnels à Cry4Ba (AAEL005808, AAEL012778 et AAEL012783) (Aroonkesorn et al., 2015; Saengwiman et al., 2011). Parmi les APNs décrites, aucune ne présente de modification de leur expression ou de SNPs non synonymes. Néanmoins, seulement chez LR11, on retrouve la sous-transcription de deux APNs (AAEL008158 : -1.88 fois et AAEL008162 : -1.78 fois ; Figure 18) en commun avec la souche SSC11 (respectivement -2.33 fois et -2.26 fois) (Lee et al., 2014). La sous-transcription de ces APNs pourrait donc jouer un rôle dans la

résistance à Cry11Aa. De plus, une mutation non synonyme dans le gène AAEL003666 chez LR11 pourrait aussi participer à la résistance à Cry11Aa (Tableau 4).

L'APN (AAEL005821) présente également une mutation fixée uniquement chez LR4B. La modélisation de la protéine indique que la mutation affecte un acide aminé de surface qui pourrait participer à l'interaction entre le récepteur et Cry4Ba.

Chez LR4A, deux APNs (AAEL007201 et AAEL007204) présentent des mutations non synonymes (Tableau 4). Pour AAEL007201, le séquençage confirme que la mutation est fixée et que le gène est sous sélection directionnelle chez LR4A (3 tests de neutralité significatifs ; Tableau 5). De plus, chez les individus de LR4B les plus résistants à Cry4Aa, la mutation est aussi fixée (Tableau 5). Cette mutation était déjà présente chez la souche LiTOX essentiellement résistante à Cry4Aa (Després et al., 2014). Cette APN apparaît donc comme un bon candidat à la résistance à Cry4Aa. Pour AAEL007204, le séquençage confirme que la fréquence des SNPs est plus importante chez LR4A et que le gène est sous sélection directionnelle (3 tests de neutralité significatifs ; Tableau 5). Ces mutations étant aussi présentes chez la souche LiTOX, ce gène pourrait participer à la résistance à Cry4Aa (Després et al., 2014).

Les différences observées (SNPs et expression différentielle) des APNs apparaissent plus spécifiques à chaque souche résistante à une toxine ce qui en fait de bons candidats pour expliquer en partie la résistance à chaque toxine. De plus, la souche LR3Bti n'ayant pas de forts niveaux de résistances aux toxines séparées ne présente pas de différence (SNPs ou expression différentielle) sur les APNs, suggérant que ces modifications sont impliquées dans la résistance aux toxines séparées.

3. Coûts de la résistance

Tableau 6 : Synthèse des traits d'histoire de vies étudiés, les valeurs en rouge indiquent une valeur significativement différente de la souche sensible (p-valeur<0.05). Lorsque la différence est significative, l'augmentation ou la diminution relative du trait mesuré est indiquée entre parenthèses.

	Bora	LR4A	LR4B	LR11	LR3Bti
Evolution résistance (RR50) sans pression de sélection (5 générations)	I	de 172 à 55 fois (- 68%)	de 30 à 19 fois (-36%)	I	I
Taux d'éclosion (n=300) (%) (4 mois)	66.0	63.6	49.4 (-25%)	64.3	76.2 (+15%)
Temps de développement Moyen des mâles (n=150) (heures)	194	203	194	1	210 (+8%)
Temps de développement Moyen des femelles (n=150) (heures)	236	255 (+8%)	249 (+5%)	I	270 (+13%)

Toutes les modifications observées chez les souches résistantes par rapport à la souche sensible peuvent un avoir un coût sur la fitness. Une étude synthétique basée sur 77 articles scientifiques traitant de l'étude des coûts liés à la résistance aux toxines du Bt sur 17 espèces différentes, a montré que des coûts étaient observés dans 62% des cas (Gassmann et al., 2009). Dans cette étude, nous observons que toutes les souches résistantes testées présentent un temps de développement des femelles en phase aquatique (larves et nymphes) plus long (en moyenne 22 h en plus) que la souche sensible (Tableau 6). La viabilité des œufs après 4 mois de conservation de la souche LR4B est 25% moins bonne que la souche sensible. La résistance de la souche LR4A et LR4B à la génération 23 est respectivement de 172 fois à Cry4Aa et 30 fois à Cry4Ba. La résistance n'étant pas fixée à cette génération, les coûts sur la fitness entrainent une diminution drastique de la résistance en seulement 5 générations sans sélection. Ces résultats indiquent que la résistance au Bti ainsi qu'aux toxines Cry du Bti est coûteuse. De plus, les coûts testés en laboratoire sont souvent sous-estimés à cause d'un élevage en conditions optimales (pas de prédateurs, nourriture abondante...), (Gassmann et al., 2009). Pour compléter cette étude, il faudrait évaluer la durée de vie des adultes et le nombre de descendants par femelle pour confirmer l'altération de la fitness des

individus à tous les stades de vie. Pour limiter l'apparition de résistance en population naturelle, la connaissance des coûts à la résistance peut par exemple permettre d'adopter une stratégie « haute-dose-refuge » (Tabashnik, 2008). Cette stratégie est basée sur le fait que les individus sensibles plus compétitifs en absence d'insecticide peuvent migrer vers les zones traitées et se reproduire permettant ainsi de « diluer » la résistance et d'en ralentir l'implantation.

C. Conclusion

Lors de cette étude, nous avons pu voir que les souches résistantes aux toxines séparées partagent des mécanismes communs mais ont aussi des mécanismes de résistance spécifiques pour atteindre de forts niveaux de résistance à chaque toxine. La résistance semble s'expliquer par diverses modifications dans chaque souche suggérant que la résistance est multigénique et spécifique à chaque toxine. Les protéases ne semblent pas impliquées dans la résistance aux toxines Cry du *Bti.* La modification de l'expression des récepteurs potentiels n'apparaît pas comme un mécanisme de résistance aux toxines Cry (excepté pour LR11 avec deux APNs sous transcrites). Il semble que la forte sélection exercée sur les potentiels récepteurs conduit à la sélection de mutations pouvant expliquer la résistance aux toxines Cry. Ainsi, des modifications de la séquence protéique des ALPs et des APNs apparaissent comme de bons candidats de la résistance spécifique à chaque toxine. Néanmoins, tous ces résultats restent spéculatifs et nécessitent d'être validés par des approches de validations fonctionnelles.

Nous avons vu dans cette étude qu'avec 5 générations de sélections au *Bti* supplémentaires, les niveaux de résistances aux toxines séparées ainsi qu'au *Bti* ont peu évolué, confirmant le rôle de Cyt1Aa dans le retardement de l'évolution de la résistance (Wirth et al., 2005). En outre, on remarque que très peu de modifications (SNPs ou altération de l'expression) des récepteurs potentiels sont partagées avec les souches résistantes à une toxine Cry. Etant donné que la toxine Cyt1Aa peut servir de récepteur non spécifique aux toxines Cry (Elleuch et al., 2015; Pérez et al., 2005), la sélection de la modification des récepteurs n'est apparemment pas avantageuse pour mieux résister au *Bti*. Même si l'évolution de la résistance au mix de toxines semblait faciliter le développement de résistance aux toxines Cry (Article

1), il semble que le rôle de la pré-sélection soit fortement atténué par la présence de Cyt après plusieurs générations. Les niveaux de résistance des souches sélectionnées à une toxine étant plus forts, il faudrait mélanger à nouveau ces souches et les sélectionner au *Bti* pour voir si des mécanismes quasiment fixés peuvent faciliter le développement de résistance au *Bti*

Le fait que les souches résistantes à une toxine Cry développent une résistance plus forte à leur toxine de sélection (de 80 fois pour LR11 à plus de 10.000 fois pour LR4A) qu'aux autres toxines (de 5.5 fois pour LR4A à Cry11Aa jusqu'à 48 fois pour LR4B à Cry4Aa) indique que les toxines Cry ont des mécanismes d'action spécifiques. Les différentes toxines Cry exercent donc des pressions de sélection multiples rendant plus difficiles l'apparition de résistance au *Bti*. De plus, la difficulté d'obtenir de forts niveaux de résistance au *Bti* pour chaque souche sélectionnée aux toxines Cry séparément et au *Bti* nous indique que le *Bti* est un insecticide au mode d'action complexe rendant difficile l'apparition de résistance en population naturelle. La mesure de certains traits d'histoire de vie confirme le coût de la résistance au *Bti* et aux toxines séparées. S'il y a apparition de résistance en population naturelle, la fitness plus élevée chez les individus sensibles que chez les individus résistants en l'absence d'insecticide pourrait permettre de faire baisser la résistance après quelques générations sans traitement.

Chapitre 2 : Part de l'induction dans la résistance

I. Contexte de l'étude

Plusieurs mécanismes ont été décrits en réponse à une intoxication par des toxines Cry et/ou par des sous-espèces de *Bt* chez les insectes sensibles aux toxines et au Bt. Parmi eux, l'induction de la réponse immunitaire a été proposée comme jouant un rôle dans la défense contre une infection au Bt chez les lépidoptères, les coléoptères et les nématodes (Contreras et al., 2015; Grizanova et al., 2014; Treitz et al., 2015; Yang et al., 2015). Aussi, l'implication de l'activation de la voie de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) dans la défense cellulaire contre les toxines Cry a été démontrée chez Caenorhabditis elegans, M. sexta, et A. aegypti (Cancino-Rodezno et al., 2010; Huffman et al., 2004). Chez une souche sensible de Plutella xylostella, il a été démontré que l'induction de cette voie de signalisation après exposition à Cry1Ac permet une meilleure tolérance à la toxine en régulant l'expression d'ABC transporteurs et d'une ALP impliqués dans la fixation de la toxine (Guo et al., 2015a). Aussi, après exposition aux toxines Cry, plusieurs insectes ont montré une variation dans l'expression de plusieurs classes de gènes (cadhérines, ALPs, APNs et ABC transporteurs) potentiellement impliqués dans la fixation des toxines (Lei et al., 2014; Yao et al., 2014; Nanoth Vellichirammal et al., 2015; van Munster et al., 2007). Il a été suggéré chez Choristoneura fumiferana exposé à Cry1Ab et O. nubilalis exposé à Cry1F que la sous-transcription d'APNs pouvait être un mécanisme inductible et spécifique de défense de l'organisme pour limiter la fixation des toxines (Nanoth Vellichirammal et al., 2015; van Munster et al., 2007).

Les mécanismes inductibles, très documentés chez les insectes phytophages, permettent notamment de réduire les coûts de métabolisation des composés secondaires des plantes (Després et al., 2007). Concernant les insecticides chimiques, plusieurs études ont montré une induction d'enzymes de détoxication (P-450), en réponse à l'exposition aux insecticides, plus fortes chez les insectes résistants que chez les insectes sensibles à l'insecticide (Baek et al., 2010; Liu et al., 2011; Markussen et Kristensen, 2010). La sur-expression constitutive des P-450

pourrait produire des dérivés réactifs de l'oxygène et ainsi induire un stress oxydatif, provoquant l'endommagement des tissus. L'induction de ces enzymes en présence de l'insecticide permet donc de minimiser les coûts associés à la résistance en l'absence d'insecticide (Zangar et al., 2004). Dans le cas de la résistance au Bt, les travaux décrivent majoritairement des modifications de l'expression constitutives (non induites) des protéines impliquées dans la fixation des toxines Cry. Une seule étude à ce jour a comparé la réponse transcriptomique à l'exposition à Cry1F d'une souche d'O. nubilalis sensible et d'une souche résistante à Cry1F. Les résultats montrent que l'exposition de la souche sensible induit la transcription différentielle de plus de 1500 gènes alors qu'elle n'en induit que 109 chez la souche résistante. Parmi les gènes sous-transcrits chez la souche sensible, une APN et un ABC transporteur potentiellement impliqués dans la fixation de Cry1F ne sont pas retrouvés soustranscrits chez la souche résistante. Il a été suggéré que la dose d'exposition utilisée, étant la même pour les deux souches, ne permet pas d'infliger des dommages aux cellules expliquant la faible réponse de la souche résistante. Pour analyser le rôle de l'induction dans la résistance au Bti et aux toxines Cry, nous avons choisi d'exposer la souche sensible au *Bti* pour identifier des gènes dont la transcription est modifiée. Ensuite, nous avons mesuré la réponse de ces gènes suite à l'exposition des souches résistantes pour comparer leur réponse à l'induction avec la souche sensible (Article 3).

II. Article 3

Renaud Stalinski, Frédéric Laporte, Laurence Després, Guillaume Tetreau

Alkaline phosphatases are involved in the defense response of *Aedes aegypti* larvae to intoxication with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins.

Article soumis à Environmental Microbiology

Contribution : J'ai conçu le plan expérimental, réalisé les manipulations présentées dans cet article et analysé les données. J'ai rédigé l'article.

Dans cette étude, nous avons étudié pour la première fois le transcriptome d'une souche sensible en réponse à une exposition au *Bti.* Parmi les gènes différentiellement transcrits, nous avons noté la sous-transcription de 4 ALPs et la sur-transcription de 2 ALPs. Pour déterminer l'implication potentielle de l'induction des ALPs dans la résistance des souches LR4A, LR4B, LR11 et LR3Bti (respectivement sélectionnées à Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et au *Bti*), nous avons mesuré le niveau de transcription de 11 ALPs (85% des ALPs qui s'expriment chez les larves de la souche sensible au stade 4) par RT-qPCR. Nous avons mesuré l'expression constitutive (souches non exposées aux toxines) de ces ALPs et la réponse de chaque souche à l'exposition à sa toxine de sélection (*e.g.* LR4A à Cry4Aa).

Nous avons observé deux groupes d'ALPs basé sur leur profil d'induction. Les ALPs du premier groupe sont plus fortement sous-transcrites chez les souches résistantes à une toxine que chez la souche sensible et la souche sélectionnée au *Bti* après exposition aux toxines Cry ou au *Bti*. Les ALPs du deuxième groupe sont plus fortement sur-transcrites chez la souche sensible et la souche sélectionnée au *Bti* que chez les souches résistantes à une toxine Cry après exposition aux toxines Cry ou au *Bti*. Nous avons montré que la forte induction de la sous-transcription de certaines ALPs chez les souches résistantes à une toxine pouvait participer à la résistance. Enfin, la différence de réponse observée entre les souches sélectionnées à une toxine et la souche sélectionnée au *Bti* pourrait être due au mode d'action particulier de la toxine Cyt.

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2016)



Alkaline phosphatases are involved in the response of Aedes aegypti larvae to intoxication with Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cry toxins

Renaud Stalinski,^{1,2} **Frédéric Laporte**,^{1,2} **Laurence Després**,^{1,2*,‡} **Guillaume Tetreau**^{1,2,†,‡} ¹Laboratoire d'Ecologie Alpine LECA UMR5553, Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France. ²Laboratoire d'Ecologie Alpine LECA UMR5553, Centre National de la Recherche Scientifique, F-38000 Grenoble, France.

Summary

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) is a natural pathogen of dipterans widely used as a biological insecticide for mosquito control. To characterize the response of mosquitoes to intoxication with Bti, the transcriptome profile of Bti-exposed susceptible Aedes aegypti larvae was analysed using ILLUMINA RNA-seq. Gene expression of 11 alkaline phosphatases (ALPs) was further investigated by real time quantitative polymerase chain reaction and ALP activity was measured in the susceptible strain and in four strains resistant to a single Bti Cry toxin or to Bti. These strains were unexposed or exposed to their toxin of selection. Although all resistant strains constitutively exhibited a higher level of transcription of ALP genes than the susceptible strain, they showed a lower total ALP activity. The intoxication with different individual Cry toxins triggered a global pattern of ALP gene under-transcription in all the one-toxin-resistant strains but involving different specific sets of ALPs in each resistant phenotype. Most of the ALPs involved are not known Cry-binding proteins. RNA interference

Received 17 November, 2015; accepted 8 December, 2015. *For correspondence. E-mail laurence.despres@ujf-grenoble.fr; Tel. 33 4 76 63 56 99; Fax 33 4 76 51 42 79. [†]Present address: Université Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Université Montpellier, F-66860 Perpignan, France. [‡]Equal contributions. Originality-significance statement: To our knowledge, this study is the first to report that many Cry toxins produced by Bti select for specific patterns of ALP gene transcription in mosquitoes and that the ALP activity in mosquito guts is not affected by these transcriptional changes. It also shows that exposure of one-toxin-resistant strains to their selection toxin triggers ALP-specific patterns of transcription and different ALP activities in the gut epithelium and in the gut lumen of exposed larvae. Finally, it validates the involvement of an ALP in Bti Cry4Aa toxicity.

experiment demonstrated that reducing ALP expression conferred increased the survival of larvae exposed to Cry4Aa, confirming the involvement of ALP in Cry4Aa toxicity.

Introduction

Mosquitoes are vectors of many severe human diseases such as dengue, yellow fever or malaria, which are causing millions of deaths every year (Tomori, 2004; Enayati and Hemingway, 2010). The reduction of tropical disease outbreaks through mosquito control has long relied on the use of chemical insecticides, but recent alternatives have been developed, including the widely used larvicide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti; Lacey, 2007; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Alphey, 2014).

Bti is a biological insecticide increasingly used worldwide for mosquito control due to its high specificity to mosquitoes and black flies and to its low impact on the environment. Its toxicity is conferred by four main toxins, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa, which are produced as a composite crystal during the sporulation of the bacterium Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Lacey, 2007). Cry toxins are highly toxic to mosquito larvae upon ingestion through a pore-forming mode of action by binding to protein receptors present at the surface of the gut cells membrane (Bravo et al., 2007; Vachon et al., 2012). Four major receptors have been described in mosquitoes to date: cadherins, glycosylphosphatidylinositol (GPI)anchored aminopeptidases N (APNs), GPI-anchored alkaline phosphatases (ALPs) and an □-amylase (Chen et al., 2009; Fernandez-Luna et al., 2010; Likitvivatanavong et al., 2011; Lee et al., 2015). They are mostly located into membrane microdomains called lipid rafts that are enriched in GPI-anchored proteins, glycosphingolipids and sterols (Rietveld et al., 1999; Lingwood and Simons, 2010). Although these proteins have been characterized as receptors in many different insect species for a large range of Bt Cry toxins, their role in the Bt toxins' mode of action is still largely misunderstood (Vachon et al., 2012).

Resistance to Bt Cry toxins has been found in several lepidopteran and coleopteran pests in agricultural and forestry settings (Tabashnik *et al.*, 2013; Gassmann *et al.*,

□ 2015 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd

R. Stalinski, F. Laporte, L. Després and G. Tetreau

2014). Nevertheless, field resistance to Bti in mosquitoes has never been confirmed to date (Tetreau et al., 2013). This is attributed to the number of toxins produced by Bti and to the presence of Cyt toxin, which is known to impede Cry resistance development and to restore Cry toxicity in Cry-resistant mosquito larvae (Georghiou and Wirth, 1997; Wirth et al., 2005; Soberon et al., 2013). Several strains of Aedes aegypti, Culex guinguefasciatus and C. pipiens have been selected with Bti in laboratory to further study the mechanism of action of Bti toxins (Goldman et al., 1986; Georghiou and Wirth, 1997; Saleh et al., 2003; Mittal et al., 2005; Paris et al., 2011). Although only low levels of resistance to Bti (two- to fourfold) were reached, the level of resistance to each individual Bti Cry toxin was always much higher (up to 70-fold) (Paris et al., 2011; Tetreau et al., 2012a). When selected with a single Bti Cry toxin, mosquitoes developed a high level of resistance to their toxin of selection and some levels of cross-resistance to other Cry toxins but always a low level to Bti (Georghiou and Wirth, 1997; Lee et al., 2014; Stalinski et al., 2014). This suggests that mosquito resistance to different Bti Cry toxins involves both specific and shared mechanisms of resistance (Stalinski et al., 2014).

Little is known about the molecular mechanisms involved in the defence response of mosquito larvae when they are challenged with Bti. Only the impact of intoxication with sublethal doses of Cry11Aa toxin on susceptible mosquito larvae has been investigated to date, revealing a potential role of protein folding and trans-regulatory expression pathways (Cancino-Rodezno et al., 2010; 2012; Bedoya-Perez et al., 2013). Similar experiments performed on susceptible Cry1A-intoxicated lepidopterans and Cry3A-intoxicated coleopterans highlighted the influence of various mechanisms, including metabolic enzymes, stress-related proteins and trans-regulatory expression pathways (Meunier et al., 2006; van Munster et al., 2007; Oppert et al., 2012; Yao et al., 2012; Contreras et al., 2015; Guo et al., 2015). To our knowledge, the impact of larval intoxication with Cry4Aa and Cry4Ba toxins has never been investigated to date. Moreover, the inducible response of resistant insects to a challenge with Bti and with individual Bti Cry toxins is yet to be elucidated.

In the present study, we first investigated the response of a laboratory-susceptible strain of *A. aegypti* (Bora-Bora strain) to intoxication with a sublethal dose of Bti by using high throughput RNA-seq analysis. The transcription of ALP genes was strongly affected by a Bti challenge. The transcription level of 11 ALP genes was further investigated by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) on five strains of *A. aegypti*: one susceptible strain (Bora-Bora), three strains resistant to a single Bti Cry toxin (LR4A, LR4B and LR11 resistant to Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa respectively) and one Bti-selected strain (LR3Bti). The constitutive (unexposed larvae) and the inducible (larvae exposed to their toxin of selection) ALP gene expression and activity patterns were investigated in these strains to provide insights into the role of ALPs in the response to a Bti Cry toxin challenge. Finally, the involvement of an ALP in the defence response was validated by RNA interference.

Results

RNA-seq analysis suggests a role for lipid rafts and ALPs in the mosquito response to a Bti Cry toxins challenge

The transcriptomes of susceptible A. aegypti larvae exposed or not to Bti were compared by high throughput Illumina RNA sequencing analysis (RNA-seq). A total of 302 469 666 short reads (100 bp) were sequenced and filtered based on sequence quality (84.5% left; Table S1). Approximately 71% of the reads sequenced were mapped to the A. aegypti genome (Table S1). Among the 12 285 transcripts selected for the analysis (coverage > 0.5 RPKM, reads per kilobase per million mapped reads, in at least one condition) (Table S2), 439 (3.6%) were differentially transcribed (more than twofold over- or undertranscription and P < 0.05; Table S3), with a similar number of genes over- (232) and under-transcribed (207) (Fig. 1). Among the genes over-transcribed, the 'Intra or extracellular trafficking/chaperonins' category was overrepresented in Bti-exposed as compared with unexposed susceptible larvae (Fig. 1), including four hexamerin 2-Beta 14- to 33-fold overexpressed, two of which are located in lipid rafts (Table S2). More generally, genes located in lipid rafts were over-represented in over-transcribed genes, including two ALPs 3.6- to 3.9-fold over-transcribed (AAEL011175 and AAEL015070; Table S2). Among the genes under-transcribed, the 'Bti candidate' and 'Detoxification' categories were over-represented (Fig. 1). Among the Bti-candidate genes (genes encoding enzymes potentially involved in protoxin activation or putative toxin receptors), four ALPs (AAEL003286+AAEL003317, AAEL003905, AAEL003297, AAEL003289) were under-transcribed $(\Box 2.94$ - to $\Box 5.03$ -fold), together with one \Box -amylase (AAEL008451; 2.92-fold), one serine-type endopeptidase (AAEL008206; 3.93-fold) and one trypsin (AAEL002273; 5.93-fold). The transcription level of APN and cadherin genes was not affected by Bti exposure. The differential transcription (either 'up' or 'down') of nearly all ALP genes upon Bti intoxication in the susceptible Bora-Bora strain prompted us to examine the transcription level of ALP genes in the susceptible strain exposed to each Bti Cry toxin and to Bti, and in each of the four resistant strains unexposed and exposed to their toxin of selection (Fig. S4).



Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 3

Fig. 1. Biological functions (A) of all transcribed genes detected and (B) of genes over-transcribed and (C) under-transcribed in susceptible larvae exposed to Bti as compared with unexposed larvae. (D) The number of genes located in the lipid rafts is indicated for each category (total, over- and under-transcribed) together with the total number of genes detected for each category. Statistically significant changes in the proportion of each category of gene in the differentially transcribed conditions as compared with the one among all transcribed genes are indicated by an asterisk (P < 0.05, Fisher exact test).

High levels of resistance to Bti Cry toxins

The three strains of *A. aegypti* selected for 33 generations with 1 of the 3 Bti Cry toxins exhibiting high levels of resistance to their selection toxin, that is, 1018-fold resistance to Cry4Aa in LR4A, 226-fold resistance to Cry4Ba in LR4B and 70-fold resistance to Cry11Aa in LR11 as compared with the susceptible parent Bora-Bora strain (Table 1, Table S5). Selected strains always exhibited a higher level of resistance to their toxin of selection than to the two other Bti Cry toxins. The three strains had different cross-resistance patterns; LR4A showed little cross-resistance (less than fourfold cross-resistance to Cry4Ba and Cry11Aa), whereas LR4B and LR11 had higher level of cross-resistance (14- to 35-fold) to the two other Bti Cry toxins (Table 1). The composite LR3Bti strain, which was initially composed of 30% of each LR strain +10% of

susceptible strain and was then selected for 14 generations with Bti, exhibited relatively low levels of resistance to Bti Cry toxins (5- to 14-fold) and to Bti (1.4-fold). All strains shared similar low level of resistance to Bti (1.2- to 1.7-fold; Table 1).

ALP gene resequencing reveals a misannotation of the A. aegypti genome

A PCR using two primers for the amplification of an overlapping region between the two ALP genes AAEL003286 and AAEL003317 predicted in Vectorbase revealed that they formed a unique gene encoding a single protein that will be called AAEL003286+AAEL003317 in the present article (Fig. S6). It contained one typical ALP catalytic domain (alkPPc; cd00016) and showed high cDNA and protein sequence similarity with AAEL003297 and

Table 1. Resistance ratios for the four resistant strains to the three Bti Cry toxins and to Bti as compared with the susceptible strain.

		RR₅	0 ^a	RR_{90}^{a}						
	Cry4Aa	Cry4Ba	Cry11Aa	Bti	Cry4Aa	Cry4Ba	Cry11Aa	Bti		
LR4A	1,018.2	2.7	3.4	1.2	91,871.7	34.1	4.1	1.6		
LR4B	33.8	225.9	13.5	1.6	3,332.8	4,225.9	49.4	1.8		
LR11	18.2	35.6	69.7	1.7	336.9	197.6	471.1	3.2		
LR3Bti	13.8	7.6	5.4	1.4	315.2	14.2	5.8	2.0		

For each strain, the resistance ratio to its selection toxin is indicated in bold.

a. Resistance ratios (RR_{50} and RR_{90}) are calculated by dividing the lethal concentration for 50% (LC_{50}) or 90% (LC_{90}) of individuals from the resistant strain by the LC_{50} or LC_{90} of the susceptible strain.

4 R. Stalinski, F. Laporte, L. Després and G. Tetreau

A	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
1. AAEL003298		0.40	0.45	0.70	0.78	0.82	0.82	0.91	0.75	1.16	1.01
2. AAEL003286+AA	EL003317 0.47		0.42	0.69	0.81	0.83	0.83	0.90	0.75	1.16	0.99
3. AAEL003297	0.50	0.49		0.69	0.80	0.81	0.79	0.83	0.73	1.18	1.06
4. AAEL003905	0.78	0.74	0.77		0.76	0.82	0.79	0.87	0.74	1.12	1.03
5. AAEL003313	0.80	0.84	0.82	0.86	/	0.47	0.89	0.98	0.82	1.20	1.09
6. AAEL003289	0.80	0.77	0.75	0.85	0.50		0.82	0.95	0.83	1.19	1.06
7. AAEL013330	0.87	0.82	0.85	0.81	0.85	0.77		0.95	0.81	1.16	1.09
8. AAEL000931	0.97	0.98	0.90	1.03	0.94	0.92	0.72		0.85	1.29	1.13
9. AAEL009077	0.86	0.87	0.76	0.98	0.93	0.86	0.86	1.01		1.11	1.00
10. AAEL011175	1.16	1.26	1.16	1.01	1.18	1.11	1.28	1.31	1.19		0.11
11. AAEL015070	0.98	1.02	1.00	0.96	0.96	0.99	1.07	1.15	1.01	0.10	
В											
1.23Mb											1.29Mb
			Super	rcontig1	.83						
	AAG	E020050	97					A	AGE020	05098	
		4									
AAEL00	03289	AAEL	003298	2		AAEL	003313				
AAEL003317 + AAEL003286											
		\Rightarrow									
	AAEL003297										

Fig. 2. A. Pairwise distance between cDNA (lower left) and protein (upper right) sequences of the eleven ALPs studied using the maximum composite likelihood model (Tamura *et al.*, 2004). Highly similar sequences (<0.5) are highlighted in bold and boxed. B. Graphical representation of the cluster of five ALP genes (six Vectorbase accession number) located on the supercontig1.83 from the *A. aegypti* genome. An arrow indicates the location and the orientation of the gene.

AAEL003298 (Fig. 2A). A similar distance was observed between AAEL003289 and AAEL003313. All these five ALP genes were grouped together in the same 5 Mb long region of the supercontig1.83 (Fig. 2B). The highest sequence similarity was observed between AAEL011175 and AAEL015070 (Fig. 2A), which were located on two different supercontigs (1.548 and 1.1446 respectively).

Over-transcription of ALP genes in unexposed resistant larvae

The transcription of 11 ALPs significantly differentially transcribed in RNA-seq analysis and/or known as Cry toxins-binding proteins was assessed by RT-qPCR. The ALPs tested tended to be over-transcribed in the unexposed resistant strains as compared with the unexposed susceptible strain, except for AAEL013330, which was the only significantly under-transcribed gene in LR4B (Figs 3, Fig. S4). As compared to the susceptible strain, LR3Bti, LR4A, LR4B and LR11 exhibited higher transcription level for 8, 8, 5 and 7 ALP genes respectively (Fig. 3). AAEL003289, AAEL009077 and AAEL015070 had high transcription level in all the four resistant strains (Fig. 3).

The strains resistant to one toxin exhibit specific patterns of ALP gene expression in response to exposure to their selection toxin

To evaluate the specific response of each resistant strain when exposed to its selection toxin, the transcrip-

tion level of each ALP gene in the exposed strain was divided by its level in unexposed larvae from the same strain (Fig. S4). Based on their expression profiles, the exposed strains were categorized in two distinct clusters: one grouping the strains resistant to a single Bti Cry toxin (LR4A, LR4B and LR11) and another one grouping the LR3Bti-resistant strain and all the exposure conditions of the susceptible Bora-Bora strain (Fig. 4). The hierarchical clustering of the ALP genes also contrasted two main groups. The first cluster (cluster A) was composed of six genes (AAEL003298, AAEL003286+ AAEL003317, AAEL003905, AAEL003297, AAEL003313 and AAEL003289) generally downregulated and significantly under-transcribed in at least one strain resistant to one toxin. Five out of the six ALPs from this cluster are located on the same supercontig in the A. aegvpti genome (Fig. 2B). The other gene cluster (cluster B) was grouping three ALPs (AAEL009077, AAEL011175 and AAEL015070) significantly over-transcribed only in the exposed susceptible and LR3Bti strains, except for AAEL015070, which was also significantly overtranscribed in LR4A and LR4B (Fig. 4). Two genes were not assigned to cluster A or B: AAEL013330 was downregulated only in exposed susceptible larvae, and AAEL000931 was downregulated in exposed one-toxinresistant strains but upregulated upon Bti exposure (Bora-Bora and LR3Bti strains). A good correspondence was observed between the clustering of the ALP genes based on their expression profile upon induction by Bti Cry toxins and the phylogenetic analysis of ALPs based



Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 5

Fig. 3. Transcription level of the 11 ALP genes in unexposed LR3Bti (white), LR4A (light grey), LR4B (dark grey) and LR11 (black) relative to unexposed susceptible Bora-Bora strain. Statistical difference is indicated by an asterisk above the bar (P < 0.05, Wilcoxon test, n = 3). Error: standard error.

on their protein sequences (Fig. 4): more similar ALPs tend to be similarly induced by Bti toxins.

The magnitude of response to a Bti toxin challenge associated with each resistance phenotype was calculated as the level of expression in each exposed resistant strain as compared with the level in the susceptible strain exposed to the same toxin (Fig. S4). When exposed to Bti, the Bti-selected strain (LR3Bti) exhibited a significantly higher level of gene transcription for 7 out of the 11 ALP genes tested than the Bti-exposed susceptible strain (Table 2). In contrast, the level of expression of several under-transcribed ALP genes from cluster A in the strains resistant to one toxin was lower than in the susceptible strain exposed to the same toxin. One of the most strongly repressed gene was AAEL003286+AAEL003317 in LR4A upon Cry4Aa exposure (Table 2). Only AAEL009077 had a higher transcription level in all the exposed resistant strains as compared with the exposed susceptible strain; AAEL013330, AAEL011175 and AAEL015070 exhibited higher level of expression in Cry4Aa-exposed LR4A and Bti-exposed LR3Bti than in the exposed susceptible strain, whereas it was lower in LR4B and LR11 exposed to their selection toxin (Table 2).

Resistance to one toxin affects ALP activity in the gut and gut lumen

The total ALP activity and activity in the gut lumen were not significantly affected by Bti or Cry toxin exposure in the susceptible strain (Fig. 5). Although ALP genes were constitutively over-transcribed in all one-toxin-resistant strains, as compared with constitutive transcription levels in the susceptible strain (Fig. 3), global ALP activity was lower (32–39% decreased ALP activity in all strains but LR11 with a non-significant 10% decrease) (Fig. 5A), whereas ALP constitutive activity in the gut lumen was significantly higher in LR4A (+29%) and lower in LR4B (\Box 44%) (Fig. 5B). The exposure to their selection toxin induced a significant decrease of total ALP activity only in LR11 strain (\Box 21%) (Fig. 5A) and of the ALP activity in the gut lumen in LR4A (\Box 75%), LR4B (\Box 43%) and LR11 (\Box 38%) (Fig. 5B). The activity of gut APNs, another category of GPI-anchored potential Bt-receptors located in lipid rafts, was not significantly different in any of the conditions tested (Wilcoxon test, P > 0.05; Fig. S7).

Silencing of an ALP reveals its role in resistance against Bti Cry4Aa toxin

Considering that resistance to Cry4Aa has the highest level reached in the resistant strains studied and that AAEL003286+AAEL003317 is one of the most strongly repressed gene in LR4A upon Cry4Aa exposure, its role in resistance to Cry4Aa toxin was investigated by feeding susceptible larvae with chitosan-encapsulated dsRNA targeting this gene. The silencing of AAEL003286+ AAEL003317 in susceptible larvae induced a significant 14-fold transcription decrease as compared with the two controls (Fig. 6). This under-transcription was associated with a significant 11% decreased mortality after 24 h of exposure to Cry4Aa (from 48% to 37%) (Fig. 6). However, this mortality in AAEL003286+AAEL003317-silenced Bora-Bora larvae was still much higher than the mortality of the LR4A (2%), LR4B (18%), LR11 (11%) and LR3Bti





Fig. 4. Effect of Bti or Cry toxin exposure on the transcription level of 11 ALP genes. Exposure effect is calculated as the ratio between the ALP transcription level in the exposed strain (e.g. LR4A exposed to Cry4Aa) and the one in the same strain unexposed (e.g. LR4A unexposed). The colours range from blue (under-expression) to yellow (over-expression). Significant differential gene expression between exposed and unexposed condition in the same strain is indicated by an asterisk (P < 0.05, Wilcoxon test, n = 3). The strains and the genes are organized following a hierarchical clustering using a Pearson uncentred correlation (average linkage). The phylogenetic tree on the right has been generated by using the neighbour-joining method. Bootstrap values (2000 replicates) are indicated at each node. The correspondence between the gene clustering and the phylogenetic tree is indicated by dotted lines.

(16%) larvae exposed to the same Cry4Aa dose (retrieved from bioassays data, data not shown).

Discussion

Intoxication of susceptible *A. aegypti* larvae with the bioinsecticide Bti induced the differential transcription of genes from three main categories, as shown by RNA-seq analysis. Genes involved in the intra- and extracellular trafficking were generally upregulated, whereas Bti-

candidate genes (putative toxin activators and receptors) and genes encoding detoxification enzymes were downregulated in Bti-exposed mosquitoes.

Lower constitutive transcription level of detoxification enzyme genes was reported in another Bti-selected *A. aegypti* strain (LiTOX strain) as compared with its susceptible parent strain (Bora-Bora strain) and was putatively associated to an energy re-allocation mechanism, involving a trade-off between detoxification enzyme activities and response to Bti selection (Tetreau *et al.*, 2012a;

ated with	resistance								
Table 2.	Magnitude	OT	induction	OT	ALP	gene	transcr	iption	associ-

	LR3Bti	LR4A	LR4B	LR11
AAEL003298	1.23	□1.11	1.10	□1.28
AAEL003286+AAEL003317	2.76	4.52	2.36	1.21
AAEL003905	1.15	2.58	□1.40	□1.61
AAEL003297	2.09	□1.27	1.24	2.11
AAEL003313	1.51	□1.15	1.34	□1.07
AAEL003289	2.54	□1.40	□1.13	□7.01
AAEL000931	2.17	4.93	2.29	□1.04
AAEL013330	2.38	3.80	□1.59	2.47
AAEL009077	1.05	2.04	2.07	1.92
AAEL011175	3.41	2.59	□3.18	□1.64
AAEL015070	1.33	1.56	□1.90	□1.78

A negative value indicates a lower level of ALP gene transcription in the resistant strain than that in the susceptible strain exposed to the same toxin, whereas a positive value indicates a higher level of induction. Statistically significant increased and decreased inducible transcription associated with resistance is indicated in bold (Wilcoxon, P < 0.05, n = 3).

Despres *et al.*, 2014a). Our present study shows that decreased transcription of detoxification genes is not only a long-term result of Bti selection, but also a short-term response of mosquito larvae to Bti exposure. In line with



Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 7

this, UV-exposed mosquitoes (Bora-Bora strain) exhibited higher levels of detoxification activities and were more susceptible to Bti toxins (Tetreau *et al.*, 2014), suggesting a metabolic compensation between detoxifying activity and susceptibility to Bti.

Among the over-transcribed genes involved in the intraand extracellular trafficking, four hexamerins were identified. An increased production of hexamerins was observed in Helicoverpa armigera larvae exposed to sublethal doses of Cry1Ac, resulting in an aggregation reaction with the toxin supposedly to inactivate it (Ma et al., 2005). In the mosquito C. quinquefasciatus, hexamerins have been associated with resistance to Bacillus sphaericus, but their role in response to Bti toxins is yet to be understood (Poopathi et al., 2014). Genes located in lipid rafts were over-transcribed after Bti exposure. Among many other functions, lipid rafts were shown to be preferential insertion sites for many bacterial toxins, including Bti Cry toxins (Bayyareddy et al., 2012). Exposure to Bti toxins may trigger lipid raft turnover through upregulation of the genes encoding lipid raft proteins. Among the 13 Bti-candidate genes differentially transcribed upon Bti exposure, 6 were ALPs. Most of them are

> **Fig. 5.** (A) total ALP activity (gut + lumen) and (B) ALP activity in the gut lumen of the susceptible Bora (hatched) and resistant strains LR3Bti (white), LR4A (light grey), LR4B (dark grey) and LR11 (black) exposed to Bti, to one of the three Cry toxins and/or not exposed (NE). A significant difference (P < 0.05) between exposed and unexposed individuals from the same strain is indicated by an asterisk between the bars. A significant difference between an unexposed resistant strain and the unexposed susceptible strain (Bora) is indicated by a number sign above the bar. Error: standard error.

□ 2015 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, Environmental Microbiology

8 R. Stalinski, F. Laporte, L. Després and G. Tetreau



Fig. 6. (A) Expression of AAEL003286+AAEL003317 ALP gene and (B) percentage of mortality of larvae exposed 24 h to Cry4Aa. Bioassays were performed on larvae from the susceptible Bora-Bora strain untreated (control, white) or fed with chitosanencapsulated LacZ dsRNA (grey) or with chitosan-encapsulated dsRNA targeting the AAEL003286+AAEL003317 ALP gene (black). Significance was tested by a Wilcoxon test (**P* < 0.05; *n* = 3) for ALP gene expression and by an ANOVA (**P* < 0.05; *n* = 11) for larval mortality. Error: standard error.

located into lipid rafts in which Bt toxins are known to preferentially bind and form pores (Bayyareddy *et al.*, 2012; Vachon *et al.*, 2012). Considering that ALPs have been described as potential Cry toxin receptors in lepidopterans and dipterans (Fernandez *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes and Adang, 2007; Jimenez *et al.*, 2012), we decided to focus on 11 ALPs differentially expressed in the RNAseq analysis and/or described as toxin-binding proteins.

Although resistance to Bti and to each toxin was associated to a constitutive increased transcription of almost all ALP genes in whole larvae, this was associated with a decrease of total activity of ALPs in the gut. Given that ALPs are mainly expressed in the midgut of insects (Terra and Ferreira, 1994), this lack of correspondence between ALP transcription level and total ALP activity is surprising and suggests either that ALP alleles selected in resistant strains produce less efficient enzymes, or that posttranscriptional mechanisms suppressing ALP activity are at play in these strains. Interestingly, a lack of correspondence between ALP transcription level and protein quantity in brush border membrane of the midgut was previously reported in another Bti-resistant A. aegypti strain (LiTOX strain): over-transcribed ALPs were either not identified as differentially expressed (AAEL000931, AAEL009077 and AAEL015070) or identified as under-expressed (AAEL03313) by a Differential In Gel Electrophoresis (DIGE) approach, suggesting that the lower ALP protein abundance in the epithelium membrane might be due to post-translational events (Tetreau et al., 2012a). An increased ALP expression was also found in Cry1Abresistant Ostrinia nubilalis (Khajuria et al., 2009; Oppert et al., 2012), but a decreased ALP expression was found in another Cry11Aa-resistant A. aegypti strain (Lee et al., 2014). Both a low ALP transcription level and ALP activity were associated to Cry1A resistance in several independent field and laboratory Bt-resistant lepidopteran strains (Jurat-Fuentes et al., 2011). The lack of a consistent link between ALP transcription level and ALP activity observed among the few investigated Bt-resistant insects suggests that alteration of the ALP involved in Bt resistance (e.g. toxin-binding site) may or may not impact the enzymatic activity of the protein. Exposure to Bti and to Bti toxins reduced total ALP transcription in resistant mosquitoes to reach a transcription level similar to the one observed in unexposed susceptible individuals but with a lower ALP activity. In contrast, an increased ALP transcription was found in Tenebrio molitor challenged with Cry3Aa (Khajuria et al., 2009; Oppert et al., 2012). Altogether, this suggests that the ALPs expressed in the A. aegypti-resistant strains are less active than in the susceptible strain and that the ALP over-expression observed could be the consequence of a metabolic compensation to maintain ALP activity to a viable level. Systematic sequencing of catalytic domains of ALPs from each resistant strain will allow identifying potential non-synonymous mutations that could affect their activity.

An alternative hypothesis regarding the role of GPIanchored receptors in Bt resistance has been proposed to explain the increased expression but lower levels of ALP observed in the gut of Bt-resistant Helicoverpa zea caterpillars: the ALPs produced in the midgut cells are secreted in the gut lumen to 'sequester' the Bt toxin and reduce toxin binding, participating in resistance (Caccia et al., 2012). Interestingly, we observed in LR4A unexposed larvae a significant decrease of total ALP activity together with an increase of ALP activity in the gut lumen, which could indicate the existence of such mechanism of ALP shedding in the gut lumen in this Cry4A-resistant mosquito strain. However, exposure of LR4A to Cry4Aa induced a strong decrease of ALP activity in the gut lumen. If ALP shedding was an inducible resistance process to toxin exposure, one would expect that exposure to Cry4Aa would trigger an increase of their activity in

the gut lumen, as it was observed in Lymantria dispar larvae exposed to Cry1 and Cry2 toxins (Valaitis, 2008) and in Spodoptera exigua larvae exposed to Cry1Ca toxin (Herrero et al., 2005). Therefore, either this mechanism is constitutive, in which the ALPs already present in the gut lumen are in sufficient quantity for efficiently sequestrating the ingested toxin, which results in a reduced ALP activity, or other mechanisms are at play. Another possible explanation for the decrease of global ALP activity observed upon toxin exposure in the three one-toxin-resistant strains is that ALPs secreted in the gut lumen are important for toxin oligomerization and/or toxin insertion in the midgut. This mechanism of 'Bt-boost', which describes the ability of toxin receptors to increase the efficacy of toxins when collectively ingested, has already been described with cadherins synergizing Cry toxicity in lepidopteran and mosquito larvae (Chen et al., 2007; Park et al., 2009) but also recently with ALPs in Cry1Ac-exposed H. armigera larvae (Chen et al., 2015). Therefore, an inducible decrease of the expression of several ALP genes upon toxin exposure could reduce ALP quantity and activity in the gut lumen resulting in a reduced toxicity of ingested toxin to resistant larvae. Experiments of co-ingestion of toxins and purified ALPs must be performed to further validate/infirm this hypothesis in resistant larvae.

When exposed to their selection toxin, the three strains resistant to one toxin (LR4A, LR4B and LR11) exhibited patterns of ALP expression very different from the exposed susceptible individuals, and they formed a clearly distinct group in the hierarchical clustering analysis. Although they shared similar global patterns of ALP downregulation, they differed in the specific ALP genes involved. This suggests that all Bti Cry toxins alter the expression of ALP genes but that the genes affected are different depending on the toxin. Interestingly, not only one specific ALP has been identified as differentially induced, but this is rather a different set of three to six ALP genes that characterize the response to intoxication in each resistant phenotype. This can explain the different levels of resistance observed in the different strains and the asymmetrical cross-resistance patterns observed between Cry4Aa and the other Bti Cry toxins. Indeed, LR4A is highly resistant to Cry4Aa but very little crossresistant to Cry4Ba and Cry11Aa, suggesting that the mechanisms of Cry4Aa resistance evolved in this strain, and potentially the set of ALP genes involved, are very specific. The resistance to Cry4Ba provides high level of cross-resistance to Cry4Aa and to a lesser extent to Cry11Aa, which suggests that some of the genes of Cry4Ba resistance, potentially ALPs, can effectively reduce Cry4Aa and Cry11Aa toxicity to larvae but that they are not the primary selected Cry4Aa- and Cry11Aaresistance genes in LR4A and LR11 strains respectively. These results suggest that resistance to individual Bti Cry

Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 9

toxins is not monogenic but multigenic and that different sets of resistance genes can be selected in different lineages: even in laboratory strains with a common genetic background (the susceptible Bora-Bora strain) but different selection pressures (each individual Bti Cry toxin), a given resistance phenotype (e.g. resistance to Cry4Aa) can be reached by different evolutionary pathways. This is supported by the RNA interference experiment, which showed that AAEL003286+AAEL003317 ALP gene was only partially involved in the resistance evolved against Cry4Aa in LR4A. Indeed, although its silencing in the susceptible strain conferred a higher tolerance to Cry4Aa, demonstrating its role in Cry4Aa toxicity, the susceptibility of silenced larvae to Cry4Aa was higher than that observed in LR4A or even in LR4B larvae exposed to Cry4Aa. This particular ALP may act in concert with other proteins, including other ALPs or APNs, to reach the level of Cry4Aa resistance observed in LR4A and in LR4B.

Several ALPs have been described to bind Bti Cry4Ba and Cry11Aa toxins in A. aegypti, including AAEL000931 and AAEL009077 for Cry4Ba and Cry11Aa, and AAEL003298, AAEL003313 and AAEL015070 for Cry4Ba (Fernandez et al., 2006; Bayyareddy et al., 2009; Fernández et al., 2009; Dechklar et al., 2011; Likitvivatanavong et al., 2011). Receptors to Cry4Aa have not been characterized yet, but Cry4Aa is known to share some binding proteins with Cry4Ba and Cry11Aa (Moreira Beltrao and Neves Lobo Silva-Filha, 2007). Unexpectedly, several of these putative Bti toxin receptors were either not differentially transcribed or over-transcribed upon exposure to Bti and to Cry toxins in the present study. For example, AAEL009077 was shown to be a functional receptor for Cry4Ba and Cry11Aa by RNA interference in A. aegypti larvae (Jimenez et al., 2012), but it was overtranscribed in the susceptible strain exposed to Bti and to Cry toxins in the present study. On another hand, AAEL03298 and AAEL003313 were downregulated in Bora-Bora and in LR11 exposed to Cry11Aa, as expected for a Bti-toxin receptor. Interestingly, several ALPs that were shown to have low affinities with Cry4Ba and Cry11Aa were also found to be downregulated upon Bti and/or Bti toxin exposure, and to differ in their constitutive expression between the different selected strains. However, the Cry4A toxin has been much less studied than other Cry toxins for its binding affinities with putative receptors, and these ALPs might be receptors for Cry4Aa. Furthermore, higher binding affinity does not correlate with higher toxicity (Moreira Beltrao and Neves Lobo Silva-Filha, 2007). Consistent with our results, the altered constitutive expression of non-toxin-binding ALPs has also been evidenced in another Cry11Aa-resistant A. aegypti strain (Lee et al., 2014). The specific toxin-binding affinity and the precise role of each ALPs in the Bti mode of action and in induced response to toxin intoxication require further investigation.

10 R. Stalinski, F. Laporte, L. Després and G. Tetreau

The Bti-selected strain (LR3Bti) exposed to Bti exhibited a similar pattern of ALP gene induction as the susceptible strain exposed to Bti and to Cry toxins. Although it was selected with Bti from a pool of one-toxin-resistant and -susceptible individuals (Stalinski et al., 2014), the LR3Bti strain does not seem to have conserved the selective advantage of the molecular mechanisms associated with individual Cry toxins resistance. The levels of resistance did not evolved much even after 14 generations of selection with Bti (Stalinski et al., 2014). This may be due to the presence of the Cyt toxin and could explain the low level of resistance observed to Bti and to Bti Cry toxins in this strain, considering that Cyt toxin is known to delay resistance evolution and to restore Cry toxicity to resistant larvae by synergism with Bti Cry toxins (Georghiou and Wirth, 1997; Wirth et al., 2005; Soberon et al., 2013).

The clustering of the ALP genes based on their induction profiles and the one based on their protein sequences were highly similar. This means that the phylogenetically closer, the more similar their regulation of expression. We also pinpointed that the five ALP genes with highly similar sequences and patterns of induction (cluster A) were located on the same supercontig and that they were significantly under-transcribed in toxin-exposed strains resistant to one toxin. Therefore, the expression of the different ALPs present in this region of the genome seems to be regulated by a limited number of regulatory elements, which could explain the patterns observed. Unfortunately, the analysis of a 1 Kb long sequence in the ⁵UTR region of each of these ALP genes did not retrieve any motif that could be linked to ALP regulation (data not shown). Alternatively, an epigenetic modification of this genomic region, such as the opening of the chromatin by acetylation, could explain the higher flexibility in the modulation of the expression of these ALP genes in the resistant strains (Swaminathan et al., 2012). Moreover, trans-regulatory systems, such as the mitogen-activated protein kinase signalling pathway, have recently been implicated in ALP trans-regulation in Cry1Ac-resistant insects (Guo et al., 2015) and could be involved in mosquito larval defence against Cry toxins intoxication (Cancino-Rodezno et al., 2010). Characterizing the epigenome and trans-regulatory pathways of the resistant strains and correlating them with the expression patterns obtained in the present study will help understanding the complex regulation of ALPs expression and its consequence on the resistance phenotypes (Vandegehuchte and Janssen, 2014).

Altogether, these results revealed that one-toxinresistant mosquitoes respond to a Cry toxin challenge by a complex multigenic process involving different sets of ALP genes, among which most have not been described as Cry-binding proteins. They show that the ALP gene induction profile of Bti-selected insects is closer to the susceptible than to the one-toxin-resistant individuals, probably due to the presence of Cyt toxin in the toxin mixture used for selection of LR3Bti. This highlights that the high expression regulation capacity of ALPs makes them important proteins in the rapid and specific response to a Bti toxin challenge. Further investigation of their exact role in the resistance phenotypes, of the molecular basis of the regulation of their expression (e.g. regulatory elements, epigenetic processes) and of the other proteins that may act in concert with them (e.g. APNs), will allow deciphering the complex mechanisms of resistance developed against Bti Cry toxins in mosquitoes.

Experimental procedure

Production of Bti and individual Bti Cry toxins

We used a crystal negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (4Q2-81) transformed with the plasmids pHT606, pHT618 or pWF53 to produce Bti Cry toxins separately (Delecluse *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2001). Spore and crystal suspensions were produced and quantified as previously described (Tetreau *et al.*, 2012a). To avoid any formulation effect, Bti was produced following the same protocol as individual Cry toxins by using commercial Bti (Vectobac WG) as the inoculum as previously described (Tetreau *et al.*, 2012b).

Mosquito strains

Five strains of A. aegypti were used in the present study. The A. aegypti laboratory Bora-Bora strain, susceptible to all insecticides, was used for selection using Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa toxins during 33 generations to obtain the LR4A, LR4B and LR11 strains respectively (Stalinski et al., 2014). A composite strain (LR3) was created by mixing together an equal amount of adults from each LR strain (30% each) at the generation 18 and 10% of adults from the susceptible Bora-Bora strain. This composite strain was then selected during 14 generations with unformulated Bti to obtain the LR3Bti strain (Stalinski et al., 2014). Mosquito breeding and selection were performed in standard insectary conditions (27°C, 14/10 h light/dark period, 80% relative humidity) as previously described (Tetreau et al., 2012a). The levels of resistance of all strains to each of the three Cry toxins and to Bti were measured by a bioassay. Larvae from each strain were exposed to six concentrations of a product for 24 h to obtain 5–95% mortality. Bioassays were performed according to the standard bioassay procedure described by the World Health Organization (WHO, 2005). Lethal dose for 50% (LD₅₀) and 90% (LD₉₀) individuals were calculated using a probit statistical model with the module 'dose' of XLSTAT v.2013 (Addinsoft). Resistance ratios (RR₅₀ and RR₉₀) were calculated by dividing LD₅₀ and LD₉₀ of the strain tested by LD₅₀ and LD₉₀ of the reference Bora-Bora strain.

RNA-seq analysis

Larvae from the Bora-Bora strain were either not exposed or exposed to unformulated Bti to obtain 30% of mortality

(195.3 g ml¹¹ of spore/crystal suspension). For each condition, total RNA was extracted from three biological replicates, consisting of 40 larvae (alive), using 'absolutely RNA' miniprep Kit (Agilent) following manufacturer's instructions. RNA guantity and quality were assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). cDNA libraries were prepared from total RNA using the Illumina TruSEQ RNA-Seq kit (Illumina) and sequenced on an Illumina HiSEQ 2000 at Beckman Coulter Genomics facilities. The obtained reads of 100 bp were first filtered using the software TRIMMOMATIC version 0.33 with the following parameters: leading: 30; trailing: 30; slidingwidow: 10:30; min_length: 80 (Bolger et al., 2014). The TOPHAT algorithm release 2.1.12 (https://ccb.jhu.edu/software/tophat) was run with default parameters to align all reads on the A. aegypti reference genome AAEGL2.2 (available at http://aaegypti .vectorbase.org) by taking into account both already known and novel ab initio splice exon-exon junctions (Trapnell et al., 2009). The aligned reads were then filtered on mapping quality (alignment score D97 and removal of non-primary multiple mapped reads) using the software GENESPRING NGS version 12.5 (Agilent). The A. aegypti genome was then re-annotated based on reads distribution and RPKM were calculated for each known or new putative transcript using default parameters. Transcripts with RPKM > 0.5 in at least one strain were retained for differential transcription analysis. Differential transcription level was tested for each transcript between each condition (unexposed vs exposed) using a Mann-Whitney U test. Genes with P < 0.05 and a twofold over- or undertranscription were considered differentially transcribed. All the transcripts were assigned to ten categories based on their annotation as follows: 'Bti candidate', which includes 103 serine proteases potentially involved in Cry toxin activation and 77 putative toxin receptors (39 APNs, 14 ALPs, 12 -amylases and 12 cadherins), 'Other enzymes', 'Cuticle', 'Immunity', 'Hormones and neurotransmitters', 'Transcription factors', 'Intra or extracellular trafficking/chaperonin', 'Structure' and 'Unknown'. Over-representation of categories in under- or over-expressed genes was tested using a Fisher exact test (P-value < 0.05) performed using the software R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2007). In addition, genes were localized in lipid rafts when the corresponding protein was previously experimentally identified as belonging to the lipid rafts according to (Bayyareddy et al., 2012).

ALP re-annotation and phylogenetic analysis

The cDNA prepared from RNA extracted from unexposed Bora and prepared for RT-qPCR analysis were used to amplify the region overlapping between AAEL003286 and AAEL003317 by PCR. Forward primer was designed in the last exon (3 end) of AAEL003286 (5 GGGGGAGGTCGAAGAGAGTT-3) and the reverse primer was designed in the first exon (5 end) of AAEL003317 (5 AACAGTTGCAGGAAACCGGA-3). The PCR product was sequenced at Beckman Coulter Genomics facilities. Its sequence was aligned with the cDNA sequence of the two genes (AAEL003286 and AAEL003317) downloaded from Vectorbase and used to generate a consensus sequence of AAEL003286+AAEL003317 cDNA. Conserved features (catalytic domains and sites) were identified in the consensus sequence by searching against the Conserved Domains Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)

Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 11

(Marchler-Bauer *et al.*, 2011). This consensus sequence was translated to protein sequence using the EXPASY TRANSLATE tool (http://web.expasy.org/translate), and it was used in the phylogenetic analysis together with the 10 other ALPs studied. Protein sequences were aligned by CLUSTALW and the phylogenetic tree was generated by using the neighbourjoining method (Poisson substitution model; uniform substitution rate; gaps/missing data treatment: complete deletion) implemented in MEGA 6.06 software (Tamura *et al.*, 2013). A bootstrap analysis of 2000 replicates was performed to assess the robustness of the tree branches.

RT-qPCR

To further study the implication of ALPs in the response to Bti Cry toxins, RT-qPCR targeting 11 ALP genes were performed on susceptible and resistant larvae unexposed and exposed to Bti and individual Cry toxins. Larvae from the susceptible Bora-Bora strain were exposed to Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and unformulated Bti, whereas larvae from the resistant strains (LR3Bti, LR4A, LR4B and LR11) were exposed to the toxin used for their selection (e.g. Cry4Aa for LR4A). The exposure dose was chosen to reach 50% of mortality for each strain. For each condition, total RNA was extracted from three biological replicates (40 larvae each) using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was obtained from 2 □g RNA using SUPERSCRIPT III reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT20 primers as previously described (Tetreau *et al.*, 2012a).

RT-gPCR were performed following the Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments (MIQE) guidelines on an iQ5 system (Bio-Rad) using the iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions (Bustin et al., 2009). Specific primers were designed for each gene using primer-designing tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) (Table S8). Specificity of each primer pair was tested by a melt curve analysis and by a BLAST search against the Vectorbase database. mRNA expression of ALP genes was normalized using ribosomal protein expression (RPS7 and RPL8) as housekeeping genes using the DCt method (Pfaffl, 2001). Statistical significance of differential gene expression between exposed and unexposed individuals from the same strain was tested using a Mann–Whitney U test with the software R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2007). Three different comparisons were performed from RT-qPCR data (Fig. S4). First, the ratio of constitutive ALP gene expression was calculated by dividing the level of expression in the unexposed resistant strain by the one in the unexposed susceptible strain. Second, the induction of ALP gene expression upon toxin exposure was calculated by dividing the level of expression in a strain exposed to its toxin of selection by the same strain unexposed. Finally, the induction of ALP gene expression associated with resistance was calculated by dividing the level of expression in a resistant strain exposed to its toxin of selection by the level in the susceptible strain exposed to the same toxin. The induction of ALP gene expression in exposed larvae (second comparison) was represented by a heatmap using the software GENE CLUSTER version 3.0 coupled with TREEVIEW version 1.1.6r4 (http:// bonsai.hgc.jp/Imdehoon/software/cluster/software.htm) (de

12 R. Stalinski, F. Laporte, L. Després and G. Tetreau

Hoon *et al.*, 2004). Hierarchical clustering analysis of the strains and of the ALP genes based on their expression profiles was performed (Pearson uncentred correlation; average linkage).

Activity of ALPs and aminopeptidases

ALP and APN activities were measured using p-nitrophenyl phosphate (Sigma Aldrich) and L-leucine-p-nitroanilide (Sigma Aldrich) as substrates respectively (Tetreau et al., 2012a; Lee et al., 2014). Five freshly prepared gut extracts were ground with ALP buffer (100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1.25 mM p-nitrophenyl phosphate) or with APN buffer (20 mM Tricine, pH 8.0, 0.4% methanol, 0.005% bovine serum albumine (BSA), 0.18 mM L-leucine-p-nitroanilide) in a final volume of 200 DL. ALP activity was also monitored in the gut lumen; five freshly extracted guts were added to ALP buffer, homogenized using a vortex for 30 sec and centrifuged at 12 000 g for 10 min at 4°C. The supernatant, containing the secreted proteins from the gut lumen, was used for measuring ALP activity. Protein concentration was quantified by a Bradford assay using BSA as the standard. Reaction mixtures were incubated at 30°C and absorbance was measured every 10 sec during 10 min at 405 nm. Proteolytic activities were expressed in nanomole of product per minute per milligram of total protein (nanokatal, nkat). Statistical difference between strains and exposure condition was tested by a Wilcoxon test (n = 6) performed using the software R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2007).

RNA interference (RNAi) assay

The cDNA prepared from RNA extracted from unexposed susceptible larvae and prepared for RT-qPCR analysis were used to amplify the selected ALP gene (AAEL003286+ AAEL003317). This ALP was chosen because it was dramatically under-transcribed in LR4A upon exposure to Cry4Aa (Fig. 4, Table 2) and because it was constitutively undertranscribed in the LiTOX strain, an A. aegypti Bti-selected strain exhibiting high level of resistance to Cry4Aa (Despres et al., 2014b). The PCR was performed using specific oligonucleotides flanked with T7 promoter that were designed using E-RNAi tool (5 T7- GTGTAGCCGAGTGTCCCATT -3 and ⁵ T7- TTCAGAGGTTCAGAAGTCCAGA -3) (Horn and Boutros, 2010). As a control, DNA from bacteria containing a plasmid with LacZ gene was extracted using plasmid DNA miniprep kit (Invitrogen) and amplified by PCR using two T7 flanked primers designed as described above (5 T7-AGAATCCGACGGGTTGTTACT-3 and 5 T7-AGACACCAC GCTCATCGATAATTT -3]). The PCR products (ALP gene and LacZ control) were purified using the PCR clean-up kit (Invitrogen). In vitro transcription of PCR products was performed with T7 RNA polymerase using HiScribe RNAi transcription kit (New England Biolabs) as reported by the manufacturer to obtain dsRNA. dsRNA was then purified by precipitation with isopropanol and re-suspended in deionized water.

Silencing of the ALP AAEL003286+AAEL003317 gene was performed using the chitosan/dsRNA nanoparticle-mediated RNA interference method described by Zhang and colleagues

(2015) with some modifications. Briefly, chitosan/dsRNA nanoparticules were prepared by mixing together 32 ng of dsRNA (or no dsRNA for the negative control) dissolved in 50 mM of sodium sulfate buffer with 100 mM sodium acetate buffer containing 0.02% of chitosan. After a centrifugation at 13 000 g for 10 min, the pellet containing the nanoparticules was mixed with 6 mg of food and 30 \Box L of pre-melted agarose (2%). Once eggs hatched, 50 larval neonates from the susceptible Bora-Bora strain were fed each day with a quarter of the mixture containing AAEL003286+AAEL003317 dsRNA, LacZ dsRNA (dsRNA control) or no dsRNA (negative control) for a total of 3 days. Three biological replicates were performed for each condition, and for each, total RNA was extracted from a pool of 40 larvae as previously described. The level of AAEL003286+AAEL003317 gene expression was measured by RT-qPCR (Table S8). To ensure that AAEL003286+AAEL003317 was specifically inhibited, the level of expression of three other ALPs phylogenetically close to AAEL003286+AAEL003317 (AAEL003298, AAEL003313 and AAEL003905) was also measured and showed no significant effect of AAEL003286+AAEL003317 dsRNA on their expression (Fig. S9). Significant differences in gene expression were tested by a Wilcoxon test (n = 3) with the software R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2007). To evaluate the effect of dsRNA ingestion on larval tolerance to Cry4Aa a 'diagnostic dose' bioassay was performed consisting in using one concentration of Cry4Aa (n = 11) chosen to obtain 50% of mortality in the control. Significant differences in larval mortality was tested by an ANOVA performed using the software R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2007).

Acknowledgements

The authors want to thank Dr. David Duval and Dr. Jean-Philippe David for fruitful discussion on data analysis. They also thank Lisa Schmitt for her help to measure enzymatic activities. This work and Renaud Stalinski were funded by grant # 010757 02 from the Région Rhône-Alpes (program CIBLE 2012).

References

- Alphey, L. (2014) Genetic control of mosquitoes. *Annu Rev Entomol* **59**: 205–224.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., and 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.
- Bayyareddy, K., Zhu, X., Orlando, R., and Adang, M.J. (2012) Proteome analysis of Cry4Ba toxin-interacting *Aedes aegypti* lipid rafts using geLC-MS/MS. *J Proteome Res* **11**: 5843–5855.
- Bedoya-Perez, L.P., Cancino-Rodezno, A., Flores-Escobar, B., Soberon, M., and Bravo, A. (2013) Role of UPR pathway in defense response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Int J Mol Sci* **14**: 8467–8478.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.

- Bravo, A., Gill, S.S., and Soberon, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**: 423–435.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative realtime PCR experiments. *Clin Chem* **55**: 611–622.
- Caccia, S., Moar, W.J., Chandrashekhar, J., Oppert, C., Anilkumar, K.J., Jurat-Fuentes, J.L., and Ferre, J. (2012) Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5690–5698.
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villasenor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., *et al.* (2010) The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 58–63.
- Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J.I., Lanz-Mendoza, H., Encarnacion, S., *et al.* (2012) Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE* **7**: e37034.
- Chen, J., Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L., Abdullah, M.A., and Adang, M.J. (2007) Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* **104:** 13901–13906.
- Chen, J.W., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberon, M., and Gill, S.S. (2009) *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Biochem J* **424**: 191–200.
- Chen, W., Liu, C., Xiao, Y., Zhang, D., Zhang, Y., Li, X., *et al.* (2015) A toxin-binding alkaline phosphatase fragment synergizes *Bt* toxin Cry1Ac against susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE* **10**: e0126288.
- Contreras, E., Benito-Jardon, M., Lopez-Galiano, M.J., Real, M.D., and Rausell, C. (2015) *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. *Dev Comp Immunol* **50**: 139–145.
- Dechklar, M., Tiewsiri, K., Angsuthanasombat, C., and 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 Biochem Mol Biol* **41**: 159–166.
- Delecluse, A., Poncet, S., Klier, A., and Rapoport, G. (1993) Expression of CryIVa and CryIVb genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillusthuringiensis* subsp *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3922–3927.
- Despres, L., Stalinski, R., Faucon, F., Navratil, V., Viari, A., Paris, M., *et al.* (2014a) Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. *Biol Lett* **10**: 20140716.
- Despres, L., Stalinski, R., Tetreau, G., Paris, M., Bonin, A., Navratil, V., *et al.* (2014b) Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins. *BMC Genomics* **15**: 926.

Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 13

- Enayati, A., and Hemingway, J. (2010) Malaria management: past, present, and future. *Annu Rev Entomol* **55**: 569–591.
- Fernández, L.E., Martinez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J.W., Evans, A., Hernández-Martínez, S., *et al.* (2009) Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti. Biochemistry* **48**: 8899–8907.
- Fernandez, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., and 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., and Miranda-Rios, J. (2010) An alphaamylase 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.
- Gassmann, A.J., Petzold-Maxwell, J.L., Clifton, E.H., Dunbar, M.W., Hoffmann, A.M., Ingber, D.A., and Keweshan, R.S. (2014) Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 5141–5146.
- Georghiou, G.P., and 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). *Appl Environ Microbiol* **63**: 1095–1101.
- Goldman, I.F., Arnold, J., and 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.
- Guo, Z., Kang, S., Chen, D., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., et al. (2015) MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. *PLoS Genet* **11**: e1005124.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J., and de Maagd, R.A. (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6: 96.
- de Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J., and Miyano, S. (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics* **20:** 1453– 1454.
- Horn, T., and Boutros, M. (2010) E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents – 2010 update. *Nucleic Acids Res* **38**: W332–W339.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., and Neill, S.L.O. (2011) *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep* **12**: 508–518.
- Jimenez, A.I., Reyes, E.Z., Cancino-Rodezno, A., Bedoya-Perez, L.P., Caballero-Flores, G.G., Muriel-Millan, L.F., *et al.* (2012) *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochem Mol Biol* **42:** 683–689.
- Jurat-Fuentes, J.L., and Adang, M.J. (2007) A proteomic approach to study Cry1Ac binding proteins and their alterations in resistant *Heliothis virescens* larvae. *J Invertebr Pathol* **95:** 187–191.
- Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R.K., Ning, C.M., Liu, C.X., Wu, K.M., *et al.* (2011) Reduced levels of

^{□ 2015} Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, Environmental Microbiology

14 R. Stalinski, F. Laporte, L. Després and G. Tetreau

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., *et al.* (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.
- Lacey, L.A. (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* **23**: 133–163.
- Lee, S.B., Aimanova, K.G., and Gill, S.S. (2014) Alkaline phosphatases and aminopeptidases are altered in a Cry11Aa resistant strain of *Aedes aegypti. Insect Biochem Mol Biol* **54:** 112–121.
- Lee, S.B., Chen, J., Aimanova, K.G., and Gill, S.S. (2015) *Aedes* cadherin mediates the *in vivo* toxicity of the Cry11Aa toxin to *Aedes aegypti*. *Peptides* **68**: 140–147.
- Likitvivatanavong, S., Chen, J.W., Evans, A.M., Bravo, A., Soberon, M., and Gill, S.S. (2011) Multiple receptors as targets of cry toxins in mosquitoes. *J Agric Food Chem* **59**: 2829–2838.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**: 46–50.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., and 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 Biochem Mol Biol* **35**: 729–739.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., *et al.* (2011) CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39:** D225–D229.
- Meunier, L., Prefontaine, G., Van Munster, M., Brousseau, R., and Masson, L. (2006) Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Mol Biol* **15**: 475–483.
- Mittal, P.K., Adak, T., and 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). *Natl Acad Sci Lett India* 28: 281–283.
- Moreira Beltrao, H.D.B., and 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 Microbiol Lett* **266**: 163– 169.
- van Munster, M., Prefontaine, G., Meunier, L., Elias, M., Mazza, A., Brousseau, R., and Masson, L. (2007) Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Mol Biol* **16:** 25–35.
- Oppert, B., Dowd, S.E., Bouffard, P., Li, L., Conesa, A., Lorenzen, M.D., *et al.* (2012) Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS ONE* **7**: e34624.
- Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., and David, J.-P. (2011) Persistence of *Bacillus thuringiensis*

israelensis (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci* **67**: 122–128.

- Park, H.W., Delecluse, A., and Federici, B.A. (2001) Construction and characterization of a recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* strain that produces Cry11B. J Invertebr Pathol **78**: 37–44.
- Park, Y., Hua, G., Abdullah, M.A.F., Rahman, K., and Adang, M.J. (2009) Cadherin fragments from *Anopheles gambiae* synergize *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba's toxicity against *Aedes aegypti* larvae. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7280– 7282.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Poopathi, S., Thirugnanasambantham, K., Mani, C., Mary, K.A., Mary, B.A., and Balagangadharan, K. (2014) Hexamerin a novel protein associated with *Bacillus sphaericus* resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl Biochem Biotechnol* **172**: 2299–2307.
- R Development Core Team (2007) R: a language and environment for statistical computing [WWW document]. URL http://www.R-project.org.
- Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositollinked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem* **274**: 12049–12054.
- Saleh, M.S., El-Meniawi, F.A., Kelada, N.L., and Zahran, H.M. (2003) Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J Appl Entomol **127**: 29–32.
- Soberon, M., Lopez-Diaz, J.A., and Bravo, A. (2013) Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides* **41**: 87–93.
- Stalinski, R., Tetreau, G., Gaude, T., and Despres, L. (2014) Pre-selecting resistance against individual *Bti* Cry toxins facilitates the development of resistance to the *Bti* toxins cocktail. *J Invertebr Pathol* **119:** 50–53.
- Swaminathan, A., Gajan, A., and Pile, L.A. (2012) Epigenetic regulation of transcription in *Drosophila*. *Front Biosci* **17**: 909–937.
- Tabashnik, B.E., Brevault, T., and Carriere, Y. (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol* **31**: 510–521.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighborjoining method. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 11030–11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725–2729.
- Terra, W.R., and Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes – properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **109**: 1–62.
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C.M., Stalinski, R., Riaz, M.A., Paris, M., *et al.* (2012a) Larval midgut modifications associated with *Bti* resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics* **13**: 248.
- Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J.P., Reynaud, S., and Despres, L. (2012b) Decreased

toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5189–5195.

- Tetreau, G., Stalinski, R., David, J.P., and Després, L. (2013) Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**: 894– 900.
- Tetreau, G., Chandor-Proust, A., Faucon, F., Stalinski, R., Akhouayri, I., Prud'homme, S.M., *et al.* (2014) UV light and urban pollution: bad cocktail for mosquitoes? *Aquat Toxicol* **146:** 52–60.
- Tomori, O. (2004) Yellow fever: the recurring plague. *Crit Rev Clin Lab Sci* **41**: 391–427.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25:** 1105–1111.
- Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J.L. (2012) Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol* **111:** 1–12.
- Valaitis, A.P. (2008) *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 611–618.
- Vandegehuchte, M.B., and Janssen, C.R. (2014) Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 764–765: 36–45.
- WHO (2005) Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wirth, M.C., Park, H.W., Walton, W.E., and Federici, B.A. (2005) Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 185–189.
- Yao, J., Buchman, G.W., Oppert, B., Khajuria, C., and Zhu, K.Y. (2012) Characterization of cDNAs encoding serine proteases and their transcriptional responses to Cry1Ab protoxin in the gut of *Ostrinia nubilalis* larvae. *PLoS ONE* **7**: e44090.
- Zhang, X., Mysore, K., Flannery, E., Michel, K., Severson, D.W., Zhu, K.Y., and Duman-Scheel, M. (2015) Chitosan/ interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. J Vis Exp 97: e52523.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table S1. Sequencing, filtering and read mapping statistics. **Table S2.** List of all the 12 285 transcripts detected by RNAseq with RPKM > 0.5 in at least one condition. For each gene, the accession number, *P*-value, expression level changes, Vectorbase annotation and category are indicated. An additional column indicates genes located in the lipid rafts according to (Bayyareddy *et al.*, 2012).

Table S3. List of the 439 genes significantly (P < 0.05) more than twofold differentially transcribed in the Bora strain exposed to Bti as compared with the unexposed Bora strain.

Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti 15

Genes are classified according to their putative function using 10 functional categories. For each transcript, accession number, *P*-value, expression level changes, Vectorbase annotation and supercontig are indicated.

Fig. S4. Schematic representation of the three comparisons performed from RT-qPCR data. We sequentially compared the constitutive expression of ALP genes between unexposed resistant and susceptible larvae (F3 – Fig. 3 in the article; blue), the induction of ALP gene expression upon toxin exposure within each strain (F4 – Fig. 4 in the article; green) and the magnitude of induction of ALP gene expression associated with the resistance phenotype (T2 – Table 2 in the article; orange).

Table S5. LD_{50} and LD_{90} of the susceptible Bora-Bora and the four resistant strains to the three Bti Cry toxins and to Bti. Fig. S6. Alignment of cDNA sequences of AAEL003286 and AAEL003317, as downloaded from Vectorbase on 10 July 2015, and of the amplicon obtained from the amplification of a region overlapping the two genes. The consensus sequence of the composite AAEL003286+AAEL003317 gene is provided (full cDNA). Mismatches between the 3 part of the AAEL003286 cDNA and the 5 part of the AAEL003317 are indicated as red nucleotides in the AAEL003286 cDNA sequence. SNPs in the amplicon, amplified from the A. aegypti Bora-Bora strain, as compared with the two cDNA sequences from Vectorbase, which are from the A. aegypti Liverpool strain, are indicated as blue nucleotides. The location of the alkaline phosphatase catalytic domain (alkPPc; cd00016) is indicated by two green arrows, the presence of insertions in comparison with the reference catalytic domain (cd00016) is indicated by a green line and the location of the active sites by green boxes in the consensus sequence (full cDNA).

Fig. S7. APN activity in the gut of the susceptible Bora (hatched) and resistant strains LR3Bti (white), LR4A (light grey), LR4B (dark grey) and LR11 (black) exposed to Bti, to one of the three Cry toxins and/or not exposed (NE). No significant difference was found between all conditions (Wilcoxon test, P > 0.05, n = 5). Error: standard error.

Table S8. Primer pairs used for RT-qPCR analyses. For each primer pair, sequence, corresponding gene name and accession number, product length, Tm and optimal annealing temperature used in PCR program are indicated. PCR efficiency and different parameters of the calibration curves (R^2 , slope and y-intercept) are also indicated according to the MIQE guidelines (Bustin *et al.*, 2009). Specificity of each primer pair was first assessed by a BLAST analysis against *A. aegypti* genome and then verified by performing a melt curve analysis. A 'YES' is indicated when the Tm of the PCR product was correct and when the primer pair matched to a unique position in the *A. aegypti* genome.

Fig. S9. Expression of three ALP genes: (A) AAEL003298, (B) AAEL003313 and (C) AAEL003905. RT-qPCR were performed on larvae from the susceptible Bora-Bora strain untreated (control, white) or fed with chitosan-encapsulated LacZ dsRNA (grey) or with chitosan-encapsulated dsRNA targeting the AAEL003286+AAEL003317 ALP gene (black). No significant differences in ALP gene expression was observed (Wilcoxon test, P > 0.05; n = 3). Error: standard error.

^{□ 2015} Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, *Environmental Microbiology*

Chapitre 3 : Rôle de l'immunité dans la résistance au *Bti* et impact de la résistance sur la capacité vectorielle

I. Le système immunitaire des insectes

Le système immunitaire représente l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme pour lutter contre toute intrusion étrangère. Il existe deux types de défenses immunitaires: les défenses innées et acquises. Il a longtemps été considéré que les défenses des invertébrés étaient seulement innées et que l'immunité acquise (basée sur la capacité à reconnaitre un pathogène déjà rencontré) était la marque des organismes plus évolués (Hoffmann, 2003). Or, plusieurs études chez différents insectes ont montré qu'une pré-exposition à un pathogène induit une protection lors d'une seconde exposition (Moreau et al., 2012; Rodrigues et al., 2010). Ce phénomène de défense peut aussi être spécifique du pathogène rencontré la première fois (Roth et al., 2009; Sadd et Schmid-Hempel, 2006). Aussi, il a été montré que cette augmentation de tolérance à certains pathogènes pouvait être transmise à la descendance (López et al., 2014; Moreau et al., 2012), ce phénomène est appelé priming trans-générationnel d'immunité (TGIP). Bien que les invertébrés ne possèdent pas de « mémoire » basée, comme chez les vertébrés, sur des immunoglobulines, les études indiquent que les invertébrés possèdent une défense immunitaire acquise. Néanmoins, les mécanismes moléculaires mis en jeu sont encore mal compris (López et al., 2014; Moreau et al., 2012).

Les insectes sont soumis à divers types d'infections dans la nature (champignons, bactéries, parasites et virus) qui peuvent être localisées sur l'ensemble de l'insecte (surface externe de l'insecte, intestin, système respiratoire, etc.). Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur la réponse immunitaire innée des insectes face à une infection bactérienne et virale par ingestion (Figure 19).



Figure 19 : Réponse immunitaire des insectes en particulier *A. aegypti.* AMP : peptides antimicrobiens ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; PRP : Protéine de reconnaissance des pathogènes

A. Barrières contre l'infection

Les insectes possèdent une variété de caractères morphologiques qui agissent comme barrière à l'infection des pathogènes (Lundgren et Jurat-Fuentes, 2012). Dans l'intestin, la première barrière rencontrée est la membrane péritrophique. La membrane péritrophique est une membrane semi-perméable non cellulaire qui recouvre la lumière intestinale et qui agit comme une barrière contre les abrasions physiques de la nourriture et l'invasion des bactéries et virus (Lehane, 1997). Les pathogènes peuvent envahir l'insecte via l'intestin (1) car ils sont assez petit pour passer à travers la membrane (e.g. certains virus), ou (2) car ils libèrent des composés chimiques ou protéigues qui tuent les cellules qui produisent la membrane (e.g. toxines de Bt) ou la dégradent chimiquement (Lundgren et Jurat-Fuentes, 2012). Une fois cette première barrière contournée les pathogènes rencontrent alors les cellules épithéliales qui produisent une grande variété de peptides antimicrobiens (AMPs) et dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) actifs contre les pathogènes (Buchon et al., 2014). Enfin, la dernière barrière est la lame basale. C'est une membrane non cellulaire localisée à la base des cellules épithéliales. Cette barrière est particulièrement restrictive pour les infections virales. Pour contourner cette barrière, les virus peuvent exprimer des gènes induisant le recyclage de cette lame ou encore produire des molécules (caspase ou fibroblaste) pour la dégrader (Passarelli, 2011).

B. Distinguer le soi du non soi

La première étape dans la réponse immunitaire contre les pathogènes est de distinguer le soi du non soi (*e.g.* pathogène ou matériel abiotique) et du soi altéré (cellules mortes ou infectées) (Kanost et al., 2004; Yu et al., 2002). Pour cela, le système immunitaire tire avantage des molécules associées ou présentes sur les pathogènes (PAMPs) (Hoffmann, 1995). Ces molécules, qui peuvent être spécifiques de certaines classes de pathogènes (bactéries Gram positives ou négatives, virus, etc.) sont ensuite reconnues par des récepteurs (PRPs : protéines de reconnaissance des pathogènes) (Buchon et al., 2014; Strand, 2008) ou par des hémocytes (Figure 19) (Carton et al., 2008; Rodrigues et al., 2010).

C. La réponse humorale

Les peptides solubles et les lysozymes constituent la principale arme que les insectes développent durant la réponse immunitaire humorale face aux pathogènes. Ces peptides antimicrobiens (AMPs) sont impliqués dans les réponses locales et systémiques des insectes (Blair, 2011). L'importance des AMPs dans la réponse immunitaire est reflétée par le nombre de gènes codants pour ces protéines dans le génome des insectes (Tanaka et al., 2008). Au moins 3000 AMPs ont été identifiés dans le vivant et ces peptides sont classés selon leur spécificité pour une classe de pathogènes (champignons, bactéries, parasites et virus) (Bahar et Ren, 2013).

La première réponse humorale rencontrée par les pathogènes ingérés est localisée dans les cellules intestinales. Lors d'une infection, les cellules épithéliales produisent des AMPs et des ROS qui combattent l'infection localement (Buchon et al., 2014). Ces réponses au niveau de l'intestin pourraient aussi permettre de conserver un équilibre dans le nombre de bactéries (non pathogènes) constituant la flore intestinale (Engel et Moran, 2013). Lorsque les pathogènes passent les barrières physiologiques de l'intestin, ils sont alors confrontés à une induction des AMPs produits dans les tissus adipeux et dans une moindre mesure dans des hémocytes circulant dans l'hémolymphe (Govind, 2008; Hoffmann, 1995; Lavine et Strand, 2002; Strand, 2008). Ces AMPs vont être sécrétés dans l'hémolymphe pour bloquer le développement des pathogènes (Hoffmann, 2003).

La production des AMPs est initiée par la reconnaissance des PAMPs (molécules associées à des groupes de pathogènes) par les PRPs. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans cette réponse. Chez la drosophile, la voie de signalisation Toll est mobilisée dans les tissus adipeux et les hémocytes en réponse aux bactéries Gram positives et aux champignons quand la voie de signalisation Imd est mobilisée dans les cellules épithéliales, les tissus adipeux et les hémocytes, en réponse aux bactéries Gram négatives (Buchon et al., 2014; Govind, 2008). D'autres voies de signalisation comme les voies Jak-STAT et JNK peuvent aussi initier la défense immunitaire humorale (Brennan et Anderson, 2004).

D. La réponse cellulaire

La défense cellulaire implique plusieurs types d'hémocytes, chez *A. aegypti* on en dénombre trois types (Castillo et al., 2006) :

- Les prohémocytes, non différenciés, sont des cellules souches. Chez la drosophile, plusieurs gènes (Srp et Pvf2) ont été décrits comme initiant la production et la prolifération des prohémocytes (Carton et al., 2008; Strand, 2008). De même, plusieurs voies de signalisation (Toll, Jak/Stat, Kun kinase et Ras-mitogen) ont été montrées comme impliquées dans la prolifération et la différenciation des hémocytes (Carton et al., 2008; Strand, 2008).

- Les granulocytes, qui représentent environ 90% des hémocytes chez le moustique, ont une activité phagocytaire (Castillo et al., 2006). Durant la phagocytose, le pathogène est internalisé dans le phagosome de la cellule qui produit des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et du nitrogène (RNS) qui sont toxiques pour le pathogène (Lavine et Strand, 2002). Ils peuvent aussi participer à la réponse humorale par la production d'AMPs (Govind, 2008) et à la nodulation (Brennan et Anderson, 2004) qui correspond à l'agrégation des hémocytes qui permettent le piégeage du pathogène (Lavine et Strand, 2002).

- Les œnocytes sont impliqués dans la production de phenoloxidases qui permettent la mélanisation (Lavine et Strand, 2002). La mélanisation est une série de réactions chimiques qui produit des pigments noirs autour du pathogène induisant son encapsulation et son asphyxie (Hillyer et Christensen, 2005).

II. Implication de l'immunité dans la défense contre *Bt* et les toxinesCry

Les toxines Cry produites par les différentes sous-espèces de Bt se fixent aux cellules épithéliales induisant la mort cellulaire par la formation de pores ou par une voie de signalisation de mort cellulaire (Bravo et al., 2011). La mort des cellules épithéliales peut alors compromettre l'intégrité de la membrane épithéliale et permettre aux bactéries d'infecter l'hémolymphe. À l'origine, le *Bt* était vu comme un pathogène provoquant la septicémie pour tuer les insectes, mais la mort peut être également provoquée chez les insectes se nourrissant seulement avec les toxines (Bravo et al., 2005). Il a été montré que l'élimination de la flore intestinale chez certaines espèces de lépidoptères par traitement antibiotique entrainait une diminution ou l'absence de toxicité d'une sous-espèce de Bt (Broderick et al., 2006; Broderick et al., 2009). Ces résultats suggèrent que la flore intestinale joue un rôle dans la toxicité du Bt. Néanmoins, d'autres travaux indiquent que cet effet est attribuable à l'exposition aux antibiotiques qui atténue la toxicité du Bt plus qu'à l'absence de bactéries de la flore intestinale (Frankenhuyzen et al., 2010; Raymond et al., 2010, 2009). La mortalité causée par le Bt semble causée principalement par la forte mortalité cellulaire provoquée par les toxines Cry et/ou par la septicémie due à l'invasion des différentes sous-espèces de Bt (Bravo et al., 2011). Pour répondre contre les attaques provoquées par les sous-espèces de Bt et les toxines Cry produites, il semble que les insectes mettent en jeu la réponse immunitaire humorale et cellulaire (Grizanova et al., 2014).

A. La réparation de la membrane épithéliale

La réparation de la membrane épithéliale après une blessure (comme le provoquent les toxines Cry par exemple) induit la réponse immunitaire humorale et cellulaire chez la drosophile (Figure 20) (Krautz et al., 2014). Le signal de la blessure attire les hémocytes (granulocytes et œnocytes), mais le mécanisme par lequel les hémocytes sont attirés est encore peu connu (Figure 20-1) (Rowley et Ratcliffe, 1978). La dégranulation (libération des molécules antimicrobiennes depuis des vésicules de sécrétion appelées granules) des granulocytes initie la formation d'un caillot « doux » de coagulation. Ensuite, l'éclatement des œnocytes libère les phenoloxidases (Figure 20-2 et 3) (Galko et Krasnow, 2004). Les œnocytes et les granulocytes dégranulés

sont incorporés au caillot de coagulation et mélanisés par les phenoloxidases pour former le caillot « dur » (Figure 20-3) (Galko et Krasnow, 2004). La membrane est ensuite reconstituée par la production de nouvelles cellules épithéliales entrainant la perte du caillot « dur » de coagulation (Figure 20-4), (Rowley et Ratcliffe, 1978). Il a aussi été démontré qu'une augmentation de la prolifération des cellules souches dans les tissus épithéliaux pouvait permettre de réparer les dommages causés par les toxines Cry (Buchon et al., 2010). Ainsi, pour éviter l'altération de la membrane épithéliale, une augmentation de la régénération des cellules intestinales chez une souche d'*H. virescens*, résistante à Cry1Ac, a été observée (Castagnola, 2011). Ce mécanisme pourrait contribuer à la résistance aux toxines Cry chez les insectes (Castagnola, 2011).



Figure 20 : Différentes étapes de la réparation d'une blessure. Figure reprise de (Engel et Moran, 2013)).

B. L'activation de la réponse immunitaire

Le rôle du système immunitaire dans la tolérance au *Bt*, a été mis en évidence par l'ajout d'immunosuppresseurs qui rendait les lépidoptères *Spodoptera exigua* et *Pl. xylostella* plus sensibles au *Bt* (Kwon et Kim, 2008, 2007). Aussi, l'inhibition d'un AMP (gloverine) ayant une activité spécifique contre les bactéries Gram positives provoque une sensibilité accrue au *Bt* chez *S. exigua* (Hwang et Kim, 2011). Plusieurs études, ont mis en évidence une augmentation de la transcription des

gènes codants pour des AMPs ou de leur activité après exposition à une toxine Cry ou à un mix de spores et toxines chez plusieurs espèces de lépidoptères et de coléoptères (Behrens et al., 2014; Bel et al., 2013; Crava et al., 2015; Grizanova et al., 2014; Hernández-Martínez et al., 2010; Rodríguez-Cabrera et al., 2008; Yao et al., 2014). Ces résultats montrent que la transcription des AMPs peut être induite uniquement avec les toxines Cry, suggérant que la réponse immunitaire est initiée par l'infection de l'ensemble de l'organisme par des bactéries de la flore microbienne intestinale provoquée par les dommages causés par les toxines (Crava et al., 2015).

Concernant les phenoloxidases, on ne retrouve pas de réponse universelle chez les insectes face à une exposition aux toxines du Bt ou un mix de spores et de toxines. Plusieurs études montrent une activité phénoloxidase inchangée ou diminuée chez respectivement S. exigua et Trichoplusia ni après exposition (Crava et al., 2015; Ericsson et al., 2009) guand d'autres études montrent une augmentation de l'activité chez P. interpunctella et Galleria mellonella (Valadez-Lira et al., 2012; Grizanova et al., 2014). Cette réponse pourrait donc être différente selon les espèces. Aussi, une étude montre une activité plus importante chez P. interpunctella exposée au Biobit (mix de toxines Cry1A et Cry2A) au stade 2 lorsqu'aucune réponse n'est observée au stade 4. Cette réponse pourrait donc aussi être différente selon le stade larvaire (Valadez-Lira et al., 2012). Enfin, une corrélation a été observée entre la tolérance au Bt chez Ephestia kuehniella et son activité phénoloxidase (Rahman et al., 2004). De plus, les larves sélectionnées avec le *Bt* montrent une activité constitutive des phénoloxidases plus importante que les larves sensibles, suggérant une implication des phénoloxidases dans la résistance au Bt chez cette espèce (Rahman et al., 2004).

L'exposition aux toxines Cry ou au mix de spores et toxines induit une diminution du nombre d'hémocytes chez plusieurs espèces de lépidoptères et une espèce de coléoptère (Broderick et al., 2010; El-Aziz et Awad, 2010; Ericsson et al., 2009; Grizanova et al., 2014; Manachini et al., 2011). Chez *G. mellonella*, une diminution du nombre d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe après 3 jours d'exposition au *Bt* (dose tuant 15% de la population) a été observée alors que la proportion d'hémocytes ayant phagocyté augmentait après 3 jours d'exposition (Grizanova et al., 2014).
III. Implication de l'immunité dans la défense contre les arbovirus chez *Aedes*

Les arbovirus sont des pathogènes intracellulaires qui exploitent la machinerie cellulaire de l'hôte pour se répliquer (Sim et al., 2014). Plusieurs mécanismes de défense contre les infections par les arbovirus ont été décrits chez le moustique (Sim et al., 2014).

A. Le rôle des voies de signalisation

La voie de signalisation Toll a été montrée comme ayant un rôle dans la défense contre les arbovirus (Sim et al., 2014). En effet, la voie de signalisation Toll contrôle la réplication de la dengue (DENV) dans l'intestin des insectes dans les trois jours post-infection. Cette voie de signalisation est active contre tous sérotypes de la DENV (Xi et al., 2008). L'activation de l'expression de cécropines et défensines (AMPs) par cette voie de signalisation permettrait de limiter la réplication du virus (Pan et al., 2012). Le rôle de la voie de signalisation Imd est plus controversé, l'inhibition de l'expression du gène caspar par RNAi, provoquant l'activation de cette voie de signalisation, n'ayant pas d'effets sur la charge virale observée dans l'intestin (Xi et al., 2008). En revanche l'inhibition de cette voie de signalisation chez une souche d'A. *aegypti* moins sensible au virus de la DENV augmente la charge virale de l'insecte dans l'intestin (Sim et al., 2013).

Les voies de signalisation de l'ARN interférant (RNAi) ne sont pas stimulées en réponse à des infections virales : elles semblent utiliser les enzymes exprimées constitutivement dans le cytoplasme (Luplertlop et al., 2011). Les mécanismes de RNAi semblent être la principale défense contre les infections d'arbovirus (Blair, 2011). Ils ont été impliqués dans la défense contre la DENV et le CHIKV chez *A. aegypti* (Hess et al., 2011; Morazzani et al., 2012; Scott et al., 2010). Plusieurs mécanismes de RNAi existent mais le siRNA (petit ARN interférents) est celui qui est le mieux caractérisé (Figure 21). Ce mécanisme est initié lorsque les doubles brins d'ARN (dsRNA) provenant du virus sont reconnus et clivés en siRNA par une enzyme (Dicer-2). Celle-ci clive l'ARN double brin toutes les 21 à 25 paires de bases. Dicer transfère alors les siRNA à un gros complexe multiprotéique, le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Un des brins du siRNA, dit passager, est éliminé tandis que l'autre, dit guide, dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une

séquence complémentaire au brin guide. Si la complémentarité entre le sIRNA et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine.



Figure 21 : résumé des étapes du RNAi. Schéma repris et modifié de (Goic et al., 2013).

IV. Contexte de l'étude

Nous avons observé avec l'étude du transcriptome (par RNA-seq) d'une souche sélectionnée au Bti (LiTOX) et de trois souches sélectionnées à trois classes d'insecticides chimiques (pyrethroide, néonicotinoide et carbamate) une surreprésentation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire parmi les gènes sous-transcrits (Article 4). Nous avons proposé que la baisse de l'immunité d'A. aegypti puisse être un ajustement permettant de compenser les coûts métaboliques liés à la résistance aux insecticides. Une telle diminution de l'immunité a également été observée chez une souche de T. ni résistante au Btk (mix de toxines Cry1A et Cry2A) (Ericsson et al., 2009). Parmi les gènes sous-transcrits chez la souche LiTOX, on trouve une majorité d'AMPs (défensines et cécropines) impliquées dans la réponse contre les bactéries Gram positives ou Gram négatives (Hoffmann, 1995). Ce résultat est surprenant, sachant que les différentes souches d'insectes sensibles, exposées aux toxines ou au mix de spores et toxines, présentent généralement une augmentation de la transcription ou de l'activité des AMPs (Behrens et al., 2014; Bel et al., 2013; Crava et al., 2015; Grizanova et al., 2014; Hernández-Martínez et al., 2010; Rodríguez-Cabrera et al., 2008; Yao et al., 2014). Le but de cette étude est donc de comparer certains acteurs de la réponse immunitaire (AMPs, phenoloxidase...) des souches sélectionnées à Cry4Aa (LR4A) et au *Bti* (LR3Bti) avec la souche sensible. Considérant que la réponse immunitaire est fortement induite par des pathogènes et que les souches résistantes et sensible semblent avoir des réponses différentes à l'exposition aux *Bti* (Chapitre 2), nous avons caractérisé la réponse immunitaire induite et constitutive chez ces souches pour évaluer leur rôle dans la tolérance et la résistance.

Plus récemment, il a été montré que l'exposition aux insecticides chimiques chez *An. gambiae* réduisait la prévalence (nombre de cas de maladie dans la population) de *Plasmodium falciparum* (parasite qui cause le paludisme) (Alout et al., 2013). En revanche, il semble que la résistance aux insecticides chimiques provoquée par des mutations de cible Ace1 et kdr chez *An. gambiae* augmente la prévalence de *P. falciparum* (Alout et al., 2014). Aucune étude n'a été effectuée sur l'effet de l'exposition des larves au *Bti* et sur les effets de la résistance aux toxines du *Bti* sur la compétence vectorielle d'*A. aegypti.* Dans cette étude, nous avons étudié les effets de la résistance et de l'exposition au *Bti*.

V. Article 4

Laurence Després, <u>Renaud Stalinski</u>, Frédéric Faucon, Vincent Navratil, Alain Viari, Margot Paris, Guillaume Tetreau, Rodolphe Poupardin, Muhammad Asam Riaz, Aurélie Bonin, Stéphane Reynaud, Jean-Philippe David

Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito.

Biology letters 10(12) (**2014**)

Contribution : Dans cette étude j'ai participé à l'analyse des données RNA-seq et réalisé les bioessais.

Downloaded from http://rsbl.royalsocietypublishing.org/ on January 4, 2015

BETTERS

rsbl.royalsocietypublishing.org



Cite this article: Després L et al. 2014 Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in Aedes aegypti mosquito. Biol. Lett. 10: 20140716. http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0716

Received: 4 September 2014 Accepted: 26 November 2014

Research

Subject Areas: evolution, molecular biology, ecology

Keywords: transcriptomics, cross resistance, detoxification, immunity

Author for correspondence: Laurence Després e-mail: laurence.despres@ujf-grenoble.fr

[†]Present address: Department of Entomology, University college of Agriculture, University of Sargodha, Sargodha, Pakistan.

Electronic supplementary material is available at http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0716 or via http://rsbl.royalsocietypublishing.org.



Evolutionary biology

Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in Aedes aegypti mosquito

Laurence Després^{1,2}, Renaud Stalinski^{1,2}, Frédéric Faucon^{1,2}, Vincent Navratil³, Alain Viari⁴, Margot Paris^{1,2}, Guillaume Tetreau^{1,2}, Rodolphe Poupardin^{1,2}, Muhammad Asam Riaz^{1,2,†}, Aurélie Bonin^{1,2}, Stéphane Reynaud^{1,2} and Jean-Philippe David^{1,2}

¹Université Grenoble-Alpes, Laboratoire d'Ecologie Alpine UMR 5553, BP53, Grenoble 38041, France ²CNRS, Laboratoire d'Ecologie Alpine UMR 5553, BP53, Grenoble 38041, France ³Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique, Université de Lyon, Lyon 69000, France ⁴

INRIA Grenoble Rhône-Alpes, Montbonnot-Saint-Martin 38330, France

Worldwide evolution of mosquito resistance to chemical insecticides represents a major challenge for public health, and the future of vector control largely relies on the development of biological insecticides that can be used in combination with chemicals (integrated management), with the expectation that populations already resistant to chemicals will not become readily resistant to biological insecticides. However, little is known about the metabolic pathways affected by selection with chemical or biological insecticides. Here we show that Aedes aegypti, a laboratory mosquito strain selected with a biological insecticide (Bacillus thuringiensis israelensis, Bti) evolved increased transcription of many genes coding for endopeptidases while most genes coding for detoxification enzymes were under-expressed. By contrast, in strains selected with chemicals, genes encoding detoxification enzymes were mostly over-expressed. In all the resistant strains, genes involved in immune response were under-transcribed, suggesting that basal immunity might be a general adjustment variable to compensate metabolic costs caused by insecticide selection. Bioassays generally showed no evidence for an increased susceptibility of selected strains towards the other insecticide type, and all chemical-resistant strains were as susceptible to Bti as the unselected parent strain, which is a good premise for sustainable integrated management of mosquito populations resistant to chemicals.

1. Introduction

The massive use of chemical insecticides against mosquitoes has led to the evolution and spread of resistance to all known families of chemical insecticides. Now adays, mosquito control is progressively shifting from a chemical-only to an integrated control strategy, involving the combination of biological insecticides against larvae and chemical insecticides mostly against adults [1]. The sustainability of such strategy relies on the supposedly different mechanisms underlying resistance to chemical and to biological insecticides, and on the premise that mosquitoes will not be able to simultaneously evolve resistance to both insecticides (crossresistance). The rationale of using a combination of biological and chemical insecticides is that genes and metabolic pathways involved in the adaptive response to chemicals differ from those involved in response to a biological insecticide. In the present report, we tested this assumption by selecting a laboratory strain of the yellow fever mosquito Aedes aegypti with a biological insecticide or with one of three chemical insecticides for several generations (electronic supplementary

& 2014 The Author(s) Published by the Royal Society. All rights reserved.



Figure 1. (a) Number of genes down (red) or up (green) differentially transcribed in each insecticide-selected strain, and (b) between-group analysis (BGA) based on \log_2 transcription ratios (as compared to the average between the two Bora-Bora replicates) for each library. Simultaneous plots of the gene (large dots) and library (small dots) points on the first two axes of the BGA. Library points associated to the same strain are joined by line and labelled accordingly. Genes differentially expressed (up or down) in LiTOX strain are in green, genes differentially expressed in at least one of the chemical-selected strain are in red. Genes not differentially expressed are in grey.

material, table S1), and we compared their transcriptomic profiles. To our knowledge, this is the first time that the difference between adaptation to chemical and biological insecticides has been investigated at the whole transcriptome level. Our approach is innovative as it gives a global view of how distinct functional groups of genes are affected by different challenges. We further tested cross-resistance profiles by exposing two chemical-resistant strains to Bacillus thuringiensis israelensis (Bti), and three strains resistant to Bti-toxins to permethrin, propoxur and imidacloprid.

2. Material and methods

Seven A. aegypti strains were selected from the parent Bora-Bora strain susceptible to all insecticides. Three strains (Perm-R, Imida-R and Propo-R) were selected with three insecticides, each representative of one main class of insecticide currently in use: permethrin (pyrethroid), imidacloprid (neonicotinoid), propoxur (carbamate) [2], and four strains (LiTOX, LR4A, LR4B, LR11) were selected, respectively, using field-collected leaf litters containing persistent Bti, and with the three main toxins produced by Bti: Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa [3,4] (electronic supplementary material, table S1). Each line was selected independently from the susceptible Bora-Bora strain [2-4], resulting in three replicates for the chemical-resistant lines and four replicates for the Bt-resistant lines, all sharing a common genetic background and bred in the same standard insectarium conditions. Although all significant, the resistance ratios obtained after 11-26 generations of selection were moderate, especially for chemical-selected strains, which suggests metabolic resistance rather than target-site resistance. For RNAseq, five strains were analysed: the parent Bora-Bora strain, the three chemical-selected strains and the LiTOX strain. For each strain, total RNA was extracted from 180 pooled larvae, and two distinct cDNA libraries were constructed and sequenced. The TopHat program was applied to align the short reads (unique mapping) to AaegL2.1 reference genome. HTSeq software was

used to compute the number of reads overlapping Vectorbase gene features, and genes with more than 20 reads in at least one library were retained for further analysis. The Bioconductor package DESeq was used to normalize read count and test for differential expression between strains (false discovery rate, 0.01). For each resistant strain and each differential expression state, significantly enriched gene ontology (GO) terms were determined using a hypergeometric test with a (one-tailed) p, 0.005. To test for cross-resistance between insecticides, bioassays were performed on third instar larvae using Bti on Perm-R and Imida-R strains, and using permethrin, propoxur and imidacloprid on LR4A, LR4B and LR11 strains. Bioassays have been performed on pools of 20 larvae in 50 ml tap water (WHO protocol), using a diagnostic dose determined empirically for each insecticide in order to kill half of the susceptible reference strain. For each insecticide, a strain effect was tested on the number of dead larvae after 24 h (18 replicates per strain, Kruskal-Wallis test) followed by Mann-Whitney pairwise comparisons with Bonferroni correction for multiple tests.

3. Results and discussion

A total of 12 116 of the 15 784 A. aegypti genes were detected (76.8%), among which 1196 were differently transcribed in at least one selected strain (electronic supplementary material, table S2). The LiTOX strain exhibited the most specific response (figure 1a) and was clearly separated from the chemical-selected strains (figure 1b), indicating that biological and chemical insecticides select for altered transcription of different sets of genes. Our aim in this paper was not to go down to the precise gene involved in each resistance type, but to evaluate differences in the overall pattern of expression of the main metabolic pathways selected with biological versus chemical insecticides. Selecting with Bti resulted in an overall increased expression of genes involved in endopeptidase activity while genes involved in detoxification were mostly under-transcribed

Le rôle de l'immunité dans la résistance

Downloaded from http://rsbl.royalsocietypublishing.org/ on January 4, 2015

3

rsbl.roydscoietypublishing.org

Bd.

Lett. 10: 20140716



Figure 2. Representation of genes significantly differentially transmibed in at least one selected strain for three biological categories of genes. Detorification enzymes, 'Immunity' and 'Endopetricases'. The colour scale corresponds to logy transmiption ratio as compared to the susceptible strain. Significant values in destronic supplementary material, table S2.

Table 1. Summary of CD terms enriched in lists of genes significantly downegulated or upregulated in each selected strain. Formatting for CD terms corresponds to immunity process (italics), detoxification process (bdd), dritin/outide metabolism (bdd italics) and endpeptidase activity (underline). See electronic supplementary material, table S3 for more datails

strain	inætide (fanily)	downregulated	upregulated
RemR	Permethrin (pyrethroid)	structural constituent of outide; innate inmune response; defense response to baderium	alkaline phosphatase activity
ImidaR	Imidedoptid (neoriactinaid)	imate immune response; defense response to bacterium	chitin binding and metabolic process; structural constituent of outide; hæme binding; oxidoreductæe activity
Rapo-R	Ropovur (carbamate)	innate immune response; defense response to bacterium	structural constituent of outide; moncoxygenase activity; hæme binding; electron carrier activity; oxidation reduction
LITOX	Bi (baterio-insecticide)	monooxygenase activity; oxydation reduction; haeme binding	structural constituent of outide; dritin binding and metabolic process; serine-type endpeptidase adivity

(table 1; electronic supplementary material, table S3). By contrast, in chemically selected strains, detoxification enzymes were mostly over-expressed, with no alteration of endopeptidase gene transcription (figure 2). The increased expression of detoxification enzymes in mosquitoes resistant to chemicals has been validated by biochemical tests in the Imida-R laboratory strain [5] and also on organophosphate- and pyrethroid-resistant field populations [6]. The toxins produced by Bti are large proteins, while chemical insecticides are small lipophilic molecules, and their degradation involves different metabolic pathways. Bacillus thuringiensis toxins are degraded by endopeptidases [7,8], while chemical insecticides are usually metabolized by detoxification enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases, esterases, glutathione S-transferases and glucosyl-transferases [5,9]. The finding of increased transcription for many genes coding for endopeptidases in the

Table 2. Fold change of d	differently transcribed in	mmune genes in selected	strains compared with control.
---------------------------	----------------------------	-------------------------	--------------------------------

		description	normalized read counts per strain				fold change compared with control ^a				
vectorbase ID	name		Bora-Bora	LiTOX	Imida-R	Perm-R	Propo-R	LiTOX	Imida-R	Perm-R	Propo-R
humoral response											
anti-microbial pept	ides										
AAEL000611	CECE	Cecropin	114.3	43.3	8.3	13.2	14.1	- 2.6	- 13.8	- 8.7	- 8.1
AAEL000621	CECN	Cecropin	79.9	37.6	20.5	17.2	14.5	- 2.1	- 3.9	- 4.6	- 5.5
AAEL000627	CECA	Cecropin	20.88	3.23	0.00	0.00	0.44	- 6.5	- Inf	- Inf	- 47.5
AAEL004223	CECB	Cecropin	37.5	3.6	51.5	39.3	31.2	- 10.4	1.4	1.0	- 1.2
AAEL015515	CECG	Cecropin	19.5	2.3	0.5	2.2	1.5	- 8.7	- 41.3	- 8.8	- 13.4
AAEL003857	DEFD	Defensin	280.9	85.0	15.4	92.4	16.7	- 3.3	- 18.3	- 3.0	- 16.8
AAEL003841	DEFA	Defensin	138.4	34.4	22.9	51.0	23.6	- 4.0	- 6.1	- 2.7	- 5.9
AAEL004522	GAM1	Gambicin	45.0	12.9	16.8	58.9	27.3	- 3.5	- 2.7	1.3	- 1.7
AAEL018349		Cecropin	20.9	7.8	1.8	9.9	1.0	- 2.7	- 11.8	- 2.1	- 20.5
toll pathway											
AAEL007613	TOLL1A	Toll-like receptor	238.2	329.2	477.4	322.0	278.8	1.4	2.0	1.4	1.2
AAEL007619	TOLL5A	Toll-like receptor	2515.8	1075.2	1319.7	1782.5	1856.1	- 2.3	- 1.9	2 1.4	- 1.4
cellular response											
recognition											
AAEL014755		tep2	1275.2	454.5	1041.7	1321.2	1188.8	- 2.8	- 1.2	1.0	- 1.1
melanization											
AAEL013499	PPO2	Prophenoloxydase	1005.5	1507.6	1914.5	1041.7	1257.2	1.5	1.9	1.0	1.3
AAEL015116		Prophenoloxydase	289.7	52.2	446.0	649.0	402.3	- 5.5	1.5	2.2	1.4

^avalues in bold character: FDR 0.01; - Inf: no reads were detected in the selected strain.

rsbl.royalsocietypublishing.org Biol. Lett. 10: 20140716

LiTOX strain is in line with a previous work showing a global increase in proteolytic activities in the midgut of LiTOX larvae [10]. The fact that most detoxification enzymes were undertranscribed in the LiTOX strain, together with an increase in endopeptidase activity, suggests that there might be metabolic costs to constitutively produce these two types of enzymes simultaneously. In agreement with a resource-based metabolic trade-off associated with Bti resistance, high fitness costs were measured in the LiTOX strain in all life-stages (longer developmental time, lower fecundity and egg survival [11]).

Our data also revealed an under-transcription of genes related to immunity in all selected strains (table 2; figure 2). Immune response was shown to involve both physiological and evolutionary costs [12], and the under-transcription of immune genes in chemical-resistant strains could reflect a reinvestment from immunity toward detoxification pathways in the absence of bacterial challenge in laboratory conditions. More surprisingly, we observed the same trend in the LiTOX strain, which was exposed in each generation to a Grampositive bacterium. Bacillus thuringiensis toxins and spores are ingested by insect larvae, but it is not clear whether the action of toxins alone (disruption of the gut epithelium) is sufficient for mortality to occur, or if germination of spores in larval haemolymph is required [13]. In our dataset, two prophenoloxydases (PPO, involved in melanization) and four genes coding for anti-microbial peptides were significantly under-transcribed in the LiTOX strain (table 2), and none were over-transcribed. In line with this, the basal immunity of a Bt-resistant cabbage looper line was shown to be lower than its susceptible counterpart [14], and we also observed a lower basal immunity in strains selected with Bti-toxins as compared with the susceptible strain (data not shown). This suggests that the depressed immunity observed in Bt-resistant insects is explained by the high cost of expression of immune genes.

The under-expression of genes involved in detoxifying activities observed in the LiTOX strain suggested that Btresistant strains might be more susceptible to chemical insecticides than the control strain. However, bioassays revealed that the strains selected with Bti-toxins show a mixed picture with respect to insecticide susceptibility. Although strains resistant to Bti-toxins were generally as susceptible as the reference strain to chemicals, one strain exhibited an increased susceptibility to one chemical (LR4B to propoxur), while two others had an increased tolerance to two chemicals (LR4A and LR11 to permethrin (pyrethroid) and LR4A to imidacloprid; electronic supplementary material, figure S1). Cross-resistance between the pyrethroid deltamethrin and B. thuringiensis Cry1Ac toxin was reported in the diamondback moth (Plutella xylostella), suggesting a common resistance mechanism to these two insecticides [15]. The toxicity of Cry1Ac and deltamethrin against the respective resistant lines was significantly increased by an inhibitor of insect esterases, but such synergism was not observed in

the unselected line, suggesting that selected and induced responses to insecticide exposure rely on different mechanisms. A recent study revealed that UV-exposed mosquitoes (Bora-Bora strain) exhibited higher levels of detoxification activities and were more tolerant to chemical insecticides, but more susceptible to Bti-toxins [16], suggesting an immediate metabolic compensation between detoxifying activity and Bti resistance in the susceptible strain. However, in this study, Bti-selected strains were not more susceptible to chemical insecticides than the control strain, again suggesting that long-term evolutionary compensation and short-term metabolic response to insecticide exposure can involve distinct mechanisms. This might partly explain the variability of outcomes observed with each combination of selected strain and chemicals. Furthermore, a fraction of detoxification enzymes usually contribute to a given chemical degradation [2,5], while others have endogenous functions potentially interacting with Bti-toxins tolerance. In addition, other protein families are probably involved in resistance to chemicals such as transporters, cuticle proteins and receptors [2] and may have been impacted by Bti selection. All the chemical-selected strains were as susceptible as the parent strain to Bti (electronic supplementary material, figure S1). This is in line with a lack of resistance (but no higher susceptibility) to Bti observed in field populations of A. aegypti highly resistant to chemical insecticides [17]. Furthermore, our result can be extended to a broader range of mosquito species and bioinsecticides as under-transcription of detoxification enzymes together with lack of cross-resistance were observed in pyrethroidresistant Anopheles strains infected with Beauvaria bassiana, an entomopathogenic fungus producing a cocktail of toxins [18]. This is a good premise for the use of biological agents against chemical-resistant field mosquito populations. Because we have generated only one selected line per insecticide, we cannot determine whether or not the transcriptional patterns observed reflect inherent random variation or the variation caused by our selection regimes, although they are consistent with data obtained from other laboratories [6,9,14,15,18]. To better understand the interplay between immunity, basal and induced detoxification activities, and response to a biological agent, future work should explore the immune and resistance status of target mosquito populations together with induced responses prior to introduction of a new bioinsecticide in integrated vector management.

Data accessibility. RNAseq data are available at EBI/SRA/ArrayExpress (accession number E-MTAB-1635).

Acknowledgements. We thank the BEeSy project (University Grenoble-Alpes) for computing and laboratory facilities and S. Veyrenc and T. Gaude for help with mosquito rearing.

Funding statement. This work was funded by the French National Research Agency (ANR-08-CES-006-01 DIBBECO and ANR-07SEST014 Mosquito-Env) and the region Rhône-Alpes.

References

- WHO. 2007 Report of the WHO consultation on integrated vector management (IVM). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- David JP, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz MA, Bonin A, Navratil v, Reynaud S. 2014 comparative analysis of response to selection

with three insecticides in the dengue

mosquito Aedes aegypti using mRNA sequencing. BMC Genomics 15, 174. (doi:10.1186/1471-2164-15-174)

 Paris M, retreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J-P. 2011 Persistence of Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. Pest Manag. Sci. 67, 122-128. (doi:10.1002/ps.2046)

 Stalinski R, retreau G, Gaude T, Després L. 2014 Preselecting resistance against individual Bti Cry toxins facilitates the development of resistance to the Bti

Le rôle de l'immunité dans la résistance

Downloaded from http://rsbl.royalsocietypublishing.org/ on January 4, 2015

toxins cocktail. J. Invert. Pathol. 119, 50-53. (doi:10.1016/j.jip.2014.04.002)

- Riaz MA, Chandor-Proust A, Dauphin-Villemant C, Poupardin R, Jones CM, Strode C, Regent-Kloeckner M, David J-P, Reynaud S. 2013 Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector Aedes aegypti. Aquat. Toxicol. 126, 326-337. (doi:10.1016/j. aquatox.2012.09.010)
- Marcombe S et al. 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. (doi:10.1186/1471-2164-10-494)
- Forcada C, Alcacer E, Garcera MD, Martinez R. 1996 Differences in the midgut proteolytic activity of two Heliothis virescens strains, one susceptible and one resistant to Bacillus thuringiensis toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 31, 257–272. (doi:10.1002/ (SICI)1520-6327(1996)31:3, 257::AID-ARCH2. 3.0. cO;2-V)
- 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. J. Invert. Pathol. 85, 120-127. (doi:10.1016/j.jip.2004.02.002)

- Che-Mendoza A, Penilla RP, Americo Rodriguez D. 2009 Insecticide resistance and glutathione Stransferases in mosquitoes: a review. Afr. J. Biotechnol. 8, 1386-1397. (doi:10.5897/ AJB2009.000-9218)
- Tetreau G, Stalinski R, David JP, Despres L. 2013 Increase in larval gut proteolytic activities and Bti resistance in the dengue fever mosquito. Arch. Insect Biochem. Physiol. 82, 71–83. (doi:10.1002/arch.21076)
- Paris M, David J-P, Despres L. 2011 Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector Aedes aegypti. Ecotoxicology 20, 1184-1194. (doi:10. 1007/s10646-011-0663-8)
- McKean KA, yourth CP, Lazzaro BP, Clark AG. 2008 The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. BMC Evol. Biol. 8, 76. (doi:10.1186/1471-2148-8-76)
- Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. 2010 Bacillus thuringiensis: an impotent pathogen? rrends Microbiol. 18, 189– 194. (doi:10.1016/j.tim.2010.02.006)
- Ericsson JD, Janmaat AF, Lowenberger C, Myers JH.
 2009 Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers Trichoplusia ni?

J. Invert. Pathol. 100, 61-67. (doi:10.1016/j.jip. 2008.10.007)

- Sayyed AH, Moores G, Crickmore N, Wright DJ. 2009 Cross-resistance between a Bacillus thuringiensis Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. Pest Manag. Sci. 64, 813-819. (doi:10.1002/ ps.1570)
- retreau G, Chandor-Proust A, Faucon F, Stalinski R, Akhouayri I, Prud'homme SM, Raveton M, Reynaud S. 2013 contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. Aquat. Toxicol. 140, 389–397. (doi:10.1016/j.aquatox. 2013.07.004)
- Marcombe S et al. 2012 Insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. PLoS ONE 7, e30989. (doi:10. 1371/journal.pone.0030989)
- Nardini L, Blanford S, coetzee M, Koekemoer LL. 2014 Effect of Beauveria bassiana infection on detoxification enzyme transcription in pyrethroid resistant Anopheles arabiensis: a preliminary study. trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 108, 221–227. (doi:10.1093/ trstmb/tru021)

VI. Etude 1: Rôle de la réponse immunitaire dans la résistance et réponse immunitaire après exposition au *Bti*

Les résultats présentés dans cette étude sont en partie issus de deux stages effectués par Marie Collet (stagiaire de Master 2 à l'ENS) et Lucie Contamin (Stagiaire de M1 BEE).

A. Matériel et méthodes

1. Souches de moustiques

Trois souches ont été utilisées dans cette étude. La souche sensible (Bora) et les souches sélectionnées à Cry4Aa (LR4A) à la génération 29 et au *Bti* (LR3Bti) à la génération 10. Tous les niveaux de résistance des souches ont été présentés précédemment (pages 50-51, Chapitre 1). LR4A est résistante plus de 10.000 fois à Cry4Aa et 1.8 fois au *Bti*, alors que LR3Bti est résistante entre 8 et 14 fois aux toxines séparées du *Bti* (Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa) et 1.4 fois au *Bti*.

1. Mortalité en fonction du temps

Un lot de 100 larves de la souche sensible est exposé au *Bti* pour obtenir 50% de mortalité (LC_{50}) en 24 h. Le nombre de larves mortes est mesuré à 1.25, 3, 6, 8, 27, 30, 48 et 51 h nous permettant de calculer le pourcentage de mortalité en fonction du temps. Dans les premières 24 h, les larves mortes sont retirées pour éviter un effet du recyclage du *Bti*. Après 24 h les larves sont individualisées dans des gobelets (10 mL d'eau du robinet) pour stopper l'exposition au *Bti* et éviter une exposition au *Bti* due à un recyclage dans une autre larve.

2. Elevage et extraction de l'hémolymphe

Les moustiques sont élevés en condition standardisées, $27^{\circ}C$ (+/-1°C), haute humidité et un cycle jour/nuit de 14h/10h. Les larves ont été élevées en conditions standardisées, avec 1000 œufs par bac contenant 2,5 litres d'eau du robinet, 1 gramme de nourriture pendant 4 jours. 100 larves de stade 3 sont ensuite placées dans des cristallisoirs contenant 30mg de nourriture. Les larves sont exposées au *Bti* (toxines et spores) avec une dose (65.1 µg.mL⁻¹ de spores cristaux pour Bora et 97.7 µg.mL⁻¹ pour LR4A et LR3Bti) permettant d'atteindre la LC₂₀ dans chacune des souches. Les larves « contrôle » sont élevées dans les mêmes conditions sans ajout de *Bti*. Après 24 h d'exposition, les larves de stade 4 sont rincées à l'eau puis utilisées pour les expérimentations. La récupération de l'hémolymphe se fait en perforant la cuticule de la larve à l'aide d'une aiguille. 10 larves ainsi blessées sont placées dans un tube puis centrifugées brièvement. L'hémolymphe est ensuite récupéré par lavage du culot avec 10 μ L de milieu Schneider (Sigma Aldrich, milieu pour culture de cellules d'insectes).

3. Comptage des hémocytes

L'hémolymphe provenant de 20 larves exposées ou non au *Bti* est collectée, 3 réplicas biologiques sont effectués par condition (chaque souche exposée ou non au *Bti*). Les 20 µL d'hémolymphe sont ensuite mélangés à 7.5 µL de bleu de trypan afin de colorer les cellules. La solution est ensuite placée sur une cellule de Malassez pour effectuer le comptage des hémocytes. Les différences de nombre d'hémocytes sont testées à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007).

4. Activité des phénoloxidases

L'hémolymphe provenant de 10 larves exposées ou non au *Bti* est collectée, 5 réplicas biologiques sont effectués par condition. L'hémolymphe collectée est conservée à -20°C avant son utilisation pour conserver l'intégrité des protéines. Pour s'affranchir de l'activité des hémocytes, l'hémolymphe est resuspendue dans 30 μ L de milieu Schneider et centrifugée à 5000 g à 4°C pendant 5 min. 25 μ L de chaque échantillon est supplémenté de à 135 μ L d'H₂O et 20 μ L de L-Dopa (3,4-dihydroxy-L-phenylanaline : substrat des phénoloxidases) à 15 mM. L'absorbance est ensuite mesurée toute les 10 sec à 490 nm à 30°C (Varioskan, Flash Multimode Reader, Thermo Scinetific). La quantité totale de protéines dans les échantillons d'hémolymphe est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), en utilisant la BSA comme standard. L'activité phénoloxidase est exprimée en nombre de nmol de produit formé par min par μ g de protéines (nanoKatal-nKat). Les différences d'activités sont testées à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007).

5. Activité des lysozymes

L'hémolymphe provenant de 5 larves exposées ou non au *Bti* est collectée. 10 réplicas biologiques sont effectués par condition. L'hémolymphe est resupendue dans 10 μ L de milieu Schneider et centrifugée à 5000g à 4°C pendant 5 min pour éliminer les hémocytes. L'activité antibactérienne est déterminée par une zone d'inhibition comme décrit par (Wojda et al., 2004). Les boîtes de Petri, utilisées pour mesurer l'activité lysozyme des échantillons d'hémolymphe, contiennent de l'agarose à 1.5% à osmolarité physiologique (NaCl 0.9%) mélangé avec 4mg.mL⁻¹ de poudre de *Micrococcus luteus* (bactérie Gram positive). Des trous de 1mm de diamètre sont faits dans l'agar dans lesquels on ajoute 5 μ L de l'échantillon. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 18 h. L'activité lysozyme est déterminée en mesurant la zone de digestion des peptidoglycanes de *M. luteus*. L'activité lysozyme est quantifiée avec une courbe standard réalisée avec de l'EWL (lysozyme d'œuf de poule, Sigma Aldrich), comme décrit par (Mohrig et Messner, 1968) et exprimé en EWL équivalent (mg.mL⁻¹). Les différences d'activité sont testées à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007).

6. Mesure de la prolifération bactérienne

Les larves de stade 3 larves sont exposées au *Bti* (toxines et spores) pendant 24 h avec une dose (151.9 μ g.mL⁻¹ de spores cristaux pour Bora et 216.2 μ g.mL⁻¹ pour LR4A et LR3Bti) permettant d'atteindre la LC₅₀ dans chacune des souches. Après 24 h, 15 larves de stade 4 exposées au *Bti* et 5 larves témoins non exposées au *Bti*, par souche, sont broyées dans 200 μ L de PBS (tampon phosphate). Le broyat ainsi récupéré, est ensuite divisé en deux pour effectuer sur l'un des deux échantillons un choc thermique (60 min à 80°C) permettant de tuer toutes les bactéries végétatives (*Bti* et bactéries intestinales). Les échantillons sont ensuite étalés sur boîte de Petri (contenant du nutrient agar; Sigma Aldrich) puis les boîtes sont placées à 30°C pendant 24 h. Le comptage des bactéries est effectué en distinguant deux catégories (bactérie de la flore intestinale et *Bti*) et en distinguant les bactéries végétatives des spores (résistantes au choc thermique). Les différences de nombre de bactéries de chaque catégorie et condition entre la souche sensible et les souches résistantes sont testées à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007).

B. Résultats

1. Mortalité en fonction du temps

L'évolution de la mortalité se décompose en trois grandes phases sur la durée de l'expérience (51h) (Figure 22). Une augmentation exponentielle de la mortalité est observée lors de la première phase entraînant la mort d'environ la moitié des larves au bout de 8h (Figure 22-1). La deuxième phase est caractérisée par un arrêt de la mortalité pendant 22h, suivie de la troisième et dernière phase durant laquelle une mortalité résiduelle est observée, augmentant la mortalité de 14% durant les 21 dernières heures.



Figure 22 : Évolution de la mortalité des larves (n=100) de la souche Bora en fonction du temps après une exposition au *Bti*.

2. Comptage des hémocytes

Le nombre moyen d'hémocytes circulant dans chaque larve est de 1631 (+/-157). Aucune différence significative n'a été trouvée dans le nombre d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe entre les souches sensibles et résistantes et pour chaque souche entre les individus exposés ou non exposés (Figure 23).

Le rôle de l'immunité dans la résistance



Figure 23 : Nombre d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe par larve dans les souches Bora (n=3), LR4A (n=3), et LR3Bti (n=3) exposées (LC₂₀) ou non au *Bti*. Les résultats représentent la moyenne de trois réplicas biologiques et les erreurs standards associées.

3. Activité des phénoloxidases

Une diminution significative (2.4 fois) de l'activité constitutive (larves non exposées) des phénoloxidases entre les souches résistantes et la souche sensible est observée. L'activité phénoloxidase est également significativement réduite de 2.18 fois après exposition de la souche sensible au *Bti* alors que l'exposition des souches résistantes n'induit pas de modification de leur activité phénoloxidase (Figure 24).



Figure 24: Activité des phénoloxidases dans l'hémolymphe dans les souches Bora (n=5), LR4A (n=5), et LR3Bti (n=5) exposées (LC₂₀) ou non au *Bti*. Les résultats représentent la moyenne de cinq réplicas biologiques et les erreurs standards associées. La significativité des différences d'activité entre conditions a été testé par un test de wilcoxon. Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative.

4. Activité lysozyme

L'activité lysozyme est significativement plus importante (+12-20%) chez les souches résistantes que chez la souche sensible. L'activité lysozyme est également significativement augmentée (+11%) après exposition de larves sensibles au *Bti* (Figure 25). Cependant, comme pour l'activité phénoloxidase, aucun effet significatif de l'exposition n'est observé chez les souches résistantes (Figure 24).



Figure 25: Activité lysozyme dans l'hémolymphe dans les souches Bora (n=10), LR4A (n=10), et LR3Bti (n=10) exposées (LC_{20}) ou non au *Bti*. Les résultats représentent la moyenne de dix réplicas biologiques et les erreurs standards associées. La significativité des différences d'activité entre conditions a été testé par un test de wilcoxon. Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative.

5. Prolifération bactérienne

Les bactéries présentes dans l'intestin des larves ont été identifiées, dénombrées et classées en deux catégories :*Bti* et bactéries de la flore intestinale. Aucune différence d'abondance des bactéries de la flore intestinale n'a été trouvé entre les larves sensibles et les larves résistantes exposées au *Bti*, avec un nombre moyen de 2936 (+/-258) bactéries par larve (Figure 26-a). L'application du choc thermique, permettant de ne conserver que les spores des bactéries sporulantes, n'a révélé la présence d'aucune spore ce qui suggère que les bactéries de la flore intestinale ne sont pas sporulantes. Après exposition, un nombre significativement 3.4 à 4.3 fois plus important de bactéries *Bti* a été identifié chez les larves sensibles (680 bactéries/larve) par rapport aux larves résistantes des souches LR4A (157 bactéries/larve) et LR3Bti (192 bactéries/larve) (Figure 26-b). L'application du choc

thermique a révélé un nombre de spores de *Bti* inférieur à 10 par larve chez toutes les souches, montrant que les bactéries de *Bti* comptées dans les larves sont majoritairement des bactéries végétatives.



Figure 26 : Prolifération bactérienne après une exposition au *Bti* (LC₅₀), effectuée sur 15 larves de chaque souche ; (a) nombre de bactéries de la flore intestinale par larve et (b) nombre de *Bti* par larve. Les valeurs ont été testées par un test de Wilcoxon (p-valeur <0.05, * ; <0.01, **).

C. Discussion

On observe plusieurs phases dans la cinétique de mortalité au *Bti* chez la souche sensible. Une première phase de mortalité après seulement 8 heures d'exposition au *Bti*. La mortalité observée durant cette phase est attribuée à l'activité des toxines affectant l'intégrité de l'intestin, mais ne semble pas due à un développement bactérien (Broderick et al., 2010). Les larves survivantes durant cette phase pourraient donc être celles qui présentent le moins de dommages intestinaux liés aux toxines. Lors de la deuxième phase, on remarque que la mortalité n'augmente pas pendant 20 heures pour ensuite augmenter à nouveau de 14% (phase 3). Les larves n'étant plus exposées au *Bti* après 24 heures, la mortalité résiduelle pourrait s'expliquer par une infection bactérienne provoquant la septicémie. Ainsi, les larves survivantes pourraient avoir un système immunitaire plus efficace pour tolérer l'infection. Selon ces hypothèses les larves sélectionnées aux *Bti* ou aux toxines séparées pourraient être celles qui présentent le moins de dommages intestinaux et celles qui présentent une immunité permettant de survivre à l'infection suite à l'exposition.

Pour déterminer quels mécanismes peuvent intervenir dans la meilleure tolérance à l'infection, nous avons mesuré certains traits immunitaires chez une souche sensible et deux souches sélectionnées respectivement au *Bti* et à Cry4Aa. Ces souches ont

été exposées ou non au *Bti*. A notre connaissance, c'est la première fois que le rôle de l'immunité dans la réponse à l'exposition au *Bti* et dans la résistance est évalué chez les larves de moustiques.

Le nombre d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe n'est pas affecté par l'exposition au Bti chez aucune des souches étudiées. Ce résultat est en contradiction avec la littérature qui montre généralement une diminution du nombre total d'hémocytes après une exposition à différentes sous-espèces de Bt chez trois espèces de lépidoptères et une espèce de coléoptère (Broderick et al., 2010; Ericsson et al., 2009; Grizanova et al., 2014; Manachini et al., 2011). Néanmoins, chez Agrotis ipsilon exposé au Bt, il a été montré une diminution des prohémocytes mais une augmentation des quatre autres types d'hémocytes présents chez cette espèce, dont les granulocytes (El-Aziz et Awad, 2010). Enfin chez Rhynchophorus ferrugineus exposé au Bt, une diminution du nombre total d'hémocytes est associée principalement à la diminution du nombre de plasmocytes alors qu'aucun impact sur la quantité de granuclocytes n'a été observé (Broderick et al., 2010; Ericsson et al., 2009; Grizanova et al., 2014; Manachini et al., 2011). Les granulocytes représentent 90% des hémocytes chez les larves d'A. aegypti et les plasmocytes ne sont pas présents (Castillo et al., 2006) pouvant expliquer l'absence d'effet de l'exposition au Bti sur le nombre d'hémocytes circulants. Les granulocytes participent à la phagocytose et il a été montré chez G. mellonella une augmentation de la proportion d'hémocytes ayant une activité phagocytaire après exposition au Bt (Broderick et al., 2010; Ericsson et al., 2009; Grizanova et al., 2014; Manachini et al., 2011). Pour évaluer le rôle des granulocytes dans la réponse à l'infection au Bti, nous avons essayé de mesurer l'activité phagocytaire en cytométrie de flux mais suite à des soucis techniques les résultats ne sont pas exploitables. La mesure d'activité phagocytaire devra être réitérée ultérieurement.

L'activité des phénoloxidases est un marqueur de la mélanisation qui participe à la défense contre les pathogènes et à la réparation des blessures dans la cuticule externe de l'insecte et dans l'intestin (Krautz et al., 2014). Le rôle des phénoloxidases dans la réponse à une intoxication par des sous-espèces de *Bt* n'est pas clair, certaines publications rapportent une augmentation de l'activité (Crava et al., 2015; Ericsson et al., 2009) quand d'autres rapportent une baisse de l'activité après exposition au *Bt* (Valadez-Lira et al., 2012; Grizanova et al., 2014).

Néanmoins, deux publications ont rapporté une hausse de l'activité phénoloxidase constitutive chez deux souches d'*He. armigera* et d'*Ep. kuehniella* résistantes au *Bt* (Ma et al., 2005; Rahman et al., 2004). Dans cette étude, une baisse de l'activité des phénoloxidases a été observée uniquement chez la souche sensible pour atteindre le niveau d'activité trouvé chez les souches résistantes, qu'elles soient exposées ou non. Ces résultats suggèrent que la mélanisation n'a pas un rôle prépondérant dans la réponse à une intoxication au *Bti* et dans la résistance sélectionnée au *Bti*. Cette baisse d'activité phénoloxidase chez les souches résistantes et chez la souche sensible après exposition au *Bt* peut être due à une réallocation d'énergie au profit d'autres voies immunitaires comme il a été suggéré chez *Bombus terrestris* (Mallon et al., 2003).

Les lysozymes sont des composants importants de la réponse immunitaire chez les moustiques (Gao et Fallon, 2000). Les lysozymes clivent les peptidoglycanes constituant la paroi des bactéries et sont particulièrement actifs contre les bactéries Gram positives, dont *Bt*, dont la paroi est constituée à 90% de peptidoglycanes. L'activation de la transcription des gènes codants pour des lysozymes et l'augmentation de l'activité lysozyme a été rapportée chez au moins trois espèces de lépidoptères exposées au *Bt* (Crava et al., 2015; Freitak et al., 2007; Grizanova et al., 2014). Les lysozymes peuvent être sécrétés directement dans l'intestin ou dans l'hémolymphe en réponse à une infection (Ursic Bedoya et al., 2005). Une augmentation de l'activité lysozyme a été observée chez la souche sensible exposée au *Bti*. Les souches résistantes présentent également de hauts niveaux d'activité lysozyme de manière constitutive. Cela suggère que les lysozymes sont impliqués dans la réponse à une intoxication au *Bti* chez le moustique.

Une prolifération bactérienne dans l'hémolymphe 24 heures après exposition au *Bt* chez *Lymantria dispar dispar* a été observée (Broderick et al., 2010). Afin de mesurer l'effet de la résistance sur la prolifération bactérienne, nous avons réalisé un comptage du nombre des bactéries présentes dans les larves après une exposition au *Bti*. Nous avons observé que la souche sensible au *Bti* présente 3 à 4 fois plus de bactéries *Bti* que les souches résistantes. En revanche, le nombre de bactéries de la flore intestinale ne diffère pas entre les différentes souches. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat ; 1. Les communautés bactériennes des souches résistantes et de la souche sensible sont différentes. Certaines bactéries pourraient

être plus compétitives face à un développement du Bti, néanmoins, aucune différence dans la diversité des bactéries cultivables chez les différentes souches n'a été observée (données non montrées). 2. Un changement dans la composition de la membrane péritrophique, suggéré par la transcription différentielle de nombreux gènes codants pour des protéines liées à la chitine observée chez les différentes souches résistantes (page 56, Chapitre 2). Néanmoins, il est surprenant que seule l'infection par le Bti soit limitée. 3. Une augmentation de la réponse immunitaire permettant spécifiquement de limiter l'infection des souches résistantes par le Bti. Dans cette étude, nous n'avons testé que l'activité des lysozymes. Or, il a été montré qu'un nombre important de ces peptides sont fortement sur-transcrits après une exposition au Bt chez plusieurs espèces (Behrens et al., 2014; Bel et al., 2013; Crava et al., 2015; Grizanova et al., 2014; Hernández-Martínez et al., 2010; Rodríguez-Cabrera et al., 2008; Yao et al., 2014). Les AMPs étant spécifiques de certaines classes de pathogènes ou certaines classes de bactéries (Gram positives ou Gram négatives) (Lundgren et Jurat-Fuentes, 2012). Il est possible que les souches résistantes produisent une plus grande quantité d'AMPs spécifiques de bactéries de type Bti que la souche sensible. De plus, certains AMPs ont été décrits comme pouvant avoir une activité synergique avec les lysozymes pour éliminer les bactéries (Chalk et al., 1994). L'activité lysozyme étant constitutivement plus importante chez les souches résistantes une augmentation de l'activité de certains AMPs pourrait complémenter cette réponse. Il serait donc intéressant de mesurer la transcription de différents AMPs pour déterminer ceux qui pourraient être impliqués dans la meilleure tolérance au Bti.

VII. Etude 2 : Impact de la résistance et de l'exposition au *Bti* sur la compétence vectorielle

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Louis Lambrechts de l'institut Pasteur de Paris. J'ai participé à la conception de l'expérimentation, je suis allé effectuer l'élevage des moustiques à l'institut Pasteur et j'ai participé à la préparation des expérimentations faites dans le laboratoire de haute sécurité (P3) pour l'infection des adultes.

- A. Matériels et méthodes
 - 1. Elevage des moustiques

Trois souches ont été utilisées dans cette étude. La souche sensible (Bora) et les souches sélectionnées à Cry4Aa (LR4A) à la génération 33 et au Bti (LR3Bti) à la génération 15. Tous les niveaux de résistance de ces souches ont été présentés précédemment (page 81, Chapitre 2). Les souches LR4A et LR3Bti présentant un retard de développement larvaire (pages 69-70, Chapitre 1), les œufs ont été mis à éclore en eau 24 h avant la souche sensible. Les larves ont été élevées en conditions standardisées, avec 200 larves par bac contenant 1,5 litres d'H₂O déionisée et une quantité de nourriture (Tetra fish) standardisée pendant 4 jours. 100 larves de stade 3 sont ensuite placées dans des cristallisoirs contenant 30mg de nourriture. Les larves sont exposées au Bti (toxines et spores) avec une dose permettant d'atteindre la LC₅₀. Les larves « contrôle » sont élevées dans les mêmes conditions sans ajout de Bti. Après 24 h, les larves de stade 4 sont remises dans les bacs, par lot de 200, contenant 1.5 litres d'eau déionisée. Les nymphes sont récupérées aux jours 7, 8 et 9. Les adultes sont élevées dans des cages avec accès permanent à du sucrose en solution (10%). Le repas infectieux est réalisé 5 à 8 jours après émergences des femelles (jour 15 après éclosion des œufs). Les différentes étapes de cette expérimentation sont résumées dans la Figure 27.

Le rôle de l'immunité dans la résistance



Figure 27 : Résumé des étapes d'élevage, d'infection et d'évaluation de l'infection des moustiques

2. Infection des femelles

Nous avons utilisé le sérotype 1 de DENV (provenant de Thaïlande) et le virus du CHIKV (provenant de la Réunion) pour réaliser l'infection. Pour obtenir un titre (quantité) de virus suffisant, une culture de cellules d'A. albopictus (C6/36) est réalisée. La culture cellulaire est inoculée avec le virus et incubée à 28°C avec 5% de CO₂. La moitié du milieu de culture cellulaire est remplacée par du milieu frais 7 jours après l'infection. 11 à 12 jours après infection, les virus en suspension sont récupérés et ajoutés au sang prélevé sur des lapins 24 h auparavant. Le titre exprimé en FFU (nombre de particules virales par unité de volume) est obtenu en utilisant des anticorps spécifiques et couplés à une molécule fluorescente. Le comptage est réalisé sous microscope à fluorescence en dénombrant les spots fluorescents. Les femelles sont préalablement privées pendant 24 h de nourriture et sont placées dans des gorgeurs par lots de 40 à 60 femelles. Le repas de sang infectieux est donné pendant 30 min à l'aide du système « hemotek, membrane feeding system ». Le FFU de chaque virus est de 5.10⁵ virus.mL⁻¹ Les femelles complétement gorgées sont endormies à l'aide de CO₂ pour être placées dans de nouvelles cages puis élevées comme décrit précédemment.

3. Compétence vectorielle

La compétence vectorielle de chaque femelle est testée 7 jours après l'infection pour la DENV et 10 jours après l'infection pour le CHIKV. Le test de la compétence vectorielle se fait en deux étapes :

- Les virus étant des virus à ARN, l'ARN présent dans le thorax et l'abdomen des femelles est extrait puis retrotranscrit en ADNc. Une PCR ciblant le génome des virus permet ensuite de déterminer si les tissus sont infectés ou non. Un couple d'amorce est utilisé pour mesurer la présence de l'ARN de chaque virus (DENV, 5'-GGAAGGAGGAGGAGGACTCCACA-3' et 5'-ATCCTTGTATCCCATCCGGCT-3'; CHIKV, 5'-AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG-3' et 5'-CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT-3'). Une amplification correspond à une femelle infectée alors que l'absence d'amplification correspond à une femelle saine. Les différences de proportion de femelles infectées entre chaque souche et chaque condition sont comparées à l'aide d'un test exact de Fisher réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007). Les intervalles de confiance (95%) des proportions sont calculés par la méthode de Newcombe (1998).

- Si la femelle est identifiée comme infectée, alors sa tête est utilisée pour quantifier le titre viral. Pour transmettre le virus, les glandes salivaires des femelles doivent être infectées. Tester l'infection et le titre viral au niveau de la tête est donc indispensable pour évaluer la transmission vectorielle potentielle. Le titrage viral dans les têtes est effectué comme précédemment décrit. Les différences de proportion de femelles infectées au niveau des glandes salivaires entre chaque souche et chaque condition sont comparées à l'aide d'un test exact de Fisher réalisé avec le logiciel R 3.2.1 (R, 2007). Les intervalles de confiance (95%) des proportions sont calculés par la méthode de Newcombe (1998).

4. Persistance du *Bti* au stade adulte

Pour mesurer la persistance du *Bti* au stade adulte, les larves ont été traitées comme décrit précédemment (pages 124-125, Chapitre 3). Les larves survivantes ont été élevées jusqu'à émergence des adultes. Les adultes mâles et femelles ont été élevés en conditions standardisées pendant 4 à 8 jours puis la préparation des échantillons et le comptage bactérien ont été réalisés comme décrit précédemment (pages 124-125, Chapitre 3).

B. Résultats

1. Proportion de femelles infectées

L'infection au CHIKV a été testée sur un total de 191 femelles. Pour chaque souche et chaque traitement (exposées ou non exposées), 31 à 32 femelles ont été testées avec une moyenne de 84,8% de femelles infectées (Figure 28). Aucune différence significative de la proportion de femelles infectées n'est observée entre les différentes souches non exposées au *Bti*. Seule la souche LR3Bti présente une augmentation significative du nombre de femelles infectées de 15.6% après exposition au *Bti*.

L'infection à la DENV a été testée sur un total de 185 femelles. Pour chaque souche et chaque traitement (exposé ou non exposée), 26 à 32 femelles ont été testées avec une moyenne de 65.6% de femelles infectées (Figure 28). Les souches non exposées ne présentent aucune différence significative de proportion des femelles infectées. L'exposition au *Bti* n'a pas d'effet sur la proportion de femelles infectées chez la souche sensible. En revanche, l'exposition au *Bti* des souches résistantes LR4A et LR3Bti entraine une augmentation significative de la proportion de femelles infectées de respectivement 21.5% et 37.5%.



Figure 28 : Proportion de femelles infectées dans chaque souche avec ou sans exposition au *Bti* pour les deux virus. Les proportions sont comparées à l'aide d'un test exact de Fischer (*, p-valeur<0.05; **, p-valeur<0.01 et ***, p-valeur<0.001). Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.

2. Proportion de femelles vectrices

Les têtes de toutes les femelles ayant une infection positive dans le thorax et l'abdomen sont utilisées. Chez la souche sensible, l'exposition au *Bti* entraine une augmentation significative de la proportion des femelles potentiellement vectrices du CHIKV parmi les femelles infectées, passant de 23% à 48% (Figure 29). Concernant la DENV, on observe une augmentation significative de la proportion de femelles potentiellement vectrices chez les femelles infectées de la souche LR3Bti passant de 27% sans exposition à 68% avec exposition au *Bti*.



Figure 29 : Proportion de femelles potentiellement vectrices dans chaque souche avec ou sans exposition au *Bti* pour les deux virus. Les proportions sont comparées à l'aide d'un test exact de Fischer (*, p-valeur<0.05 ; **, p-valeur<0.01 et ***, p-valeur<0.001). Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.

3. Persistance du *Bti* au stade adulte

Un total de 5 femelles et 13 mâles exposés au *Bti* au stade larvaire a été testé. Parmi ces individus, les bactéries de *Bti* sont absentes suggérant que l'infection ne perdure pas après l'émergence des adultes.

C. Discussion

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact de la résistance aux toxines Cry du *Bti* et l'impact de l'exposition larvaire au *Bti* sur l'infection virale à la DENV et au CHIKV chez *A. aegypti*. La diversité génétique des populations naturelles de moustiques et des pathogènes peut rendre l'étude de la compétence vectorielle difficile à cause de l'interaction qui existe entre les génotypes des vecteurs et des pathogènes (Lambrechts et al., 2005). Dans cette étude, nous avons l'avantage que les souches

résistantes aux *Bti* ou aux toxines du *Bti* sont issues de la sélection de la souche sensible. Les différentes souches utilisées partagent donc un fond génétique commun. Les différences de compétence vectorielle sont donc probablement reliées à la sélection des allèles permettant une meilleure résistance au *Bti* ou aux toxines du *Bti* (Alout et al., 2013).

Récemment, il a été montré qu'une souche d'*An. gambiae* résistante aux insecticides chimiques était plus sensible à une infection par *P. falciparum*. Il semble que les mutations kdr et ace-1, responsables de la résistance à certains insecticides chimiques, induisent une sensibilité accrue des souches résistantes à tous les stades de développement du parasite (Alout et al., 2013). Dans cette étude, nous n'avons mis en évidence aucun changement constitutif de compétences vectorielles entre les souches résistantes et la souche sensible. Ce résultat suggère que toutes les modifications constitutives observées chez les souches résistantes au stade larvaire (*e.g.* changement de l'activité phénoloxydase, transcription différentielle des gènes, etc.) n'ont pas d'effet sur la compétence vectorielle des adultes. Ainsi, contrairement à la résistance aux insecticides chimiques, les allèles conférant la résistance au *Bti* et aux toxines du *Bti* ne modifient pas la compétence vectorielle des souches résistantes.

L'effet de l'exposition aux insecticides sur la compétence vectorielle des moustiques a été peu étudié. Récemment, il a été montré que l'exposition au DDT ou au bendiocarbe de deux souches résistantes (mutation kdr ou ace-1) d'*An. gambiae* réduisait la sensibilité à l'infection de *P. falciparum* (Alout et al., 2014). Il a été suggéré que l'insecticide pouvait agir directement sur le parasite et ainsi réduire sa capacité d'infection. L'impact de l'exposition larvaire au *Bti* n'avait encore jamais été encore étudié. Nous avons observé dans cette étude un effet de l'exposition au *Bti* sur l'infection des femelles et leur compétence vectorielle potentielle qui s'exprime différemment selon les combinaisons virus-génotypes et selon le stade d'infection virale.

Chez le moustique, différents facteurs biotiques et abiotiques rencontrés au stade larvaire, comme la densité larvaire et la qualité/quantité de la nourriture, peuvent directement affecter la taille du corps, les réserves nutritives, la production d'œufs et la longévité des femelles (Alto et al., 2008a; Couret et al., 2014; Barrera, 1996;

Reiskind et Loubinos, 2009). De plus, des études ont montré que des facteurs de stress, tels que le surpeuplement larvaire, provoquent une diminution de la taille des femelles qui peut augmenter la compétence vectorielle des femelles aux arbovirus (Alto et al., 2008a, 2008b, 2005). L'exposition au *Bt* chez les insectes est connue pour induire des symptômes comme l'arrêt de la nutrition, la perte de poids et un développement plus long (Bravo et al., 2005). Dans notre étude, l'exposition au *Bti* se fait entre la fin du stade 3 larvaire et le début du stade 4. Le quatrième stade larvaire est particulièrement important pour acquérir les réserves nécessaires à la métamorphose et à la survie des femelles dans les premiers jours après émergence (Telang et al., 2007). L'exposition au *Bti* pourrait donc avoir un effet sur les réserves accumulées par les larves et affecter la tolérance des adultes aux arbovirus. Néanmoins, cela n'explique pas les différences d'infection observées entre les souches résistantes et la souche sensible.

Nous avons observé que la réponse à l'exposition au *Bti* chez la souche sensible induisait l'expression différentielle de plus de 400 gènes (pages 79-80, Chapitre 2). En outre, l'exposition au *Bti* ou à ses toxines induit des réponses différentes pour plusieurs traits, dont la transcription des ALPs (pages 83-85, Chapitre 2) et l'activité des phénoloxidases et des lysozymes (pages 123-124, Chapitre 3). La sélection de résistance au *Bti* ou aux toxines séparées semble donc induire une réponse spécifique à l'exposition au *Bti*. Il a été montré que si les larves d'*A. aegypti* sont exposées à *E. coli*, les adultes présentent une meilleure survie lors d'une seconde infection que ceux dont les larves n'ont pas été exposées (Moreno-García et al., 2015). Ces résultats montrent qu'une infection durant le stade larvaire peut modifier la réponse à une seconde infection au stade adulte. Etant donné que les souches résistantes et sensible ne réagissent pas de la même façon à une exposition au *Bti* au stade larvaire, ces différences pourraient persister au stade adulte et expliquer les différences d'infection entre les différentes souches.

Notre étude montre pour la première fois qu'une exposition à un insecticide au stade larvaire peut affecter la capacité vectorielle des moustiques au stade adulte. Toutefois, il est difficile de déterminer ce qui est responsable de ce changement. En effet, une altération de la voie de signalisation Toll chez l'adulte, induisant une sous-expression de certaines AMPs (cécropines et défensines), pourrait expliquer une sensibilité accrue à la DENV (Xi et al., 2008). Aussi, au vu de la complexité du mode

d'infection de la DENV chez le moustique (Cruz-Oliveira et al., 2014) (page 9-10, Introduction), d'autres facteurs tels qu'une expression différentielle des récepteurs au virus sur la membrane des cellules épithéliales pourrait aussi expliquer la sensibilité accrue chez les femelles résistantes au *Bti* et à ses toxines Cry (Mercado-Curiel et al., 2008). Enfin, il a été démontré que la composition du microbiote intestinal peut moduler la compétence vectorielle des adultes pour les arbovirus (Hegde et al., 2015). Nous avons montré que le *Bti* ne persiste pas, après exposition des larves, au stade adulte. Ce résultat est en accord avec une autre publication démontrant qu'*E. coli* ne persiste pas non plus au stade adulte (Moreno-García et al., 2015). La persistance du *Bti* au stade adulte ne peut donc pas expliquer les différences de compétences vectorielles observées. Néanmoins, il serait intéressant de vérifier que l'exposition au *Bti* au stade larvaire n'affecte pas différentiellement le microbiote des souches au stade adulte. Pour cela, il est possible de dénombrer les bactéries cultivables présentes dans le microbiote des adultes et de les comparer entre les différentes souches.

Discussion générale et perspectives

Le moustique, à l'origine de nuisances et de maladies, est un fardeau économique et sanitaire pour les sociétés humaines. L'utilisation d'insecticides chimiques fait partie des nombreuses stratégies mises en œuvre pour lutter contre cet insecte. Ces insecticides sont très rémanents dans l'environnement, peu spécifiques des insectes ciblés et ont conduit à l'apparition de nombreux cas de résistance à travers le monde. Dans ce contexte, le *Bti (Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*), plus respectueux de l'environnement, est de plus en plus utilisé à travers le monde. Dans certains pays comme la France il est le seul larvicide autorisé et commercialisé pour la lutte antimoustique au stade larvaire. Dans cette situation de quasi-monopole et connaissant la capacité des moustiques à s'adapter rapidement à de fortes pressions de sélection, il est nécessaire de mieux comprendre son mode d'action et les mécanismes de résistances développés par les insectes.

L'objectif de ma thèse a été d'améliorer nos connaissances sur le mode d'action du *Bti* et des différentes toxines qui le composent. Pour y parvenir, j'ai utilisé plusieurs méthodes de transcriptomique, de génomique et de quantification de l'activité de certaines enzymes sur des souches d'*A. aegypti* sélectionnées en laboratoire et résistantes à chacune des toxines du *Bti*. Le but étant d'identifier des gènes candidats à la résistance pour mieux prévenir l'apparition de résistance en population naturelle.

I. Caractérisation de la résistance

Pour étudier les mécanismes de la résistance aux toxines Cry et au *Bti,* nous avons utilisé une approche permettant de quantifier les différences de transcription constitutive ainsi que les différences de fréquences alléliques de tous les gènes exprimés chez les larves des différentes souches. Ensuite nous avons exposé au *Bti* les larves sensibles au *Bti* pour analyser l'induction de la transcription des gènes. Cette expérience nous a permis d'observer une forte réponse des gènes correspondants à des phosphatases alcalines (ALPs) et d'évaluer leur induction après exposition chez les souches résistantes. Enfin nous avons comparé le statut immunitaire des différentes souches et leur réponse à l'exposition au *Bti*.

A. La méthode RNA-seq

L'étude de la transcription des gènes à l'aide de la méthode RNA-seq présente plusieurs avantages. Cette méthode permet de couvrir la majorité des gènes exprimés chez l'organisme étudié et d'évaluer l'abondance des transcrits de chaque gène. Ainsi, il est possible de comparer l'abondance des transcrits d'un gène entre deux souches différentes et d'évaluer la différence de transcription. De plus, à la différence des méthodes de transcriptomiques plus anciennes (microarrays, DGETP, etc.), cette méthode permet d'avoir accès aux polymorphismes présents dans la population et ainsi d'estimer la fréquence de chaque allèle. Cette méthode, devenant de plus en plus abordable, apporte donc une importante quantité d'informations permettant de caractériser par exemple les mécanismes potentiels impliqués dans la résistance aux insecticides. Néanmoins elle présente aussi quelques défauts, tels que la sur-estimation de la fréquence d'allèles présents sur le génome de référence (Stevenson et al., 2013). En effet, lors de l'alignement des lectures sur le génome de référence, nous avons autorisé un maximum de trois bases qui ne correspondent pas au génome de référence pour éviter les faux alignements. Ceci peut entrainer, lorsque plusieurs bases proches sont différentes du génome, l'élimination de la lecture localisée sur ces bases. Ainsi, la proportion des lectures les plus fidèles au génome de référence ainsi que les allèles correspondant au génome de référence vont être surestimés au détriment d'allèles plus rares ou spécifiques de la souche étudiée. Bien que les fréquences alléliques obtenues en RNA-seq soient globalement proches de celles obtenues en validation par séguençage d'ADN, cet effet pourrait expliquer les différences de fréquences alléliques que nous avons observées. D'autres facteurs comme l'expression aléatoire d'un seul allèle sur les deux versions présentes dans le génome pourrait aussi expliquer ces différences (Gimelbrant et al., 2007).

Enfin, une dernière limitation de ces méthodes qui n'est pas inhérente au RNA-seq, est la qualité de l'annotation de génome de référence. Le génome de référence d'*A. aegypti* a été annoté automatiquement et plus de 44% des gènes sont annotés en tant que « protéines hypothétiques ». Il est donc impossible de conclure sur le rôle potentiel d'une grande partie des gènes contenant des modifications de séquences ou de transcription.

B. Quels mécanismes mis en jeu ?

Les deux mécanismes majeurs identifiés pour résister aux toxines Cry produits par les différentes sous-espèces de *Bt* sont : (1) la modification des enzymes digestives pouvant altérer la vitesse d'activation des toxines, dégrader les toxines ou entrainer une différence dans la taille de la toxine réduisant sa toxicité, ou (2) la sous-expression ou la modification des récepteurs aux toxines Cry entrainant une diminution de la fixation des toxines. Les différentes approches utilisées dans cette thèse suggèrent que la résistance sélectionnée aux trois toxines Cry implique principalement les récepteurs membranaires.

1. Implication des récepteurs

a) Des récepteurs communs ?

Les récepteurs potentiellement impliqués présentent soit une diminution constitutive (chez une souche résistante par rapport à une souche sensible) ou induite (chez des individus exposés au Bti par rapport à des individus non exposés) de leur expression, soit des mutations non synonymes de leur séquence génomique. Les différentes souches résistantes présentent des résistances croisées aux toxines Cry du Bti ce qui suggère que des modifications communes de certains récepteurs pourraient participer à ces résistances. Ainsi, nous avons vu que l'ALP AAEL003905 est sous sélection directionnelle chez toutes les souches résistantes et présente différentes combinaisons de mutations non synonymes selon la souche résistante. De plus, une baisse de la diversité nucléotidique chez les individus sensibles (souche Bora) les plus tolérants à Cry4Ba, Cry11Aa et au Bti a été observée, suggérant que ce gène est sous sélection dès la première génération de traitement insecticide. Tout comme la sous-expression globale des ALPs chez plusieurs souches de lépidoptères résistantes au Bt apparait comme un bon marqueur de la résistance (Jurat-Fuentes et al., 2011), ce gène pourrait être un bon indicateur d'une pression de sélection exercée par le Bti et/ou ses toxines. De même, des mutations non synonymes présentes dans 2 glycosides hydrolases (AAEL009243 et AAEL015021) et 3 alphaamylases (AAEL010537, AAEL010537 et AAEL010540) apparaissent dans toutes les souches résistantes. La modification de ces gènes pourrait également participer à la résistance aux différentes toxines Cry. Enfin, la sous-transcripiton de trois

glycosides hydrolases (AAEL009237, AAEL015573 et AAEL015020) dans les souches résistantes à une toxine pourrait aussi participer à la résistance (Després et al., 2014; Tetreau et al., 2012b).

b) Des récepteurs spécifiques ?

Chaque souche résistante à une toxine présente un niveau de résistance à sa toxine de sélection supérieure à la résistance aux autres toxines. Ce résultat suggère que chaque souche a développé, en plus des mécanismes de résistance permettant un certain niveau de résistance croisée aux autres toxines, des mécanismes de résistance toxine-spécifiques.

(1) La résistance à Cry4Aa

Le mécanisme d'action de la toxine Cry4Aa et les récepteurs potentiels à Cry4Aa sont très peu connus. Seulement une étude rapporte que les différentes toxines Cry du Bti pourraient partager des récepteurs communs (de Barros Moreira Beltrão et Silva-Filha, 2007). La souche résistante à Cry4Aa (LR4A) est celle qui présente le plus fort niveau de résistance parmi les souches étudiées (> 10.000 fois). L'ALP AAEL003286+AAEL003317 a été initialement identifiées comme candidate à la résistance chez la souche LiTOX, principalement résistante à Cry4Aa (72 fois), car ce gène présentait une forte sous-transcription constitutive (-7.6 fois) (Després et al., 2014). Dans l'article 3 (Chapitre 2), nous avons vu que ce gène était fortement sous exprimé chez la souche LR4A en réponse à une exposition à Cry4Aa (-4.5 fois en comparaison avec la souche sensible exposée à Cry4Aa). L'inhibition de la transcription de l'ALP AAEL003286+AAEL003317, par la méthode de RNAi, a permis d'induire une hausse de 11% de la tolérance des larves à Cry4Aa. Ce résultat suggère que ce gène participe au mode d'action de Cry4Aa, mais cette augmentation de la tolérance n'explique pas les forts niveaux de résistances à Cry4Aa. La résistance à Cry4Aa semble donc être mutligénique.

Les APNs AAEL007204 et AAEL007201 présentaient des mutations non synonymes chez la souche LiTOX, principalement résistante à Cry4Aa (72 fois) (Després et al., 2014). Nous avons retrouvé 3 mutations (dont 2 fixées) chez la souche LR4A parmi les 4 trouvées dans la souche LiTOX. Le séquençage a permis de confirmer que ces gènes sont fortement sous sélection directionnelle chez la souche LR4A et que les

individus les plus résistants à Cry4Aa de la souche LR4B possèdent une mutation dans le gène AAEL007201 qui est fixée. Ces deux gènes apparaissent donc également comme de bons candidats à la résistance à Cry4Aa.

(2) La résistance à Cry4Ba

Le mode d'action de Cry4Ba est encore peu connu, néanmoins deux études ont validé, par la méthode de RNAi, le rôle de 3 APNs et une ALP dans la toxicité de Cry4Ba (Jiménez et al., 2012; Saengwiman et al., 2011). La souche LR4B ne présente aucune modification de la transcription et/ou de la séquence génétique de ces gènes. La souche LR4B présentant de forts niveaux de résistances croisées avec les autres toxines Cry du Bti, il est difficile de séparer les mécanismes de résistance spécifiques de ceux impliqués dans la résistance croisée. Néanmoins, L'APN AAEL005821 présente une mutation non synonyme fixée uniquement chez LR4B. Cette mutation affecte un acide aminé présent à la surface de la protéine. De plus, ce gène présentait déjà trois mutations non synonymes chez la souche LiTOX différentes de celle trouvée dans la souche LR4B (Després et al., 2014). Cette mutation spécifique de LR4B pourrait donc réduire l'affinité de Cry4Ba à ce récepteur potentiel et contribuer à la résistance. Aussi, parmi les glycosides hydrolases soustranscrites chez les souches résistantes à une toxine, une (AAEL015020) présente une forte sous-transcription chez LR4B (-6.2 fois) et dans une moindre mesure chez LR4A (-2.5 fois). Cette glycoside hydrolase pourrait donc également participer à la résistance spécifique à Cry4Ba.

(3) La résistance à Cry11Aa

Deux souches d'*A. aegypti* ont été sélectionnées à Cry11Aa : LR11 lors de ma thèse au LECA et SSC11 par le Pr S.S. Gill à l'Université de Californie, Riverside. Néanmoins, la méthode de sélection diffère entre ces deux souches. Les mâles adultes de la souche SSC11 ont été nourris avec du sucre contenant du méthanesulfonate d'éthyle, agent mutagène permettant de générer aléatoirement des mutations dans le génome (Lee et al., 2014) alors que les adultes de la souche LR11 n'ont été nourris qu'avec du sucre. Chez LR11, on s'attend donc à avoir une sélection sur la diversité génétique initialement présente dans la population alors que chez la souche SSC11 la sélection peut être faite sur des mutations générées

artificiellement. Cette différence de méthode de sélection peut expliquer pourquoi sur les 223 gènes détectés comme différentiellement transcrits (+/-2 fois de différence de transcription avec la souche sensible et p-valeur < 0.05) chez la souche SSC11 seulement 16 gènes sont aussi détectés (+/- 1.5 fois de différence de transcription avec la souche sensible et p-valeur < 0.05) chez la souche LR11. Néanmoins, parmi les gènes sous-transcrits chez les deux souches, on note la présence de 2 ABC transporteurs (AAEL012700 et AAEL013883) et 2 APNs (AAEL008158 et AAEL008162). Ces protéines étant de potentiels récepteurs aux toxines Cry, il est probable que leur sous-transcription soit impliquée dans la résistance à Cry11Aa (Lee et al., 2014). Néanmoins, les niveaux de résistances de ces deux souches étant modérés (environ 100 fois), les mécanismes de résistance ne semblent donc pas être fixé et/ou ne permettent pas d'atteindre de forts niveaux de résistance.

Chez la souche SSC11 ils n'ont pas étudié les différences de fréquences alléliques entre la souche résistante et la souche sensible. Il est donc impossible de vérifier si les mutations ou les gènes trouvées sous sélection chez LR11 sont les mêmes que chez SSC11.

c) Conclusion sur l'implication des récepteurs

Comme chez les lépidoptères et les coléoptères (Pardo-López et al., 2013), la modification des récepteurs apparait donc comme le mécanisme de résistance principal pour résister aux toxines Cry du *Bti*. Dans mes travaux de thèse, nous avons vu que les récepteurs peuvent présenter des mutations non synonymes, modifiant la séquence protéique, ce qui pourrait réduire leur affinité pour les toxines. Aussi les récepteurs peuvent être sous-transcrits de façon constitutive par rapport à la souche sensible ou de façon induite en réponse à une exposition au *Bti* ou aux toxines Cry du *Bti*, réduisant ainsi la fixation des toxines aux cellules épithéliales. Néanmoins, pour déterminer leur implication dans la résistance plusieurs approches de validation fonctionnelle peuvent être envisagées (page 149-153, Discussion générale et perspectives). Aussi, nos résultats montrent que chaque souche résistante présente plusieurs modifications de récepteurs potentiels pouvant expliquer la résistance. Ces résultats soulèvent la question suivante : la résistance à une toxine est-elle multigénique ? Dans le cas de LR4A, nous avons vu que l'inhibition de l'expression d'une ALP induit une meilleure tolérance (-11% de

mortalité) à Cry4Aa mais ne suffit pas à expliquer la totalité phénotype de résistance, suggérant que la résistance est multigénique. En ce qui concerne Cry4Ba et Cry11Aa, plusieurs études ont montré que l'inhibition de certains récepteurs entraine une meilleure tolérance à ces toxines (Jiménez et al., 2012; Lee et al., 2015; Saengwiman et al., 2011). Néanmoins cette augmentation de tolérance reste modérée (20 à 80% de mortalité en moins) suggérant que plusieurs récepteurs sont impliqués dans le mode d'action de chaque toxine. Il est aussi possible que la combinaison de modifications dans plusieurs récepteurs ait un effet synergique expliquant les forts niveaux de résistance. Pour tester cette hypothèse il serait nécessaire d'évaluer par des méthodes de validation telle que le RNAi si l'inhibition conjointe de deux gènes entraîne une plus forte tolérance que l'addition de l'effet de l'inhibition de chaque gène.

La souche LR3Bti ne présente pas d'évolution de la résistance aux toxines Cry après 9 générations de sélections supplémentaires depuis la génération 5. Ce résultat semble s'expliquer par le fait que la sélection au *Bti* ne semble pas sélectionner de modifications des récepteurs potentiels spécifiques à chaque toxine Cry. La modification des récepteurs, mécanisme le plus répandu pour résister à une toxine individuellement, n'est probablement pas le plus approprié pour résister à un cocktail de toxines dont l'une peut servir de récepteurs aux trois autres toxines (Elleuch et al., 2015; Pérez et al., 2005). Cette hypothèse est confortée par le fait que les souches sélectionnées à une toxine Cry sont faiblement résistantes au *Bti* (inférieur à 2 fois), confirmant que la toxine Cyt restaure la toxicité des toxines Cry chez des souches résistantes (Wirth et al., 1997).

La résistance modérée de la souche LR3Bti aux différentes toxines Cry pourrait s'expliquer par les modifications des récepteurs communes aux différentes souches sélectionnées. Néanmoins, il est difficile de déterminer si ces mutations sont sélectionnées pour mieux tolérer au *Bti.* En effet, la souche LR3Bti étant un mélange des différentes souches résistantes à une toxine, il est difficile de savoir si la présence de ces mutations est due à la forte proportion initiale de ces mutations chez toutes les souches résistantes à une toxine. Outre ces mutations communes, la résistance de la souche LR3Bti pourrait être attribuée à d'autres mécanismes partagés par les différentes souches.

2. Une modification des gènes cuticulaires ?

Toutes les souches résistantes ont montré une sur-transcription des gènes associés à la chitine, constituant de la cuticule. 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, on retrouve aussi de la chitine dans la membrane péritrophique qui sépare le contenu intestinal des cellules épithéliales (Terra, 2001). Cette membrane agit comme une barrière contre les agents pathogènes (Lehane, 1997) et la chitine est nécessaire pour maintenir cette fonction (Kelkenberg et al., 2015). Pour infecter l'insecte, le Bt doit passer cette membrane et il est proposé que la production de chitinases par la bactérie provoque des perforations dans la membrane pour faciliter le passage des bactéries et des spores (Liu et al., 2009). Une modification de la composition de la membrane péritrophique pourrait la rendre moins sensible aux chitinases produites par le Bt et ainsi limiter la colonisation de la larve par la bactérie, tel qu'observé chez les souches résistantes. En effet, il a été suggéré qu'une protéine associée à la cuticule possédant un domaine de fixation de type pérotrophine-A pouvait protéger la chaine de chitine de la dégradation des chitinases en se fixant aux extrémités de la chaine (Wijffels et al., 2001). De plus, la sur-production de protéines cuticulaires pourrait entrainer l'imperméabilisation de la membrane, rendant l'insertion des toxines plus difficiles. Pour identifier les gènes potentiellement impliqués dans ce mécanisme, nous avons recherché des protéines associées à la chitine contenant un domaine à péritrophine-A, dont certaines sont connues pour être exprimées dans l'intestin (Jasrapuria et al., 2010). A contrario, les gènes codants pour des protéines associées à la cuticule contenant des motifs de fixation RR ne sont pas connus pour être exprimés dans l'intestin des larves d'insectes (Dittmer et al., 2015). Cependant, aucune étude n'est disponible sur la spécificité de l'expression tissulaire des gènes associés à ces protéines chez les larves de moustiques. Nous avons donc croisé les données d'expression des gènes sur-transcrits en RNA-seq avec celles obtenues par microarrays à partir d'intestins de larves (Tetreau et al., 2012b), (Tableau 7). Parmi ces gènes, les deux gènes AAEL004798 et AAEL002492 sont constitutivement surtranscrits chez toutes les souches résistantes (entre 1.53 fois et 7.62 fois) et sont

induites chez la souche sensible après exposition au *Bti*. Ces deux gènes sont donc particulièrement intéressants à valider pour confirmer ou infirmer notre hypothèse. En premier lieu, on pourrait essayer de déterminer l'influence des chitinases dans la toxicité du *Bti*. Pour ce faire, il faudrait purifier les cristaux protéiques contenant les toxines afin de les séparer des spores et exposer les larves aux cristaux avec ou sans chitinases exogènes. Aussi l'inhibition par la méthode de RNAi de certaines protéines associées à la chitine pourrait déterminer le rôle de chacune de ces protéines dans la tolérance au *Bti*.

Tableau 7 : Gènes cuticulaires retrouvés sur-transcrits chez au moins une souche résistante, exprimés dans les intestins de larves et/ou contenant un domaine à péritrophine-A.

Identifiant	Fonction	Bora exposée au Bti	LR4A	LR4B	LR11	LR3Bti
AAEL015364	Protéine associée à la chitine (RR)	-1.43	2.14	1.48	-1.00	1.39
AAEL004776	Protéine associée à la chitine (RR)	-1.06	3.65	2.04	2.03	2.18
AAEL004764	Protéine associée à la chitine (RR)	1.16	2.19	1.42	1.95	1.91
AAEL007192	Protéine associée à la chitine (RR)	1.50	2.31	1.67	1.75	2.01
AAEL002110	Protéine associée à la chitine (RR)	1.53	2.13	1.53	1.66	2.02
AAEL003239	Protéine associée à la chitine (RR)	2.73	2.29	1.74	-1.28	1.11
AAEL004798	Protéine associée à la chitine (péritrophine-A)	4.89	2.49	2.93	2.90	1.53
AAEL002492	Protéine associée à la chitine (péritrophine-A)	7.60	7.62	5.20	5.83	4.41

3. Une modification de l'immunité ?

La réponse immunitaire face à une infection au *Bt* chez différentes espèces mobilise la réponse humorale et cellulaire (Behrens et al., 2014; Bel et al., 2013; Crava et al., 2015; Grizanova et al., 2014; Hernández-Martínez et al., 2010; Rodríguez-Cabrera et al., 2008; Yao et al., 2014). Plusieurs études ont suggéré que l'immunité pouvait être responsable d'une partie de la résistance au *Bt* chez les insectes (Ma et al., 2005; Rahman et al., 2004).. Dans cette thèse, nous avons observé des modifications des activités phénoloxidases et lysozymes ainsi que de la prolifération du *Bti* dans les souches résistantes. Une modification de l'immunité est donc associée au phénotype de résistance. Cependant, il est difficile de déterminer si l'immunité joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de résistance au *Bti* et à ses toxines ou si c'est une conséquence des coûts sur la fitness liés à cette résistance. Pour aller plus loin, il faudrait étudier la différence de réponse des gènes immunitaires de type AMP entre
la souche sensible et les souches résistantes. Après identification des gènes qui répondent fortement à l'exposition au *Bti* chez les souches résistantes, il faudrait produire et purifier ces AMPs et tester leur activité sur le *Bti* et les différentes bactéries de la flore intestinale. Ce type d'expérience est néanmoins lourd à réaliser. Enfin, il est prévu de tester l'activité phagocytaire des différentes souches pour déterminer le rôle potentiel des phagocytes dans la résistance au *Bti*.

4. Autres modifications

L'étude du protéome d'une souche sensible, exposée à Cry11Aa a révélé la modification de l'expression de plusieurs protéines (Cancino-Rodezno et al., 2012). Parmi ces protéines, une protéine de choc thermique (hsp90) AAEL011704 a été trouvée sous-exprimée après exposition à Cry11Aa. De plus, son inhibition par ARN interférant induit une augmentation de la tolérance de plus de 4 fois. Chez nos souches résistantes, ce gène est sous-transcrit 1.5 fois chez toutes les souches. Cette protéine semble avoir un rôle important dans la stabilisation du signal anti-apoptotique et dans la biogénèse de certains récepteurs membranaires (Taipale et al., 2010). La diminution de l'expression de cette hsp pourrait donc permettre d'induire plus rapidement la mort cellulaire en présence de toxines pour pouvoir remplacer les cellules affectées et/ou altérer l'assemblage des récepteurs membranaires aux toxines Cry (Cancino-Rodezno et al., 2012).

Parmi les gènes aux fonctions inconnues, deux gènes AAEL013584 et AAEL010435 sont fortement sur-transcrits (de 2.3 à 8.5 fois) constitutivement chez toutes nos souches résistantes par rapport à la souche sensible. La sur-transcription de ces gènes a aussi été trouvée chez la souche LiTOX sur larves entières ou sur intestins (Després et al., 2014; Tetreau et al., 2012b), de plus ces gènes sont fortement induits chez la souche sensible exposée au *Bti*. Ces gènes codent pour des protéines présentant une forte homologie pour des protéines G_{12} d'*A. aegypti* (77% d'identité de séquence protéique) (Tetreau, 2012). Ces protéines régulent de nombreuses fonctions dans les cellules, telles que les échanges Na+/H+, la synthèse d'ADN ou la prolifération des cellules (Riobo et Manning, 2005; Vega-Cabrera et al., 2014). Les protéines G_{12} peuvent également interagir avec le domaine cytoplasmique des cadhérines et entrainer un relargage de β -catenines, induisant une perte importante de la fonction de jonction cellulaire des cadhérines (Meigs et

al., 2002). Les cadhérines ont été montrées comme ayant un rôle dans la toxicité de Cry11Aa chez *A. aegypti* et de Cry4Ba chez *An. gambiae* (Ibrahim et al., 2013; Hua et al., 2008; Lee et al., 2015). De même que chez la souche SSC11 sélectionnée à Cry11Aa (Lee et al., 2014), nous n'avons trouvé aucune modification de l'expression ou de la séquence des cadhérines dans nos souches résistantes. Ainsi, l'implication des cadhérines dans la résistance pourrait passer par une voie détournée via les protéines G_{12} . La surexpression de ces protéines pourrait entrainer une baisse du nombre de cadhérines fonctionnelles à la surface de la cellule, diminuant la possibilité de fixation des toxines Cry.

5. Conclusion

Les différentes approches utilisées durant cette thèse ont permis de mettre en évidence une résistance qui semble multigénique à chaque toxine Cry et au *Bti*. La résistance développée au laboratoire par les souches sélectionnées apparait donc complexe combinant des mécanismes de résistance spécifiques et généralistes (Figure 30). Parmi ces mécanismes, la modification des récepteurs semble être le mécanisme de résistance principal pour résister aux toxines mais n'apparait pas avoir un rôle dans la résistance au *Bti* (Figure 30-b, c). Ainsi, d'autres mécanismes plus géneraux tels qu'une modification de la composition de la membrane péritrophique (Figure 30-d) ou une défense immunitaire plus spécifique de l'infection par du *Bt* pourraient également permettre une meilleure tolérance au *Bti* (Figure 30-e). Enfin, les hypothèses concernant les récepteurs impliqués ou les différentes voies qui peuvent être impliquées dans la résistance restent spéculatives et nécessitent d'être validées par des expériences complémentaires.



Figure 30: (a) Représentation du mode d'action des toxines Cry, de la prolifération du *Bti* dans l'hémolymphe et des mécanismes de résistance potentiels. (b) Les récepteurs peuvent être sousexprimés ou leur séquence protéique changée, induisant une plus faible fixation des toxines. (c) L'exposition des souches résistantes à leur toxine de sélection entraine une induction de deux groupes d'ALPs (flèches vertes et violettes) différentes par rapport à la souche sensible, pouvant contribuer à la résistance. (d) La modification de la membrane péritrophique peut altérer la fixation des toxines aux cellules épithéliales et/ou la rendre moins sensibles aux chitinases produites par le *Bti*. (e) Les souches résistantes peuvent avoir une modification des facteurs immunitaires permettant une meilleure tolérance à l'infection par le *Bti*.

C. Quelles perspectives ?

1. Une approche protéomique

Durant cette thèse, nous avons identifié plusieurs récepteurs potentiels aux toxines Cry. Pour compléter la liste de gènes candidats identifiés par la méthode de RNAseq, la technique de « ligand blot » est très adaptée. En effet, à la différence des données obtenues en transcriptomique, cette technique permet de prendre en compte les modifications post-traductionnelles des protéines.



Figure 31 : Principe de la technique de « ligand blot ». Les protéines migrent en fonction de leur taille et de leur point isoélectrique (étape 1). Les points bleus représentent les protéines ayant migré dans le gel. Les toxines Cry se fixent à leur récepteur (étape 2) puis sont détectées par des anticorps anti-Cry (étape 3) couplés à une protéine permettant leur détection. Les points noirs représentent les protéines révélées par la technique de ligand blot. Figure reprise de (Tetreau, 2012).

Pour cela, il faut extraire les intestins et les broyer dans un tampon contenant des inhibiteurs des protéases pour éviter la dégradation des protéines d'intérêt. Après broyage, une technique de précipitation du broyat par les ions magnésium permet de former spontanément des vésicules de membranes intestinales (BBMV pour Brush Border Membrane Vesicle). Cette technique permet d'isoler les protéines de la membrane des cellules intestinales de toutes les protéines cytoplasmiques qui n'ont que peu d'intérêt dans la recherche des récepteurs protéiques aux toxines Cry. Les protéines contenues dans les BBMVs sont ensuite purifiées et utilisées pour réaliser un gel en 2-dimensions permettant de séparer les protéines selon leur taille et leur point isoélectrique (Figure 31, étape 1). Pour chaque souche testée, il faut réaliser

plusieurs gels, l'un est destiné à être coloré pour révéler l'intégralité des protéines présentes dans les BBMV et les autres (3 à 4 réplicats) sont destinés à un transfert des protéines sur une membrane. Cette membrane va être mise en présence des toxines qui vont ainsi pouvoir se fixer sur les récepteurs (Figure 31, étape 2). Une fois les toxines fixées, la membrane est mise en présence d'anticorps spécifiques (couplés à une protéine fluorescente par exemple) des toxines Cry qui vont révéler la fixation des toxines (Figure 31, étapes 3 et 4). Il faut alors comparer les gels provenant des souches résistantes avec ceux provenant de la souche sensible. Ainsi, il est possible d'identifier les récepteurs absents ou qui ne fixent plus les toxines dans les souches résistantes. Dès lors, nous pouvons exciser la protéine d'intérêt sur le gel en 2-dimensions non transféré et identifier la protéine par spectrométrie de masse. Pour valider spécifiquement l'implication des ALPs dans la fixation des toxines Cry et dans la résistance, il est possible de réaliser la même expérience en purifiant au préalable les ALPs par immunoprécipitations à l'aide d'anticorps anti-ALPs. Cette technique n'est néanmoins pas présente au LECA, mais nous collaborons avec le laboratoire de Pr. Michael Adang (Université de Georgia Etats-Unis) qui réalise ce genre d'expérience en routine et possède les anticorps nécessaires à la réalisation de cette manipulation.

2. Les techniques de validation

a) Le RNAi

Lors de ma thèse, j'ai utilisé la technique d'ARN interférant pour valider l'implication de certaines protéines dans la toxicité des toxines Cry. Ces protéines étant exprimées dans l'intestin, nous avons choisi d'utiliser une méthode non invasive d'ingestion par les larves de dsRNA spécifique de certains gènes. À ce jour, trois méthodes pour inhiber l'expression des gènes par RNAi ont été développées :

- La première méthode consiste à nourrir pendant 16 heures des larves de stade 1 avec le dsRNA encapsulé dans un agent de transfection (*e.g.* effectene, QIAGEN), qui va faciliter la pénétration du dsRNA dans les cellules. Cette méthode a été utilisée à plusieurs reprises avec succès pour valider l'implication de récepteurs et autres protéines dans le mode d'action des toxines Cry chez *A. aegypti* (Cancino-

Rodezno et al., 2012; Jiménez et al., 2012). L'agent de transfection étant très onéreux d'autres techniques plus abordables ont été utilisées durant ma thèse.

- La deuxième méthode consiste à faire éclore les œufs directement dans un petit volume contenant le dsRNA à différentes concentrations. Cette méthode présente l'avantage de réhydrater les œufs directement dans une solution contenant le dsRNA facilitant sa pénétration dans les cellules mais suppose que l'effet du dsRNA va perdurer tout le long des stades larvaires. Cette technique a été utilisée avec succès pour inhiber l'expression d'un transporteur de la méthionine essentielle pour le développement du moustique (Meleshkevitch et al., 2013). J'ai utilisé cette méthode durant ma thèse pour valider l'implication de 4 gènes (une ALP, AAEL003317+AAEL003286; une protéine G₁₂, AAEL010435; une métalloprotéase, AAEL007938 et une glycoside hydrolase, AAEL015573) identifiés comme candidats potentiels à la résistance chez la souche LiTOX. Après mesure de l'expression des gènes, je n'ai pas obtenu une inhibition significative et reproductible de leur expression. En revanche, j'ai pu observer un phénotype de développement plus lent chez les larves exposées au dsRNA spécifique du gène de la glycoside hydrolase AAEL015573. Cette technique semble donc fonctionner pour certains gènes néanmoins, pour pouvoir tester l'effet de l'inhibition d'un gène sur le phénotype de tolérance, il est nécessaire que les larves soient de même stade. Le développement plus lent des larves après inhibition du gène AAEL015573 ne nous permettait pas d'avoir des larves témoins du même stade.

- La dernière technique, utilise la capacité du chitosane à former des nanoparticules avec l'ARN, permettant ainsi aux larves de les ingérer (Zhang et al., 2015). Les nanoparticules sont mélangées à de la nourriture (levure et paillettes pour poisson) puis données aux larves du premier au dernier stade larvaire. Cette méthode a été utilisée avec succès chez *An. gambiae* et *A. aegypti* pour inhiber respectivement une chitine synthase et un facteur de transcription (Zhang et al., 2015). J'ai utilisé cette méthode durant ma thèse pour valider l'implication de 6 gènes (deux ALPs, AAEL003317+AAEL003286 et AAEL003905 ; deux APNs, AAEL008158 et AAEL007204 ; une alpha amylase, AAEL01532 et une glycoside hydrolase, AAEL015020) identifiés comme candidats potentiels à la résistance chez les souches sélectionnées à une toxine. Parmi ces gènes, seul AAEL003317+AAEL003286 a donné des résultats montrant une inhibition significative et reproductible de son

expression. Récemment, il a été observé qu'utiliser des nanoparticules de carbone à la place de la chitosane pouvait améliorer l'inhibition de l'expression de certains gènes (Das et al., 2015).

Nos résultats sont en accord avec le fait que l'efficacité de l'inhibition de l'expression de gènes par RNAi est très variable selon le gène testé, le mode d'administration du dsRNA et l'espèce étudiée. En effet, sur les 9 gènes testés, seulement un présente une inhibition significative et reproductible. Pour améliorer cette technique de validation fonctionnelle, plusieurs facteurs peuvent être pris en compte. Lors de cette thèse, j'ai utilisé un seul dsRNA par gène de taille variant de 150 à 800 paires de bases. Or, on sait que la taille du dsRNA peut influencer l'efficacité de l'inhibition différemment selon l'insecte et le gène testé (Bolognesi et al., 2012). Il a aussi été montré chez A. aegypti une meilleure efficacité du dsRNA ciblant la partie 3' d'un gène que ceux ciblant la partie centrale ou 5' (Pridgeon et al., 2008). Pour chaque gène d'intérêt il est donc nécessaire de tester plusieurs séquences de dsRNA afin de maximiser les chances de réussite. Aussi, les doses de dsRNA nécessaires pour inhiber l'expression de chaque gène peuvent être différentes selon l'abondance du transcrit et la stabilité de son expression dans le temps (Scott et al., 2013). Il est donc nécessaire de tester une gamme de doses plus large pour augmenter les chances de réussite.

En conclusion, la technique utilisant les nanoparticules de chitosane-dsRNA apparait opérationnelle pour tester l'implication d'un gène dans la résistance au *Bti* ou aux toxines Cry. Néanmoins, chaque gène doit être considéré comme un cas indépendant des autres gènes et la méthode doit être recalibrée sur chaque gène. Il est nécessaire de tester les conditions optimales (concentrations, temps d'exposition, différentes tailles de dsRNA) pour obtenir une inhibition efficace et reproductible pour chaque gène.

b) L'expression en système hétérologue

Pour aller plus loin dans la caractérisation des récepteurs membranaires, les différentes protéines peuvent être produites dans des lignées cellulaires d'insectes ou chez des bactéries. Cette approche a été utilisée pour valider l'implication d'une ALP (AAEL009077) dans la toxicité de Cry4Ba chez *A. aegypti*. Cette ALP a été produite dans des cellules d'insectes (sf9) provoquant de la mortalité cellulaire

(Dechklar et al., 2011). Elle a ensuite été produite chez *E. coli* démontrant que même sans glycosylation, l'ALP conservait son activité et sa forte affinité pour Cry4Ba (Thammasittirong et al., 2011). Dans notre étude, nous avons vu que l'ALP AAEL003905 est sous sélection directionnelle chez toutes les souches résistantes et montre plusieurs combinaisons de mutations non synonymes selon la souche. Une collaboration avec Eve De Rosny (Université Grenoble-Alpes) a été initiée afin de produire cette ALP chez *E. coli.* En premier lieu, l'affinité de cette ALP pour les toxines Cry va être testée. Si une ou plusieurs toxines se fixent, alors l'ALP avec les différentes combinaisons de mutations va être produite pour évaluer si ces mutations ont un effet sur l'affinité des toxines.

c) Transgénèse chez le moustique

L'objectif de cette approche est de modifier le génome du moustique, en particulier un gène afin d'étudier sa fonction. Parmi les moyens disponibles, les techniques dites d'édition du génome (TALEN, ZFN et CRISPR-Cas9) sont en plein essor et permettent une grande diversité de modifications du génome. Je vais focaliser cette partie sur la technique CRISPR-Cas car elle est la plus simple et la moins couteuse à mettre en place (Doudna et Charpentier, 2014). Le système CRISPR-Cas9 est naturellement présent chez les bactéries. Il leur confère une immunité adaptative contre les virus et les plasmides. Cas9 (protéine associée à CRISPR) est une protéine qui, lorsqu'elle est associée à un brin d'ARN, va se fixer à l'ADN complémentaire de ce brin et couper la double hélice d'ADN. La fonction de cette protéine est utilisée pour cibler un gène d'intérêt dans le génome d'autres organismes (Doudna et Charpentier, 2014). Pour ce faire, il faut produire la protéine Cas9 et un guide d'ARN simple brin (sgARN) spécifique en sa partie 5' (17 à 20 paires de bases) du gène ciblé et qui se fixe à la protéine Cas9 en sa partie 3' (Figure 32). Le sgARN et Cas9 sont ensuite injectés dans l'embryon pour atteindre les cellules souches. Une fois le complexe protéine-ARN fixé au brin d'ADN complémentaire, Cas9 va cliver les deux brins d'ADN (Figure 32). Ces ruptures peuvent conduire à l'inactivation du gène à travers: 1. la réparation cellulaire par jonction d'extrémités non homologues conduisant à des insertions ou des délétions ou 2. la réparation cellulaire par recombinaison homologue conduisant à l'introduction de gènes hétérologues (exogène ou endogène) (Figure 32) (Basu et al., 2015; Dong et al., 2015; Kistler et al., 2015). Cette technique appliquée à notre

problématique pourrait permettre de remplacer le RNAi pour étudier l'effet de la perte de fonction d'une protéine d'intérêt (récepteurs, protéines cuticulaires ou peptides antimicrobiens) sur le phénotype de résistance. Cette technique a déjà été utilisée avec succès chez *A. aegypti* (Basu et al., 2015; Dong et al., 2015; Kistler et al., 2015). Néanmoins, cette approche nécessitant une accréditation pour manipuler des moustiques génétiquement modifiés, elle ne pourra donc être envisagée que dans le cadre d'une collaboration avec d'autres laboratoires de recherche habilités.



Figure 32 : Représentation des différentes étapes de la technique CRISPR-Cas9. Le sgRNA et la protéine Cas9 sont injectés dans l'embryon. La protéine Cas9 couplée au sgRNA vont reconnaitre et cliver le gène cible, à noter que pour obtenir un clivage il faut être proche d'un site PAM (contenant trois nucléotides : NGG). La rupture de l'ADN va activer la machinerie de réparation cellulaire qui soit réparé l'ADN par jonction non homologue ou par recombinaison homologue avec un fragment d'ADN exogène ou endogène. Figure adaptée de (Basu et al., 2015; Dong et al., 2015; Kistler et al., 2015).

II. Comment détecter la résistance en population naturelle

A. L'utilisation des bioessais

Pour mettre en évidence l'apparition de résistances aux insecticides sur le terrain, l'approche la plus utilisée consiste à réaliser des bioessais sur des individus échantillonnés dans les populations naturelles (Sivasupramaniam et al., 2007). La résistance au *Bti* a été recherchée dans des populations naturelles de nombreux pays (Araújo et al., 2013; Kamgang et al., 2011; Lee et Zairi, 2006; Liu et al., 2004;

Loke et al., 2010; Rocha et al., 2015; Wirth et al., 2001) mais une seule étude a conclu à une résistance de plus de 30 fois chez une population de *C. pipiens* dans l'État de New York (Paul et al., 2005). Néanmoins, cette étude est critiquable, notamment à cause du choix de la souche de référence. La souche de référence est une souche prélevée en Californie en 1950 (Georghiou et al., 1966) et élevée pendant plus de 50 ans en conditions standardisés de laboratoire. La forte distance géographique entre la souche de référence et la population testée ainsi que l'élevage de la population de référence en condition de laboratoire suggèrent que ces souches ne partagent pas un fond génétique commun. Les résultats obtenus peuvent ne refléter qu'une différence de tolérance naturelle entre les deux populations et non une réelle résistance sectionnée sur le terrain.

1. Détecter une résistance cryptique au Bti

Pour pouvoir vérifier si l'augmentation de la tolérance au Bti dans les populations naturelles est due à une sélection de la résistance, il est nécessaire de pouvoir détecter plus finement l'apparition de résistance. Nous avons vu que la souche LiTOX présentait une faible résistance au Bti mais une résistance beaucoup plus importante aux toxines Cry testées individuellement. La résistance aux toxines séparées est donc détectable avant que la résistance au Bti ne soit suffisamment importante pour être détectée par des bioessais. Dans ce contexte, nous avons testé (initié lors de mon stage de master 1) des populations de moustiques de la région Rhône-Alpes à l'aide des toxines individuelles du Bti afin de détecter une éventuelle adaptation des moustiques au Bti (Annexe 5) (Tetreau et al., 2013c). Parmi les trois espèces testées (A. rusticus, A. vexans et A. sticticus), une population d'A. sticticus présentait une tolérance plus importante à Cry4Aa (3.5 fois) et à Cry11Aa (8.0 fois) par rapport aux deux autres populations mais aucune augmentation de la tolérance au Bti. Ces trois populations étant traitées au Bti, ce résultat peut indiquer une résistance cryptique au Bti. Néanmoins, ces bioessais ont été réalisés directement sur les les larves prélevées sur le terrain. Or, les facteurs environnementaux tels que la température (Asano, 2004), les xénobiotiques (Riaz et al., 2009) ou encore l'exposition au UVs (Tetreau et al., 2013a) peuvent également affecter la sensibilité des larves. Pour pallier ce problème, chez certaines espèces il est possible de collecter les larves sur le terrain (génération 0) puis de les laisser se reproduire et élever leur descendance en conditions standardisées (génération 1) avant de

procéder aux bioessais. Dans le cas des espèces trouvées sur la région Rhône-Alpes, cette solution n'était pas applicable car ces espèces nécessitent beaucoup d'espace pour se reproduire (Carron, 2007).

2. Un outil pertinent pour détecter la résistance ?

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé ce test pour évaluer la tolérance au *Bti* et aux toxines séparées en population naturelle de trois espèces vectrices de maladies (*A. aegypti, A. albopictus* et *C. quinquefasciatus*). Pour ce faire, nous avons collaboré avec Jean-Sébastien Dehecq de l'ARS (agence régionale pour la santé) de l'océan Indien. J'y ai ainsi effectué une mission de trois semaines pour évaluer la tolérance des populations d'*A. albopictus* et de *C. quinquefasciatus* au *Bti* et aux toxines séparées sur l'île de la Réunion. Nous avons également collaboré avec Florence Fouque et Daniella Goindin (dans le cadre de sa thèse) de l'institut Pasteur de Guadeloupe pour tester des souches d'*A. aegypti*. Les trois populations provenant de la Guadeloupe ne présentant aucune différence de tolérance au *Bti* et aux toxines séparées, les résultats ne sont donc pas présentés.



Figure 33 : Mesure de la tolérance au *Bti* et aux toxines séparées du *Bti*. (a) Mortalité calculée à 24h pour les populations naturelles d'*A. albopictus* provenant de l'île de la réunion exposées à des doses de toxines Cry4Aa (59.9 ng. μ l⁻¹), Cry4Ba (36.6 ng. μ l⁻¹), Cry11Aa (54.2 ng. μ l⁻¹) et au *Bti* commercial

Vectobac WG (0.7 μ g.mL⁻¹). Les différences ont été testées à l'aide d'un test de Wilcoxon (p-valeur<0.05, *). Les populations traitées sont indiquées en rouge et la population non traitée est indiquée en vert. (b) LC₅₀ calculées à 24h pour les populations de *C. quinquefasciatus* exposées à des concentrations croissantes de Cry4Aa, Cry11Aa et au *Bti* commercial Vectobac WG. Les différences sont significatives lorsque les intervalles de confiance à 95% calculés à l'aide du logiciel probit sont non-chevauchants, *. Les populations traitées sont indiquées en rouge et la population de laboratoire non traitée est indiquée en vert.

Tous les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus en utilisant des œufs provenant d'une génération d'élevage en laboratoire pour A. albopictus ou des œufs prélevés directement sur le terrain pour C. quinquefasciatus. Cette approche permet d'élever les larves en conditions standardisées et de s'affranchir des effets potentiels de l'environnement. On observe que deux populations d'A. albopictus (Saint-Denis et Saint-Paul) présentent une tolérance significativement plus importante aux toxines séparées et au *Bti* par rapport à la population non traitée (Plaine des palmistes) (Figure 33-a). La mortalité de ces deux populations baisse de 14-23% pour les toxines Cry et de 28-56% pour le Bti. Concernant C. quinquefasciatus, on observe une augmentation significative de la tolérance au Bti par rapport à la souche de laboratoire S-Lab de 2.1 et 3.8 fois pour respectivement la population provenant de Saint-Paul et Sainte-Marie (Figure 33-b). Nos données concordent avec l'article de Paul et al (2005) : la souche de laboratoire apparait plus sensible au Bti que les populations naturelles. Néanmoins, nos rapports de résistance sont 10 fois plus faibles que ceux trouvés dans leurs données, ce qui suggère une adaptation locale de leurs populations au *Bti*. Aussi, on ne remarque aucune différence de tolérance à la toxine Cry11Aa guand l'augmentation de la tolérance à la toxine Cry4Aa (1.7 et 2.9 fois pour respectivement Saint-Paul et Sainte-Marie), bien que non significativement différente de la souche de laboratoire, présente une amplitude similaire à celle observée pour le Bti.

L'ensemble de ces résultats nous indique qu'une meilleure tolérance au *Bti* pour les deux espèces étudiées est associée à une meilleure tolérance aux toxines séparées du *Bti*. Néanmoins, on remarque que les tolérances au *Bti* sont, contrairement à ce qui était observé chez la souche LiTOX, toujours légèrement plus importante que celles observées aux toxines séparées. Deux interprétations sont possibles pour expliquer ces résultats :

- Les variations de tolérance de ces populations ne sont pas le reflet d'une sélection exercée par le *Bti* mais une variation de tolérance naturelle entre les

populations. Dans ce cas, il est toujours possible que l'adaptation des moustigues au Bti soit reflétée par une forte augmentation de la résistance aux toxines séparées. Il serait donc nécessaire de continuer à mesurer la résistance au Bti et aux toxines séparées sur le terrain. Dans le cas où une résistance aux toxines séparées est détectée sur le terrain, après validation des gènes candidats à la résistance aux toxines Cry obtenus durant cette thèse, on pourrait alors cibler ces gènes pour identifier les mécanismes de résistances impliqués. Pour identifier leur implication, plusieurs méthodes sont envisageables : une mesure de l'expression des gènes par RTqPCR, la recherche des gènes sous sélection et des mutations responsables de la résistance par séquençage. Étant donné que les techniques de validation (RNAi, expression en système hétérologue, etc.) sont longues à effectuer pour chaque gène, il est aussi possible de chercher les principales mutations identifiées durant cette thèse (sans validation préalable) dans les populations naturelles. Ceci peut permettre de réduire la liste de gènes candidats à la résistance tout en étant proche des mécanismes potentiellement sélectionnés en population naturelle. Des techniques de génotypage de type Illumina Golden Gate, permettent ainsi de détecter plus de 1500 SNPs en même temps à partir d'ADN. Ce type d'approche a été appliqué avec succès sur les populations naturelles de Martinique (Paris et al., 2013).

- L'hypothèse émise à partir d'une souche d'*A. aegypti* de laboratoire n'est pas extrapolable à d'autres espèces et à d'autres écosystèmes. Plusieurs résultats peuvent soutenir cette hypothèse. Le *Bti* perd de la toxicité en 3 heures seulement après contact avec de la litière végétale. Cette perte de toxicité est attribuée à une forte baisse de la biodisponibilité de la toxine Cyt (Tetreau et al., 2012c). Ces résultats ont été confirmés par une baisse de la proportion de la toxine Cyt dans la litière végétale utilisée pour sélectionner la souche LiTOX (Tetreau et al., 2012a). La toxicité de cette litière végétale, échantillonnée plusieurs mois après un traitement au *Bti*, est attribuée à une remise en culture des spores de *Bti* suivie d'une production de nouveaux cristaux (Tetreau et al., 2012a). Le fait que la souche LiTOX présente une résistante modérée au *Bti* mais une forte résistance aux toxines séparées et que le *Bti* perd rapidement de la toxicité à cause de la perte de la biodisponibilité de la toxine Cyt nous a amené à penser que la pression de sélection exercée par le *Bti* pouvait être principalement exercée par les toxines Cry. On pourrait donc détecter

une résistance cryptique au *Bti* par l'intermédiaire d'une forte augmentation de la résistance aux toxines Cry. Néanmoins, plusieurs facteurs peuvent modérer la validité de cette hypothèse sur le terrain. Le premier facteur est opérationnel : les doses de Bti épandue sur le terrain atteignent régulièrement jusqu'à 20 fois la dose permettant de tuer 95% de la population (Lee et Zairi, 2006). Sachant que le Bti est constitué à 80% de toxine Cyt et que le Bti provoque la mort des larves très rapidement (entre 3 et 8 heures) après épandage il est probable que les moustiques soient exposés à de fortes concentrations en toxine Cyt. Le deuxième facteur est comportemental : le Bti peut persister voire même se recycler plusieurs mois après traitement mais ces événements semblent rares (Duchet et al., 2014) et aucun autre cas de litières toxiques n'a été rapporté à ce jour. Ceci limite la possibilité des moustigues à être exposés à une litière toxique contenant essentiellement des toxines Cry. Dans ce cas, la pression de sélection exercée par le Bti en population naturelle se ferait sur toutes les toxines qui composent le Bti, incluant la toxine Cyt. La souche LR3Bti se rapprocherait donc le plus d'une sélection exercée par le Bti en population naturelle. Or, on observe sur cette souche que la résistance aux toxines Cry n'augmente pas malgré 9 générations de sélections supplémentaires et qu'il n'y a pas de modification (expression ou SNPs) dans les gènes potentiellement impliqués dans la résistance spécifique aux toxines Cry. Ceci pourrait également expliquer pourquoi les niveaux de tolérance des populations naturelles ne sont pas plus forts aux toxines Cry du Bti qu'au Bti.

- B. Une autre voie pour étudier et détecter la résistance au Bti
 - 1. Le choix de l'espèce

Les différentes espèces de moustiques possèdent une grande diversité d'habitats larvaires. Parmi les espèces vectrices des principales maladies humaines (*C. pipiens* et *C. quinquefasciatus*, virus du Nil occidental ; *A. albopictus* et *A. aegypti*, DENV, CHIKV et Fièvre jaune ; *An. gambiae*, paludisme), on retrouve des gîtes larvaires généralement à proximité des habitations humaines. Les larves d'*A. albopictus* et *A. aegypti* vont se trouver dans des gîtes artificiels (pot de fleurs, gouttières, pneus, etc.), généralement peu ensoleillés, contenant un faible volume d'eau claire non polluée. Les larves d'*An. gambiae* se retrouvent aussi dans des eaux claires mais dans des gites plus naturels (flaques, marécages, petites mares, rizières, etc.)

généralement exposés au soleil. La diversité d'habitats de ces espèces rend plus difficile l'identification des gîtes et leur traitement par les gestionnaires (communication de l'ARS). Contrairement aux autres genres, les *Culex* se retrouvent souvent dans des eaux stagnantes fortement polluées (fosses septiques, égouts à ciel ouvert et bassins de lagunage, etc.). Leurs habitats sont donc plus faciles à localiser et sont traités au *Bti* en routine, ce qui pourrait faciliter l'apparition de résistance (communication de l'ARS). De plus, ces espèces présentent de nombreuses générations par an, car elles sont surtout dépendantes des rejets d'eaux humains constituant les eaux stagnantes, ce qui peut aussi favoriser l'apparition de résistance. Enfin, *C. quinquefaciatus et C. pipiens* sont les seules espèces à avoir présenté une résistance en population naturelle à *Bacillus sphaericus* (Rao et al., 1995; Yuan et al., 2000) et une résistance au *Bti* est soupçonnée (Paul et al., 2005). Les espèces de *Culex* apparaissent donc comme les premières à pouvoir s'adapter au *Bti* (Paul et al., 2005).

2. La méthode pour étudier la résistance

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (pages 24-25), la pression de sélection exercée en laboratoire est plus faible (tuant 70% de la population) que la pression exercée sur le terrain (99-100% de mortalité). En effet, le Bti est épandu directement dans le gîte larvaire ce qui limite la possibilité des larves d'échapper au traitement insecticide. Pour étudier la résistance au Bti, je propose donc de récupérer des larves de C. quinquefaciatus provenant de différents endroits du monde pour établir une métapopulation disposant d'une diversité génétique importante. Pour mimer l'effet du Bti sur le terrain, il faudrait alors appliquer une concentration de Bti proche des doses opérationnelles et récupérer le peu de larves survivantes à ces doses afin de les faire se reproduire pour obtenir la génération suivante. Cette opération de sélection devra être appliquée plusieurs fois pour fixer la résistance. Ceci permettra de sélectionner des gènes qui ont un effet majeur dans la résistance au Bti. Les effets d'une sélection aussi forte sur une population fixeront forcément aussi des allèles non reliés à la résistance mais lié à la perte de la diversité génétique. En parallèle, il est nécessaire de construire une lignée iso-femelle (croisement sur plusieurs générations de frères et sœurs pour obtenir une lignée consanguine) à partir d'une souche sensible non exposée à l'insecticide. Une reproduction entre la population résistante et la population consanguine suivie d'une exposition au Bti sur

plusieurs générations permettra d'éliminer les allèles non reliés à la résistance et d'obtenir une souche résistante au *Bti* isogénique d'une souche sensible. Enfin, des approches sans *a priori*, telles que le RNA-seq, permettront d'identifier les gènes ou allèles reliés à la résistance au *Bti*.

III. Conclusion générale

Le Bti représente une excellente alternative aux insecticides chimiques de par sa grande spécificité et l'absence de résistance connue en population naturelle. Le Bti, composé de plusieurs toxines agissant en synergie couplé à une bactérie virulente, possède un mode d'action complexe. La complexité du Bti en fait un insecticide au mode d'action encore peu connu. Les résultats obtenus lors de cette thèse permettent de proposer des récepteurs potentiels à chaque toxine Cry et des mécanismes potentiellement partagés pour résister au Bti ainsi qu'à ses toxines. Il apparaît aussi que les mécanismes de résistance développés pour résister à une toxine Cry ainsi qu'au cocktail de toxines sont probablement mutligéniques. Pour valider l'implication des récepteurs et des autres mécanismes dans la résistance, il est nécessaire d'utiliser des approches de validation fonctionnelle. La complexité du mode d'action du Bti ainsi que la diversité des gènes/mécanismes qui semblent impliqués dans la résistance au Bti et à ses toxines séparément explique l'absence de résistance en population naturelle. Les résultats présentés durant cette thèse suggèrent aussi que la résistance au Bti ou à ses toxines est coûteuse en terme de fitness, ce qui peut également participer à l'absence de sélection de résistance en population naturelle. Tous ces paramètres sont encourageants pour l'utilisation à long terme du *Bti* dans la lutte anti-moustique.

Enfin, basée sur des observations de terrain cette thèse propose une autre approche pour étudier la résistance au *Bti*. En effet, il faudrait voir le *Bti* comme un « tout » couplant des toxines agissant en synergie à une bactérie capable de proliférer dans les insectes infectés. Le choix de l'espèce ainsi que la stratégie de sélection de la résistance apparaissent important pour identifier les mécanismes permettant de résister au *Bti*. Dans le cadre d'une utilisation croissante du *Bti* à travers le monde, il est nécessaire d'acquérir ces connaissances pour pouvoir prévoir l'apparition de résistance en population naturelle. De plus, nous avons mis en évidence que la

résistance pouvait accroître la capacité vectorielle des moustiques multipliant les risques pour la santé humaine.

- 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.
- Aizawa, K., 2001. Shigetane Ishiwata: His discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan, in: Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis*. Kurume, Japan. pp. 1–14.
- Alout, H., Djègbè, I., Chandre, F., Djogbénou, L.S., Dabiré, R.K., Corbel, V., Cohuet, A., 2014. Insecticide exposure impacts vector–parasite interactions in insecticideresistant malaria vectors. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 281, 20140389. doi:10.1098/rspb.2014.0389
- Alout, H., Ndam, N.T., Sandeu, M.M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R.K., Djogbénou, L.S., Corbel, V., Cohuet, A., 2013. Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* Field Isolates. PLoS ONE 8, e63849. doi:10.1371/journal.pone.0063849
- Alto, B.W., Lounibos, L.P., Higgs, S., Juliano, S.A., 2005. Larval competition differentially affects arbovirus infection in *Aedes* mosquitoes. Ecology 86, 3279–3288.
- Alto, B.W., Lounibos, L.P., Mores, C.N., Reiskind, M.H., 2008a. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. Proc. Biol. Sci. 275, 463–471. doi:10.1098/rspb.2007.1497
- Alto, B.W., Reiskind, M.H., Lounibos, L.P., 2008b. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79, 688–695.
- Al-yahyaee, S.A.S., Ellar, D.J., 1995. Maximal toxicity of cloned CytA δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N-and C-termini. Microbiology 141, 3141–3148.
- Araújo, A.P., Araujo Diniz, D.F., Helvecio, E., de Barros, R.A., de Oliveira, C.M.F., Ayres, C.F.J., de Melo-Santos, M.A., Regis, L.N., Silva-Filha, M.H., 2013. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasit. Vectors 6, 297. doi:10.1186/1756-3305-6-297
- Argôlo-Filho, R.C., Loguercio, L.L., 2013. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. Insects 5, 62–91.
- Aroonkesorn, A., Pootanakit, K., Katzenmeier, G., Angsuthanasombat, C., 2015. Two specific membrane-bound aminopeptidase N isoforms from *Aedes aegypti* larvae serve as functional receptors for the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin implicating counterpart specificity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 461, 300–306. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.026
- Asano, S., 2004. Bioassay with Insects for *Bacillus thuringiensis* Products—Factors Affecting the Results. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 48, 261–274. doi:10.1303/jjaez.2004.261
- Avisar, D., Segal, M., Sneh, B., Zilberstein, A., 2005. Cell-cycle-dependent resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in Sf9 cells. J. Cell Sci. 118, 3163–3171.
- Baek, J.H., Clark, J.M., Lee, S.H., 2010. Cross-strain comparison of cypermethrin-induced cytochrome P450 transcription under different induction conditions in diamondback moth. Pestic. Biochem. Physiol. 96, 43–50. doi:10.1016/j.pestbp.2009.08.014
- Bahar, A.A., Ren, D., 2013. Antimicrobial Peptides. Pharmaceuticals 6, 1543–1575. doi:10.3390/ph6121543
- Barrera, R., 1996. Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. Ecol. Entomol. 21, 117–127. doi:10.1111/j.1365-2311.1996.tb01178.x

- Barrett, R.D.H., Schluter, D., 2008. Adaptation from standing genetic variation. Trends Ecol. Evol. 23, 38–44.
- Basu, S., Aryan, A., Overcash, J.M., Samuel, G.H., Anderson, M.A.E., Dahlem, T.J., Myles, K.M., Adelman, Z.N., 2015. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 4038–4043.
- 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.
- Bayyareddy, K., Zhu, X., Orlando, R., Adang, M.J., 2012. Proteome Analysis of Cry4Ba Toxin-interacting *Aedes aegypti* Lipid Rafts using geLC–MS/MS. J. Proteome Res. 11, 5843–5855.
- Becker, N., 2002. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. J. Am. Mosq. Control Assoc.-Mosq. News 18, 57–62.
- Behrens, S., Peuß, R., Milutinović, B., Eggert, H., Esser, D., Rosenstiel, P., Schulenburg, H., Bornberg-Bauer, E., Kurtz, J., 2014. Infection routes matter in population-specific responses of the red flour beetle to the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*. BMC Genomics 15, 445. doi:10.1186/1471-2164-15-445
- Beltrão, H.D., Silva-Filha, M.H., 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. FEMS Microbiol. Lett. 266, 163–169. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00527.x
- Bel, Y., Jakubowska, A.K., Costa, J., Herrero, S., Escriche, B., 2013. Comprehensive Analysis of Gene Expression Profiles of the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* Larvae Challenged with *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa Toxin. PLoS ONE 8, e81927. doi:10.1371/journal.pone.0081927
- Ben-Dov, E., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins 6, 1222–1243.
- 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. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5082–5095.
- Blair, C.D., 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. Future Microbiol. 6, 265–277. doi:10.2217/fmb.11.11
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics *Bt*u170. doi:10.1093/bioinformatics/*Bt*u170
- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G., Segers, G., 2012. Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (Diabrotica virgifera virgifera LeConte). PLoS ONE 7, e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534
- Bonin, A., Paris, M., Tetreau, 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.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. Mol. Biol. 348, 363–382.
- Borkent, A., Grimaldi, D.A., 2004. The earliest fossil mosquito (Diptera: Culicidae), in mid-Cretaceous Burmese amber. Ann. Entomol. Soc. Am. 97, 882–888.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49, 423–435.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. Compr. Mol. Insect Sci. 6, 175–205.

- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem. Mol. Biol., Special Issue: Toxicology and Resistance 41, 423–431. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Bravo, A., Sánchez, 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. J. Biol. Chem. 277, 23985–23987.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? Trends Biotechnol. 26, 573–579.
- Brennan, C.A., Anderson, K.V., 2004. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. Annu. Rev. Immunol. 22, 457–483. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104626
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. BMC Microbiol. 10, 129. doi:10.1186/1471-2180-10-129
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 15196–15199.
- Broderick, N.A., Robinson, C.J., McMahon, M.D., Holt, J., Handelsman, J., Raffa, K.F., 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. BMC Biol. 7, 11.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Kuraishi, T., Lemaitre, B., 2010. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. BMC Biol. 8, 152. doi:10.1186/1741-7007-8-152
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. Nat. Rev. Immunol. 14, 796–810. doi:10.1038/nri3763
- Bulla, L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I., Fitz-James, P.C., 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Crit. Rev. Microbiol. 8, 147–204. doi:10.3109/10408418009081124
- Butko, P., 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2415–2422.
- Butko, P., Huang, F., Pusztai-Carey, M., Surewicz, W.K., 1997. Interaction of the δ-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes. Biochemistry (Mosc.) 36, 12862–12868.
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberón, 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 Biochem. Mol. Biol. 40, 58–63. doi:10.1016/j.ibmb.2009.12.010
- Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J.I., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., Evans, A.E., Gill, S.S., Soberón, M., Jurat-Fuentes, J.L., Bravo, A., 2012. Comparative Proteomic Analysis of *Aedes aegypti* Larval Midgut after Intoxication with Cry11Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis*. PLoS ONE 7. doi:10.1371/journal.pone.0037034
- Cantón, P.E., López-Díaz, J.A., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2014. Membrane binding and oligomer membrane insertion are necessary but insufficient for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxicity. Peptides 53, 286–291. doi:10.1016/j.peptides.2013.10.011
- Cao-Lormeau, V.M., 2009. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. Virol. J. 6, 35. doi:10.1186/1743-422X-6-35
- Carron, A., 2007. Traits d'histoire de vie et démographie du moustique *Aedes caspius* (Pallas, 1771) (Diptera : Culicidae) : impact des traitements larvicides. (phdthesis). Université Paul Valéry - Montpellier III.
- Carton, Y., Poirié, M., Nappi, A.J., 2008. Insect immune resistance to parasitoids. Insect Sci. 15, 67.
- Castagnola, A., 2011. Comparing the midgut regenerative responses in *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Dr. Diss.

- Castillo, J.C., Robertson, A.E., Strand, M.R., 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 891–903. doi:10.1016/j.ibmb.2006.08.010
- Chalk, R., Townson, H., Natori, S., Desmond, H., Ham, P.J., 1994. Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 24, 403–410.
- Chen, J., Aimanova, K., Fernandez, L., 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*. Biochem J 424, 191–200.
- Chen, J., Aimanova, K.G., Pan, S., Gill, S.S., 2009b. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 688–696. doi:10.1016/j.ibmb.2009.08.003
- Chen, J., Likitvivatanavong, S., Aimanova, K.G., Gill, S.S., 2013. A 104 kDa Aedes aegypti aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 43, 1201–1208. doi:10.1016/j.ibmb.2013.09.007
- Clements, A.N., 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction. Chapman & Hall.
- Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., Dym, O., 2011. Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. J. Mol. Biol. 413, 804–814.
- Contreras, E., Benito-Jardón, M., López-Galiano, M.J., Real, M.D., Rausell, C., 2015. Tribolium castaneum immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. Dev. Comp. Immunol. 50, 139–145. doi:10.1016/j.dci.2015.02.005
- Couret, J., Dotson, E., Benedict, M.Q., 2014. Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). PLoS ONE 9, e87468. doi:10.1371/journal.pone.0087468
- Crava, C.M., Jakubowska, A.K., Escriche, B., Herrero, S., Bel, Y., 2015. Dissimilar Regulation of Antimicrobial Proteins in the Midgut of *Spodoptera exigua* Larvae Challenged with *Bacillus thuringiensis* Toxins or Baculovirus. PLoS ONE 10. doi:10.1371/journal.pone.0125991
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., Zeigler, D.R., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.*Bt*nomenclature.info/.
- 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, 807–813.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T.M., Higa, L.M., Castanho, M.A.R.B., Poian, A.T.D., 2014. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. FEMS Microbiol. Rev. fuu004. doi:10.1093/femsre/fuu004
- Das, S., Debnath, N., Cui, Y., Unrine, J., Palli, S.R., 2015. Chitosan, Carbon Quantum Dot, and Silica Nanoparticle Mediated dsRNA Delivery for Gene Silencing in *Aedes aegypti*: A Comparative Analysis. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 19530–19535. doi:10.1021/acsami.5b05232
- David, J.P., Rey, D., Pautou, M.P., Meyran, J.C., 2000. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. J. Invertebr. Pathol. 75, 9–18.
- de Barros Moreira Beltrão, H., Silva-Filha, M.H., 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. FEMS Microbiol. Lett. 266, 163–169. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00527.x
- Dechklar, M., Tiewsiri, 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 Biochem. Mol. Biol. 41, 159–166. doi:10.1016/j.ibmb.2010.11.006

- Delécluse, 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.
- 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.
- Després, L., David, J.P., Gallet, C., 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. Trends Ecol. Evol. 22, 298-307.
- Després, L., Stalinski, R., Tetreau, G., Paris, M., Bonin, A., Navratil, V., Reynaud, S., David, J.P., 2014. Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to Bacillus thuringiensis israelensis toxins. BMC Genomics 15, 926.
- Dittmer, N.T., Tetreau, G., Cao, X., Jiang, H., Wang, P., Kanost, M.R., 2015. Annotation and expression analysis of cuticular proteins from the tobacco hornworm, Manduca sexta. Insect Biochem, Mol. Biol.
- Dong, S., Lin, J., Held, N., Clem, R.J., Passarelli, A.L., Franz, A.W.E., 2015. Heritable CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in the Yellow Fever Mosquito, Aedes aegypti. PLoS ONE 10, e0122353. doi:10.1371/journal.pone.0122353
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346, 1258096. doi:10.1126/science.1258096
- Duchet, C., Tetreau, G., Marie, A., Rey, D., Besnard, G., Perrin, Y., Paris, M., David, J.P., Lagneau, C., Després, L., 2014. Persistence and recycling of bioinsecticidal Bacillus thuringiensis subsp. israelensis spores in contrasting environments: evidence from field monitoring and laboratory experiments. Microb. Ecol. 67, 576-586. doi:10.1007/s00248-013-0360-7
- El-Aziz, N.M.A., Awad, H.H., 2010. Changes in the haemocytes of Agrotis ipsilon larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. Micron 41, 203-209. doi:10.1016/j.micron.2009.11.001
- Elleuch, J., Jaoua, S., Darriet, S., Chandre, F., Tounsi, S., Zghal, R.F., 2015. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from Bacillus thuringiensis israelensis: Interactions and Toxicity mechanism against Aedes aegypti. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology. doi:10.1016/j.toxicon.2015.07.337
- Engel, P., Moran, N.A., 2013. The gut microbiota of insects diversity in structure and
- function. FEMS Microbiol. Rev. 37, 699–735. doi:10.1111/1574-6976.12025 Ericsson, J.D., Janmaat, A.F., Lowenberger, C., Myers, J.H., 2009. Is decreased generalized immunity a cost of *Bt* resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? J. Invertebr. Pathol. 100, 61-67. doi:10.1016/j.jip.2008.10.007
- Fabrick, J.A., Ponnuraj, J., Singh, A., Tanwar, R.K., Unnithan, G.C., Yelich, A.J., Li, X., Carrière, Y., Tabashnik, B.E., 2014. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. PloS One 9, e97900. doi:10.1371/journal.pone.0097900
- Federici, B.A., Park, H.-W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., Johnson, J.J., 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. J. Exp. Biol. 206, 3877-3885.
- Fernandez, L.E., Aimanova, K., Gill, S., Bravo, A., Soberón, 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, L.E., Martinez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, A., Hernández-Martínez, S., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2009. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from Aedes aegypti. Biochemistry (Mosc.) 48, 8899-8907.
- 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. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02117.x

- Ferré, J., Escriche, B., Bel, Y., van Rie, J., 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. FEMS Microbiol. Lett. 132, 1–7.
- Ferré, J., van Rie, J., 2002. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 47, 501–533. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145234
- Ffrench-Constant, R.H., 2007. Which came first: insecticides or resistance? Trends Genet. TIG 23, 1–4. doi:10.1016/j.tig.2006.11.006
- Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G., 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends Genet. TIG 20, 163–170. doi:10.1016/j.tig.2004.01.003
- Flannagan, R.D., Yu, C.G., Mathis, J.P., Meyer, T.E., Shi, X., Siqueira, H.A.A., Siegfried, B.D., 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner)(Lepidoptera: Crambidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 33–40.
- 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, 977–993. doi:10.1534/genetics.108.092221
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcerá, 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. Arch. Insect Biochem. Physiol. 31, 257–272.
- 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. J. Membr. Biol. 208, 77–87.
- Frankenhuyzen, K.V., Liu, Y., Tonon, A., 2010. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. J. Invertebr. Pathol. 103, 124–131. doi:10.1016/j.jip.2009.12.008
- Freitak, D., Wheat, C.W., Heckel, D.G., Vogel, H., 2007. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. BMC Biol. 5, 56. doi:10.1186/1741-7007-5-56
- Fu, Y.X., Li, W.H., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133, 693–709.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with *Bt* resistance in *Heliothis virescens*. Science 293, 857–860.
- Galko, M.J., Krasnow, M.A., 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. PLoS Biol. 2, 1114–1126.
- Gao, Y., Fallon, A.M., 2000. Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. Insect Mol. Biol. 9, 553–558.
- Gassmann, A.J., Carrière, Y., Tabashnik, B.E., 2009. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 54, 147–163. doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090518
- Georghiou, G.P., Metcalf, R.L., Gidden, F.E., 1966. Carbamate-resistance in mosquitos. Selection of *Culex pipiens* fatigans Wiedemann (=*C. quinquefasciatus* Say) for resistance to Baygon. Bull. World Health Organ. 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). Appl. Environ. Microbiol. 63, 1095–1101.
- Gill, S.S., Cowles, S.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37, 615–634.
- Gill, S.S., Singh, G.J., Hornung, J.M., 1987. Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. Infect. Immun. 55, 1300–1308.
- Gimelbrant, A., Hutchinson, J.N., Thompson, B.R., Chess, A., 2007. Widespread Monoallelic Expression on Human Autosomes. Science 318, 1136–1140. doi:10.1126/science.1148910
- Girish, V., Vijayalakshmi, A., 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. Indian J. Cancer 41, 47.

- Goic, B., Vodovar, N., Mondotte, J.A., Monot, C., Frangeul, L., Blanc, H., Gausson, V., Vera-Otarola, J., Cristofari, G., Saleh, M.C., 2013. RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. Nat. Immunol. 14, 396–403. doi:10.1038/ni.2542
- Goldberg, L.J., Margalit, J., 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles* sergentii, Uranotaenia unguiculata, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq News 37, 355–358.
- 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.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D.G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R., Laster, M., 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 3519–3523.
- 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. J. Econ. Entomol. 88, 1545–1559.
- Govind, S., 2008. Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. Insect Sci. Online 15, 29–43. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00185.x
- Griffitts, J.S., Aroian, R.V., 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. Bioessays 27, 614–624.
- Grizanova, E.V., Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A., Glupov, V.V., 2014. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 119, 40–46. doi:10.1016/j.jip.2014.04.003
- 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. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2558–2563. doi:10.1128/AEM.71.5.2558-2563.2005
- Guo, Z., Kang, S., Chen, D., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., Zhu, X., Baxter, S.W., Zhou, X., Jurat-Fuentes, J.L., Zhang, Y., 2015a. MAPK Signaling Pathway Alters Expression of Midgut ALP and ABCC Genes and Causes Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin in Diamondback Moth.
- Guo, Z., Kang, S., Zhu, X., Xia, J., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., Zhang, Y., 2015b. Downregulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Insect Biochem. Mol. Biol. 59, 30–40. doi:10.1016/j.ibmb.2015.01.009
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98.
- 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. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 8757–8762.
- 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. J. Invertebr. Pathol. 95, 192–197.
- Hegde, S., Rasgon, J.L., Hughes, G.L., 2015. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. Curr. Opin. Virol. 15, 97–102. doi:10.1016/j.coviro.2015.08.011
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem. Mol. Biol. 34, 653–665.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu. Rev. Entomol. 45, 371–391. doi:10.1146/annurev.ento.45.1.371
- Hermisson, J., Pennings, P.S., 2005. Soft sweeps molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation. Genetics 169, 2335–2352.

- Hernández-Martínez, P., Navarro-Cerrillo, G., Caccia, S., de Maagd, R.A., Moar, W.J., Ferré, J., Escriche, B., Herrero, S., 2010. Constitutive Activation of the Midgut Response to *Bacillus thuringiensis* in *Bt*-Resistant *Spodoptera exigua*. PLoS ONE 5, e12795. doi:10.1371/journal.pone.0012795
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.L., de Maagd, R.A., 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. BMC Genomics 6, 96. doi:10.1186/1471-2164-6-96
- Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J., 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1085–1089. doi:10.1128/AEM.67.3.1085-1089.2001
- Hess, A.N., Prasad, A.N., Ptitsyn, A., Ebel, G.D., Olson, K.E., Barbacioru, C., Monighetti, C., Campbell, C.L., 2011. Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. BMC Microbiol. 11, 45. doi:10.1186/1471-2180-11-45
- Hillyer, J.F., Christensen, B.M., 2005. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 53, 689–698. doi:10.1369/jhc.4A6564.2005
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. Nature 426, 33–38. doi:10.1038/nature02021
- Hoffmann, J.A., 1995. Innate immunity of insects. Curr. Opin. Immunol. 7, 4–10.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53, 242–255.
- 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 (Mosc.) 47, 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 (Mosc.) 48, 9785–9793. doi:10.1021/bi9014538
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F.G., Aroian, R.V., 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 10995–11000. doi:10.1073/pnas.0404073101
- Hwang, J., Kim, Y., 2011. RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, Spodoptera exigua, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 108, 194–200.
- Ibrahim, M.A., Griko, N.B., Bulla, L.A., 2013. Cytotoxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin is mediated by the cadherin receptor *BT*-R₃ of *Anopheles gambiae*. Exp. Biol. Med. Maywood NJ 238, 755–764. doi:10.1177/1535370213493719
- Iconomidou, V.A., Willis, J.H., Hamodrakas, S.J., 2005. Unique features of the structural model of "hard"cuticle proteins: implications for chitin–protein interactions and cross-linking in cuticle. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 553–560.
- Ivanov, D.B., Philippova, M.P., Tkachuk, V.A., 2001. Structure and functions of classical cadherins. Biochem. Mosc. 66, 1174–1186.
- Jasrapuria, S., Arakane, Y., Osman, G., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Muthukrishnan, S., 2010. Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function. Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 214–227.
- Jiménez, A.I., Reyes, E.Z., Cancino-Rodezno, A., Bedoya-Pérez, L.P., Caballero-Flores, G.G., Muriel-Millan, L.F., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2012. Aedes aegypti alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 683–689. doi:10.1016/j.ibmb.2012.06.001
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J.Y., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants

affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. J. Biol. Chem. 282, 21222–21229.

- Jin, T., Chang, X., Gatehouse, A.M.R., Wang, Z., Edwards, M.G., He, K., 2014. Downregulation and mutation of a Cadherin gene associated with Cry1Ac resistance in the Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). Toxins 6, 2676–2693. doi:10.3390/toxins6092676
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. J. Invertebr. Pathol. 92, 166–171. doi:10.1016/j.jip.2006.01.010
- 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. FEBS 271, 3127–3135. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x
- Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R.K., Ning, C., Liu, C., Wu, K., Jackson, J., Gould, F., Blanco, C., Portilla, M., Perera, O., Adang, M.J., 2011. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. PLoS One 6, 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. Parasit. Vectors 4, 79. doi:10.1186/1756-3305-4-79
- Kanost, M.R., Jiang, H., Yu, X.Q., 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. Immunol. Rev. 198, 97–105. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0121.x
- 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). Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 146, 139– 146.
- Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., 2015. Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. Insect Biochem. Mol. Biol. 56, 21–28. doi:10.1016/j.ibmb.2014.11.005
- Kistler, K.E., Vosshall, L.B., Matthews, B.J., 2015. Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. Cell Rep. 11, 51–60. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.009
- Knowles, B.H., Ellar, D.J., 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj. 924, 509–518.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S., Ahringer, J., 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. Nat. Genet. 41, 376–381. doi:10.1038/ng.322
- Krautz, R., Arefin, B., Theopold, U., 2014. Damage signals in the insect immune response. Front. Plant Sci. 5, 342. doi:10.3389/fpls.2014.00342
- Kwon, B., Kim, Y., 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 101, 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: Yponomeutidae). Biol. Control 42, 72–76. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.03.006
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and Bacillus sphaericus for mosquito control. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23, 133–163.
- Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L.C., Koella, J.C., 2005. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. Malar. J. 4, 3. doi:10.1186/1475-2875-4-3
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295–1309.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thiéry, I., 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 86, 660–672.

- Lee, S.-B., Aimanova, K.G., Gill, S.S., 2014. Alkaline phosphatases and aminopeptidases are altered in a Cry11Aa resistant strain of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 54, 112–121.
- Lee, S.B., Chen, J., Aimanova, K.G., Gill, S.S., 2015. *Aedes* cadherin mediates the in vivo toxicity of the Cry11Aa toxin to *Aedes aegypti*. Peptides 68, 140–147. doi:10.1016/j.peptides.2014.07.015
- Lee, Y.W., Zairi, J., 2006. Susceptibility of laboratory and field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes* albopictus to *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22, 97–101. doi:10.2987/8756-971X(2006)22[97:SOLAFA]2.0.CO;2
- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annu. Rev. Entomol. 42, 525– 550. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.525
- Lei, Y., Zhu, X., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., Guo, Z., Xu, B., Li, X., Zhou, X., Zhang, Y., 2014. Midgut transcriptome response to a Cry toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Gene 533, 180–187. doi:10.1016/j.gene.2013.09.091
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25, 1451–1452. doi:10.1093/bioinformatics/*Bt*p187
- Likitvivatanavong, S., Chen, J., Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S., 2011a. Cadherin, alkaline phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. jegathesan in *Aedes aegypti*. Appl. Environ. Microbiol. 77, 24–31.
- Likitvivatanavong, S., Chen, J., Evans, A.M., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S.S., 2011b. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. J. Agric. Food Chem. 59, 2829–2838.
- Likitvivatanavong, S., Katzenmeier, G., Angsuthanasombat, C., 2006. Asn 183 in α5 is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. Arch. Biochem. Biophys. 445, 46–55.
- Liu, C., Xiao, Y., Li, X., Oppert, B., Tabashnik, B.E., Wu, K., 2014. Cis-mediated downregulation of a trypsin gene associated with *Bt* resistance in cotton bollworm. Sci. Rep. 4, 7219. doi:10.1038/srep07219
- Liu, D., Chen, Y., Cai, J., Xiao, L., Liu, C., 2009. Chitinase B from *Bacillus thuringiensis* enhancing potential and its antagonism and insecticidal. Wei Sheng Wu Xue Bao 49, 180–185.
- Liu, H., Cupp, E.W., Guo, A., Liu, N., 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. J. Med. Entomol. 41, 946–952.
- Liu, N., Li, T., Reid, W.R., Yang, T., Zhang, L., 2011. Multiple Cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PloS One 6, e23403. doi:10.1371/journal.pone.0023403
- 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. Trop. Biomed. 27, 493–503.
- López, J.H., Schuehly, W., Crailsheim, K., Riessberger-Gallé, U., 2014. Trans-generational immune priming in honeybees. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 281, 20140454. doi:10.1098/rspb.2014.0454
- Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., Misteli, T., 2010. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. Science 327, 996–1000. doi:10.1126/science.1184208
- Lundgren, J.G., Jurat-Fuentes, J.L., 2012. Chapter 13 Physiology and Ecology of Host Defense Against Microbial Invaders, in: Kaya, F.E.V.K. (Ed.), Insect Pathology (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 461–480.
- Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Patramool, S., Dumas, E., Wasinpiyamongkol, L., Saune, L., Hamel, R., Bernard, E., Sereno, D., Thomas, F., Piquemal, D., Yssel, H., Briant, L., Missé, D., 2011. Induction of a Peptide with Activity against a Broad

Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. PLoS Pathog 7, e1001252. doi:10.1371/journal.ppat.1001252

- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R., Schmidt, O., 2005a. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 729–739. doi:10.1016/j.ibmb.2005.02.011
- Ma, G., Sarjan, M., Preston, C., Asgari, S., Schmidt, O., 2005b. Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates. Insect Sci. 12, 319–330.

Mallon, E.B., Loosli, R., Schmid-Hempel, P., 2003. Specific versus nonspecific immune defense in the bumblebee, *Bombus terrestris* L. Evol. Int. J. Org. Evol. 57, 1444–1447.

Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., Parrinello, N., 2011. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 106, 360–365. doi:10.1016/j.jip.2010.12.006

Markussen, M.D.K., Kristensen, M., 2010. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated neonicotinoid resistance in the house fly Musca domestica L. Pestic. Biochem. Physiol. 98, 50–58. doi:10.1016/j.pestbp.2010.04.012

McKenzie, J.A., Batterham, P., 1998. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 353, 1729–1734.

McKenzie, J.A., Batterham, P., 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. Trends Ecol. Evol. 9, 166–169.

Meigs, T.E., Fedor-Chaiken, M., Kaplan, D.D., Brackenbury, R., Casey, P.J., 2002. Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. J. Biol. Chem. 277, 24594–24600. doi:10.1074/jbc.M201984200

Meleshkevitch, E.A., Voronov, D.A., Miller, M.M., Penneda, M., Fox, J.M., Metzler, R., Boudko, D.Y., 2013. A novel eukaryotic Na+ methionine selective symporter is essential for mosquito development. Insect Biochem. Mol. Biol. 43, 755–767. doi:10.1016/j.ibmb.2013.05.008

Mercado-Curiel, R.F., Black, W.C., de L Muñoz, M., 2008. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. BMC Microbiol. 8, 118.

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). Natl. Acad. Sci. Lett. 28, 281–283.

Mohrig, W.V., Messner, B., 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. Biol. Zentralblatt 87, 439–470.

Morazzani, E.M., Wiley, M.R., Murreddu, M.G., Adelman, Z.N., Myles, K.M., 2012. Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. PLoS Pathog. 8, e1002470. doi:10.1371/journal.ppat.1002470

Moreau, J., Martinaud, G., Troussard, J.P., Zanchi, C., Moret, Y., 2012. Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. Oikos 121, 1828–1832. doi:10.1111/j.1600-0706.2011.19933.x

Moreno-García, M., Vargas, V., Ramírez-Bello, I., Hernández-Martínez, G., Lanz-Mendoza, H., 2015. Bacterial Exposure at the Larval Stage Induced Sexual Immune Dimorphism and Priming in Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. PloS One 10, e0133240. doi:10.1371/journal.pone.0133240

Morin, S., Biggs, R.W., Sisterson, M.S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L., 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. 100, 5004–5009.

Morrison, T.E., 2014. Re-emergence of chikungunya virus. J. Virol. JVI.01432–14. doi:10.1128/JVI.01432-14

- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat. Rev. Microbiol. 3, 13–22. doi:10.1038/nrmicro1067
- Muñoz-Garay, C., Rodríguez-Almazán, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Soberón, M., Bravo, A., 2009. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7548–7550.
- Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A., Furukawa, Y., 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CrylAa toxin. Febs Lett. 460, 385–390.
- Nanoth Vellichirammal, N., Wang, H., Eyun, S.I., Moriyama, E.N., Coates, B.S., Miller, N.J., Siegfried, B.D., 2015. Transcriptional analysis of susceptible and resistant European corn borer strains and their response to Cry1F protoxin. BMC Genomics 16. doi:10.1186/s12864-015-1751-6
- Nègre, N., Brown, C.D., Ma, L., Bristow, C.A., Miller, S.W., Wagner, U., Kheradpour, P., Eaton, M.L., Loriaux, P., Sealfon, R., Li, Z., Ishii, H., Spokony, R.F., Chen, J., Hwang, L., Cheng, C., Auburn, R.P., Davis, M.B., Domanus, M., Shah, P.K., Morrison, C.A., Zieba, J., Suchy, S., Senderowicz, L., Victorsen, A., Bild, N.A., Grundstad, A.J., Hanley, D., MacAlpine, D.M., Mannervik, M., Venken, K., Bellen, H., White, R., Gerstein, M., Russell, S., Grossman, R.L., Ren, B., Posakony, J.W., Kellis, M., White, K.P., 2011. A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. Nature 471, 527–531. doi:10.1038/nature09990
- Newcombe, R.G., 1998. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. Stat. Med. 17, 857–872.
- Nielsen-Leroux, C., Pasteur, N., Prètre, J., Charles, J.F., Sheikh, H.B., Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. J. Med. Entomol. 39, 729–735.
- Okech, B.A., Boudko, D.Y., Linser, P.J., Harvey, W.R., 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. J. Exp. Biol. 211, 957–968. doi:10.1242/jeb.012021
- Onken, H., Moffett, D.F., 2009. Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalinization in the anterior midgut of larval mosquitoes. J. Exp. Biol. 212, 373–377.
- Oppert, B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 42, 1–12.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H., 1997. Proteinasemediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Biol. Chem. 272, 23473–23476.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins 6, 3296–3325.
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A.S., Xi, Z., 2012. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, E23–E31. doi:10.1073/pnas.1116932108
- Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A., 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol. Rev. 37, 3–22. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x
- Paris, M., David, J.P., Despres, L., 2011a. Fitness costs of resistance to *Bt*i toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. Ecotoxicology 20, 1184–1194.
- Paris, M., Marcombe, S., Coissac, E., Corbel, V., David, J.P., Després, L., 2013. Investigating the genetics of *Bt*i resistance using mRNA tag sequencing: application on laboratory strains and natural populations of the dengue vector *Aedes aegypti*. Evol. Appl. 6, 1012–1027. doi:10.1111/eva.12082
- Paris, M., Melodelima, C., Coissac, E., Tetreau, G., Reynaud, S., David, J.P., Despres, L., 2012. Transcription profiling of resistance to *Bt*i toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. J. Invertebr. Pathol. 109, 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 *Bt*i toxins in mosquitoes. Pest Manag. Sci. 67, 122–128. doi:10.1002/ps.2046
- Passarelli, A.L., 2011. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. Virology 411, 383–392. doi:10.1016/j.virol.2011.01.009
- 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.
- Pérez, C., Fernandez, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 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.
- Perez, C., Muñoz-Garay, C., Portugal, L.C., Sánchez, J., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 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.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 255–281.
- Pridgeon, J.W., Zhao, L., Becnel, J.J., Strickman, D.A., Clark, G.G., Linthicum, K.J., 2008. Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. J. Med. Entomol. 45, 414–420.
- Przeworski, M., Coop, G., Wall, J.D., 2005. The signature of positive selection on standing genetic variation. Evolution 59, 2312–2323.
- Ragni, A., Thiéry, I., Delécluse, A., 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. Curr. Microbiol. 32, 48–54.
- 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 *Ephestia kuehniella*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 2696–2699. doi:10.1073/pnas.0306669101
- Rajagopal, R., Arora, N., Sivakumar, S., Rao, N., Nimbalkar, S., Bhatnagar, R., 2009. Resistance of Helicoverpa armigera to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. Biochem J 419, 309–316.
- R Devllopment Core team, R: a language and environment for statistical computing, 2007. . http://www.R-project.org
- Rao, D.R., Mani, T.R., Rajendran, R., Joseph, A.S., Gajanana, A., Reuben, R., 1995.
 Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J. Am. Mosq. Control Assoc.-Mosq. News 11, 1–5.
- 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 Lett. 362, 111–115.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? Trends Microbiol. 18, 189–194.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Wright, D.J., Ellis, R.J., Crickmore, N., Bonsall, M.B., 2009. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. Environ. Microbiol. 11, 2556–2563. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01980.x
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., Chevillon, C., 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation?, in: Microevolution Rate, Pattern, Process. Springer, pp. 287–296.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.P., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends Parasitol. 17, 377–380.

- Reiskind, M.H., Lounibos, L.P., 2009. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Med. Vet. Entomol. 23, 62–68. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00782.x
- 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. Aquat. Toxicol. 93, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.005
- Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding : Sialome and Post-Sialome Perspectives*. Annu. Rev. Entomol. 48, 73–88. doi:10.1146/annurev.ento.48.060402.102812
- Riobo, N.A., Manning, D.R., 2005. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. Trends Pharmacol. Sci. 26, 146–154. doi:10.1016/j.tips.2005.01.007
- Rocha, H.D.R., Paiva, M.H.S., Silva, N.M., de Araújo, A.P., Camacho, D.D.R., Moura, A.J.F., Gómez, L.F., Ayres, C.F.J., Santos, M.A.V., 2015. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. Acta Trop. 152, 66–73. doi:10.1016/j.actatropica.2015.08.013

Rodrigues, J., Brayner, F.A., Alves, L.C., Dixit, R., Barillas-Mury, C., 2010. Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. Science 329, 1353–1355. doi:10.1126/science.1190689

- Rodriguez-Almazan, C., Ruiz de Escudero, I., Cantón, P.E., Muñoz-Garay, C., Pérez, C., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2010. The amino-and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles in toxin oligomerization and pore formation. Biochemistry (Mosc.) 50, 388–396.
- Rodríguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D.J., Ayra-Pardo, C., 2008. Molecular characterization of *Spodoptera frugiperda-Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin interaction. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology 51, 681–692. doi:10.1016/j.toxicon.2007.12.002
- Roth, O., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Kurtz, J., 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, Tribolium castaneum. Proc. Biol. Sci. 276, 145–151. doi:10.1098/rspb.2008.1157
- Rougeron, V., Sam, I.C., Caron, M., Nkoghe, D., Leroy, E., Roques, P., 2015. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. J. Clin. Virol. 64, 144–152. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.032
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu. Rev. Entomol. 32, 361–380.
- Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A., 1978. A histological study of wound healing and hemocyte function in the wax-moth *Galleria mellonella*. J. Morphol. 157, 181–199.
- Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., 2006. Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. Curr. Biol. 16, 1206–1210. doi:10.1016/j.cub.2006.04.047
- 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. Biochem. Biophys. Res. Commun. 407, 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*. J. Appl. Entomol. 127, 29–32.
- Sánchez, M.B., 2015. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Front. Microbiol. 6, 658. doi:10.3389/fmicb.2015.00658
- 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, 775–806.
- Scott, J.C., Brackney, D.E., Campbell, C.L., Bondu-Hawkins, V., Hjelle, B., Ebel, G.D., Olson, K.E., Blair, C.D., 2010. Comparison of dengue virus type 2-specific small

RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e848. doi:10.1371/journal.pntd.0000848

- Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E., 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. J. Insect Physiol. 59, 1212–1221. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.08.014
- Sharakhov, I.V., Sharakhova, M.V., 2015. Heterochromatin, histone modifications, and nuclear architecture in disease vectors. Curr. Opin. Insect Sci. 10, 110–117. doi:10.1016/j.cois.2015.05.003
- Siegwart, M., Graillot, B., Blachere Lopez, C., Besse, S., Bardin, M., Nicot, P.C., Lopez-Ferber, M., 2015. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. Front. Plant Sci. 6. doi:10.3389/fpls.2015.00381
- Sim, S., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G., 2014. Mosquito Immunity against Arboviruses. Viruses 6, 4479–4504. doi:10.3390/v6114479
- Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J.L., Kang, S., Romero-Vivas, C.M., Mohammed, H., Dimopoulos, G., 2013. Transcriptomic Profiling of Diverse Aedes aegypti Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. PLoS Negl Trop Dis 7, e2295. doi:10.1371/journal.pntd.0002295
- Sivasupramaniam, S., Head, G.P., English, L., Li, Y.J., Vaughn, T.T., 2007. A global approach to resistance monitoring. J. Invertebr. Pathol. 95, 224–226. doi:10.1016/j.jip.2007.03.013
- Stevenson, K.R., Coolon, J.D., Wittkopp, P.J., 2013. Sources of bias in measures of allelespecific expression derived from RNA-seq data aligned to a single reference genome. BMC Genomics 14, 536. doi:10.1186/1471-2164-14-536
- Strand, M.R., 2008. The insect cellular immune response. Insect Sci. 15, 1–14.
- Tabashnik, B.E., 2008. Delaying insect resistance to transgenic crops. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 19029–19030. doi:10.1073/pnas.0810763106
- 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. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4582–4584.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Dennehy, T.J., Sims, M.A., Sisterson, M.S., Biggs, R.W., Carrière, Y., 2002. Inheritance of resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Econ. Entomol. 95, 1018–1026.
- Taipale, M., Jarosz, D.F., Lindquist, S., 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 515–528. doi:10.1038/nrm2918
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123, 585–595.
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., Sunagawa, T., Yamaji, K., Asaoka, A., Mita, K., Yamakawa, M., 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. Insect Biochem. Mol. Biol., Special Issue on the Silkworm Genome 38, 1087–1110. doi:10.1016/j.ibmb.2008.09.001
- Taveecharoenkool, T., Angsuthanasombat, C., Kanchanawarin, C., 2010. Combined molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer suggest its stability in solution and how it may form pore. BMC Biophys. 3, 10.
- Taylor, A., 1993. Aminopeptidases: structure and function. FASEB J. 7, 290–298.
- Telang, A., Frame, L., Brown, M.R., 2007. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Exp. Biol. 210, 854–864. doi:10.1242/jeb.02715
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 47–61.
- Tetreau, G., 2012. Devenir du bioinsecticide *Bt*i dans l'environnement et impact sur le développement de réesistances chez le moustique. Univ. Grenoble.

- Tetreau, G., Alessi, M., Veyrenc, S., Perigon, S., David, J.P., Reynaud, S., Despres, L., 2012a. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the Field: Evidence for Spore Recycling and Differential Persistence of Toxins in Leaf Litter. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8362–8367. doi:10.1128/AEM.02088-12
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C.M., Stalinski, R., Riaz, M.A., Paris, M., David, J.P., Adang, M.J., Després, L., 2012b. Larval midgut modifications associated with *Bti* resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. BMC Genomics 13, 248.
- Tetreau, G., Chandor-Proust, A., Faucon, F., Stalinski, R., Akhouayri, I., Prud'homme, S.M., Raveton, M., Reynaud, S., 2013a. Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. Aquat. Toxicol. 140, 389–397.
- Tetreau, G., Stalinski, R., David, J.P., Després, L., 2013b. Increase in larval gut proteolytic activities and *Bt*i resistance in the dengue fever mosquito. Arch. Insect Biochem. Physiol. 82, 71–83.
- Tetreau, G., Stalinski, R., David, J.P., Després, L., 2013c. Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 894–900. doi:10.1590/0074-0276130155
- Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J.P., Reynaud, S., Despres, L., 2012c. Decreased Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquito Larvae after Contact with Leaf Litter. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5189–5195. doi:10.1128/AEM.00903-12
- 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. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6836–6840. doi:10.1128/AEM.05775-11
- Thomas, D.J.I., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M., Saunders, J.R., 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 67, 330–338.
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R.A., Gury, J., 2008. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bt*i) in mosquito natural habitats. PLoS One 3, e3432.
- Treitz, C., Cassidy, L., Höckendorf, A., Leippe, M., Tholey, A., 2015. Quantitative proteome analysis of *Caenorhabditis* elegans upon exposure to nematicidal *Bacillus thuringiensis*. J. Proteomics 113, 337–350. doi:10.1016/j.jprot.2014.09.027
- Ursic Bedoya, R.J., Mitzey, A.M., Obraztsova, M., Lowenberger, C., 2005. Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 14, 89–94. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00534.x
- Vachon, V., Laprade, R., Schwartz, J.L., 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. J. Invertebr. Pathol. 111, 1–12.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 270, 5490–5494.
- Valadez-Lira, J.A., Alcocer-Gonzalez, J.M., Damas, G., Nuñez-Mejía, G., Oppert, B., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, P., 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. J. Insect Sci. Online 12, 80. doi:10.1673/031.012.8001
- Valadez-Lira, J.A., Alcocer-Gonzalez, J.M., Damas, G., Nuñez-Mejía, G., Oppert, B., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, P., 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. J. Insect Sci. Online 12, 80. doi:10.1673/031.012.8001

- van Munster, M., Préfontaine, 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 Mol. Biol. 16, 25–35. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00692.x
- Vega-Cabrera, A., Cancino-Rodezno, A., Porta, H., Pardo-Lopez, L., 2014. *Aedes aegypti* Mos20 cells internalizes cry toxins by endocytosis, and actin has a role in the defense against Cry11Aa toxin. Toxins 6, 464–487. doi:10.3390/toxins6020464
- Venugopal, M.G., Wolfersberger, M.G., Wallace, B.A., 1992. Effects of pH on comformational properties related to the toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin. Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol. 1159, 185–192.
- Wenes, A.L., Bourguet, D., Andow, D.A., Courtin, C., Carré, G., Lorme, P., Sanchez, L., Augustin, S., 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). Heredity 97, 127–134. doi:10.1038/sj.hdy.6800845
- Wijffels, G., Eisemann, C., Riding, G., Pearson, R., Jones, A., Willadsen, P., Tellam, R.,
 2001. A Novel Family of Chitin-binding Proteins from Insect Type 2 Peritrophic Matrix.
 J. Biol. Chem. 276, 15527–15536. doi:10.1074/jbc.M009393200
- Wirth, M.C., Delécluse, A., Federici, B.A., Walton, W.E., 1998. Variable Cross-Resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. jegathesan in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Resistant to Single or Multiple Toxins of *Bacillus thuringienisis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4174–4179.
- Wirth, M.C., Ferrari, J.A., Georghiou, G.P., 2001. Baseline Susceptibility to Bacterial Insecticides in Populations of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. J. Econ. Entomol. 94, 920– 928. doi:10.1603/0022-0493-94.4.920
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P., Federici, B.A., 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 10536–10540.
- 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*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 185–189.
- Wirth, M.C., Walton, W.E., Delécluse, A., 2003. Deletion of the Cry11A or the Cyt1A toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: effect on toxicity against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 82, 133–135.
- Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A., 2010. 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*. J. Med. Entomol. 47, 814–822.
- Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A., 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of Bacillus sphaericus against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 37, 401–407.
- Wojda, I., Kowalski, P., Jakubowicz, T., 2004. JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae Galleria mellonella. Arch. Insect Biochem. Physiol. 56, 143–154. doi:10.1002/arch.20001
- Wood, O., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L., Brooke, B., 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Parasit. Vectors 3, 67. doi:10.1186/1756-3305-3-67
- Xiao, Y., Zhang, T., Liu, C., Heckel, D.G., Li, X., Tabashnik, B.E., Wu, K., 2014. Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with *Bt* toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. Sci. Rep. 4, 6184. doi:10.1038/srep06184
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog. 4, e1000098. doi:10.1371/journal.ppat.1000098
- Xu, D., Côté, J.C., 2008. Sequence Diversity of *Bacillus thuringiensis* Flagellin (H Antigen) Protein at the Intra-H Serotype Level. Appl. Environ. Microbiol. 74, 5524–5532. doi:10.1128/AEM.00951-08

- Xu, X., Yu, L., Wu, Y., 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 948–954.
- Yamagiwa, M., Esaki, M., Otake, K., Inagaki, M., Komano, T., Amachi, T., Sakai, H., 1999. Activation Process of Dipteran-Specific Insecticidal Protein Produced by *Bacillus thuringiensis*subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3464–3469.
- Yamagiwa, M., Sakagawa, K., Sakai, H., 2004. Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 523–528.
- Yang, W., Dierking, K., Esser, D., Tholey, A., Leippe, M., Rosenstiel, P., Schulenburg, H., 2015. Overlapping and unique signatures in the proteomic and transcriptomic responses of the nematode *Caenorhabditis elegans* toward pathogenic *Bacillus thuringiensis*. Dev. Comp. Immunol. 51, 1–9. doi:10.1016/j.dci.2015.02.010
- Yao, J., Buschman, L.L., Lu, N., Khajuria, C., Zhu, K.Y., 2014. Changes in Gene Expression in the Larval Gut of *Ostrinia nubilalis* in Response to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Protoxin Ingestion. Toxins 6, 1274–1294. doi:10.3390/toxins6041274
- Yuan, Z., Zhang, Y., Cai, Q., Liu, E.Y., 2000. High-level field resistance to Bacillus sphaericus C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. Biocontrol Sci. Technol. 10, 41–49.
- Yu, X.Q., Zhu, Y.-F., Ma, C., Fabrick, J.A., Kanost, M.R., 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1287–1293.
- Zangar, R.C., Davydov, D.R., Verma, S., 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. Toxicol. Appl. Pharmacol. 199, 316–331. doi:10.1016/j.taap.2004.01.018
- Zhang, Q., Hua, G., Adang, M.J., 2015. Chitosan/DsiRNA nanoparticle targeting identifies AgCad1 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae as an in vivo receptor of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. jegathesan. Insect Biochem. Mol. Biol. 60, 33– 38. doi:10.1016/j.ibmb.2015.03.001
- Zhang, Q., Hua, G., Bayyareddy, K., Adang, M.J., 2013. Analyses of α-amylase and αglucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. Insect Biochem. Mol. Biol. 43, 907–915. doi:10.1016/j.ibmb.2013.07.003
- 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 (Mosc.) 47, 11263–11272.
- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G., Wu, K., 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 421–429. doi:10.1016/j.ibmb.2009.04.003
- Zhang, X., 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. U. S. A. 103, 9897–9902. doi:10.1073/pnas.0604017103
- Zhang, X., Mysore, K., Flannery, E., Michel, K., Severson, D.W., Zhu, K.Y., Duman-Scheel, M., 2015. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. J. Vis. Exp. JoVE. doi:10.3791/52523

Publications scientifiques

I. Annexe 1

Laurence Després, <u>Renaud Stalinski</u>, Guillaume Tetreau, Margot Paris, Aurélie Bonin, Vincent Navratil, Stéphane Reynaud et Jean-Philippe David

Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins

BMC Genomics (2014), 15:926

Contribution : J'ai participé à l'analyse des données RNA-seq ainsi qu'à leur discussion.
RESEARCH ARTICLE





Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to Bacillus thuringiensis israelensis toxins

Laurence Després^{1,2,4*}, Renaud Stalinski^{1,2}, Quillaume Tetreau^{1,2}, Margot Paris^{1,2}, Aurélie Bonin^{1,2}, Vincent Navratil³, Stéphane Reynaud^{1,2} and Jean-Philippe David^{1,2}

Abstract

Background: Despite the intensive use of Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) toxins for mosquito control, little is known about the long term effect of exposure to this cocktail of toxins on target mosquito populations. In contrast to the many cases of resistance to Bacillus thuringiensis Cry toxins observed in other insects, there is no evidence so far for Bti resistance evolution in field mosquito populations. High fitness costs measured in a Bti selected mosquito laboratory strain suggest that evolving resistance to Bti is costly. The aim of the present study was to identify transcription level and polymorphism variations associated with resistance to Bti toxins in the dengue vector Aedes aegypti. We used RNA sequencing (RNA-seq) for comparing a laboratory-selected strain showing elevated resistance to Bti toxins and its parental non-selected susceptible strain. As the resistant strain displayed two marked larval development phenotypes (slow and normal), each phenotype was analyzed separately in order to evidence potential links between resistance mechanisms and mosquito life-history traits.

Results: A total of 12,458 genes were detected of which 844 were differentially transcribed between the resistant and susceptible strains. Polymorphism analysis revealed a total of 68,541 SNPs of which 12,571 SNPs exhibited more than 40% frequency difference between the resistant and susceptible strains, affecting 2,953 genes. Bti resistance is associated with changes in the transcription level of enzymes involved in detoxification and chitin metabolism. Among previously described Bti-toxin receptors, four alkaline phosphatases (ALPs) were differentially transcribed between resistant and susceptible larvae, and non-synonymous changes affected the protein sequence of one cadherin, six aminopeptidases (APNs) and four —amylases. Other putative Cry receptors located in lipid rafts, such as flotillin and glycoside hydrolases, were under-transcribed and/or contained non-synonymous substitutions. Finally, immunity-related genes showed contrasted transcription and polymorphisms patterns between the two developmental resistant phenotypes, suggesting the existence of trade-offs between Bti-resistance, life-history traits and immunity.

Conclusions: The present study is the first to analyze the whole transcriptome of Bti-resistant mosquitoes by RNA-seq, shedding light on the importance of studying both transcription levels and sequence polymorphism variations to get a comprehensive view of insecticide resistance.

Keywords: RNA-seq, Bacillus thuringiensis israelensis toxins, Mosquito, Bio-insecticide resistance, Toxin receptors, Lipid rafts, Resistance costs, Evolutionary trade-offs

¹Université Grenoble Alpes, Laboratoire d'Ecologie Alpine UMR5553,

Grenoble, France

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Laboratoire d'Ecologie Alpine UMR5553, Grenoble, France Full list of author information is available at the end of the article



2014 Després et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommonsorg/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

^{*} Correspondence: laurence.despres@ujf-grenoble.fr

Després et al. BMC Genomics 2014, 15:926 http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/926

Background

Biological control strategies involving Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) are increasingly used as alternatives to chemicals in order to limit the spreading of mosquito-borne pathogens transmission and nuisance. During sporulation, Bti produces a composite crystalline inclusion composed of four main toxins: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa. Upon larval ingestion, the crystalline inclusions dissolve in the alkaline pH of the insect's gut, releasing Cry and Cyt protoxins that will be processed to active toxins by insect gut proteases [1]. Cyt and Cry toxins are known to act in synergy to kill mosquito larvae, but the precise mechanisms of their interaction are not fully understood [2,3]. Other Badillus thuringiensis subspecies produce Cry toxins that are specific to their target organism, and most research has been done on Cry toxins mode of action in various insects (mostly in lepidopterans and coleopterans, but also in dipterans) and nematodes [4,5]. The selectivity of Cry toxins is mainly due to the interaction with specific receptors present at the surface of midgut epithelium cells of the larva. The activated Cry toxins bind to specific protein receptors, insert into the membrane and form pores, resulting in midgut disruption, bacterial infection and death of the insect. In the recent years, several models have been proposed to describe the precise mode of action of Bt Cry toxins (reviewed in [6,7]). The binding of Cry toxins can involve interaction with multiple specific receptors, including cadherin-like proteins but also aminopeptidases N (APNs) and alkaline phosphatases (ALPs) which are mostly located in lipid rafts (reviewed in [8]). In mosquitoes, besides cadherins, APNs and ALPs, D-amylases were also shown to bind to Cry4Ba and Cry11Aa toxins [9]. As compared to what is known about the mode of action of Bt Cry toxins in lepidopterans and coleopterans, the understanding of Bti mode of action in mosquito lies far behind, mainly due to the lack of Bti-resistant mosquito populations to dissect the mechanisms of resistance. Indeed, the cocktail of toxins produced by Bti, and especially the presence of Cyt toxin, appear to hinder the evolution of resistance to Bti both in the laboratory and in the field [2]. However, recent works conducted in our group revealed that Cyt1Aa toxin was strongly affected by the organic matter found in most mosquito breeding sites, inducing a decreased efficacy and a low-level persistence of Cyt toxins as compared to Cry toxins [10,11]. This ultimately led to the modification of toxins proportions in field-persistent Bti (Cry toxins became the most abundant toxins while it is Cvt toxin in commercial Bti), as shown in leaf litters containing persistent Bti sampled in mosquito breeding sites several months after a treatment [11]. This field-collected Bti was used to select a laboratory strain for 22 generations, resistant to Bti toxins (LiTOX strain [12]). Two phenotypes were observed in the LiTOX strain: larvae with a normal development time (5 days as the parental Bora-Bora strain) named

LITOX N, and larvae with a slow development (about 10 days) named LiTOX_S. As compared to the susceptible parental Bora-Bora strain, LiTOX_N exhibited resistance ratio (RR₅₀) of 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold for Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa respectively. LiTOX_S exhibited the same resistance ratio as LiTOX_N for Cry4Ba and Cry11Aa but was not resistant to Cry4Aa [12]. In addition to an altered development, the resistant LiTOX strain exhibited lower female fecundity and lower egg survival, suggesting that Bti resistance is associated with high fitness costs [13]. In the present study, we used the LiTOX strain to undertake a whole transcriptome analysis by RNA-seq of the two developmental phenotypes LiTOX S and LiTOX N versus the susceptible parental strain aiming at dissecting the molecular pathways to resistance to Bti Cry toxins at the whole organism level, and at understanding the trade-offs underlying Cry-toxin resistance and life history traits. Transcription level and polymorphism variations associated with each resistance phenotype were identified in regards of known and new putative mechanisms involved in Bti toxins resistance and the way they might interfere with mosquito life history traits is discussed.

Results

Mapping and re-annotation results

A total of 197,175,220 short reads (75 bp) were sequenced, with an average of 33 million reads per sample. An average mapping rate of ~83% (164.66 million mapped reads) was reached. After filtering on base quality (150.86 million reads left) and on mapping quality, 129.32 million reads were retained for further analysis (Additional file 1: Table S1). A total of 12,942 transcripts showed a coverage >0.5 Reads Per Kilobase exon Model (RPKM) in at least one strain, including 2,717 transcripts showing a different structure as compared to genome annotation (21.8%) and 484 novel transcription events (NTEs) (3.7%) predicted based on spliced reads and distance from known transcripts (close or far, respectively). NTEs were not considered in further analyses. Because only 6,996 detected transcripts were functionally annotated in VectorBase (genome version AaegL2.1, vectorbase.org) we performed a Blast2GO analysis of all predicted peptides annotated as 'conserved hypothetical protein' or 'hypothetical protein' in Vectorbase against the protein database Swissprot (Blastp, E-value < $10^{\Box 3}$, annotation cut-off = 55, GO weight = 5). This allowed re-annotation of 2,608 transcripts (Additional file 2: Table S2). We also re-annotated known mosquito Bti-toxin receptors based on bibliography [14,15], ending up with about 77% of annotated transcripts in our dataset, including 80 putative Cry receptors (15 - amylases, 14 ALPs, 12 cadherins and 39 APNs), and 40 trypsins/chymotrypsins potentially involved in Cry protoxin activation, and thereafter called 'Bti candidates'. All the other transcripts were assigned to nine categories based on their annotation

as follows: 'Detoxification', 'Other enzymes', 'Cuticle', 'Immunity', 'Hormones and neurotransmitters signaling', 'Transcription factors', 'Intra or extracellular trafficking/chaperonins', 'Structure' and 'Unknown'.

Differential expression

Among all detected genes, 844 (6.8%) were differentially transcribed (Table 1) in at least one LiTOX phenotype as compared to the parental susceptible strain, including 12 candidate genes (Additional file 3: Table S3). The two LiTOX phenotypes shared 266 differentially transcribed genes as compared to the susceptible (191 and 75 genes under and over-transcribed, respectively, Figure 1), and 84 genes were over-transcribed in LiTOX_N and undertranscribed in LiTOX S. Among genes under-transcribed in both phenotypes, GO terms associated with detoxification process were over-represented, while those associated with cuticle/chitin metabolism were over-represented in genes over-transcribed (Figure 1, Additional file 4: Table S4). In genes specifically under-transcribed in LiTOX N, GO terms associated with immunity and ALP activity were over-represented. In LiTOX_S, GO terms associated with lipid metabolism were over-represented among the under-transcribed genes and those associated with proteolytic activity were over-represented in overtranscribed genes. Among candidate genes, some specific proteases such as the chymotrypsin AAEL015105 or the trypsin AAEL006376, potentially involved in Cry protoxin activation, were under-transcribed in both LiTOX phenotypes (Figure 2). Among genes differentially transcribed between the two LiTOX phenotypes, one serine protease (AAEL010139) was below the detection threshold in LITOX N (0.2 RPKM, as compared to 7.4 and 8.2 RPKM in Bora-Bora and LiTOX S strains respectively), and five putative Cry receptors were differentially transcribed: one -amylase (AAEL010540) and four ALPs (AAEL003286, AAEL003309, AAEL009077 and AAEL000931). Genes involved in immunity showed contrasted expression patterns in the two LiTOX phenotypes: several genes involved in the melanization process (prophenoloxidases) were under-transcribed in both LiTOX phenotypes, three defensins (antimicrobial peptides) were undertranscribed only in LiTOX N, and several genes involved in the Toll pathway (e.g., spaetzle-like cytokine) were over-transcribed in LiTOX N and under-transcribed in LiTOX S. Finally, genes involved in cuticle/chitin metabolism were mostly over-transcribed in LiTOX N and under-transcribed in LiTOX S. Conserved domain search (CDS) revealed that all but four were chitin-binding proteins containing the typical Rebers & Riddiford (RR) consensus motif [16]. Based on phylogenetic analysis and sequences alignment, 26 (59%) contained the diagnostic motif GFxAxV (degenerated in three of them) of RR-2 cuticle proteins while 18 (41%) were RR-1 cuticle proteins [17,18] (Figure 3).

SNPs detection and analysis

A total of 166,943 SNPs were called, of which 68,541 had a total coverage 30 and affected 6,511 genes distributed over ~67% (1106/1636) of the Ae aegypti supercontigs that have annotated genes, including 66 candidate genes (50 receptors and 16 trypsins/chymotrypsins). A total of 2,953 genes were affected by 12,571 differential SNPs (more than 40% allelic frequency difference between the susceptible and resistant strains). Little overlap was found between genes differentially transcribed in selected strains and those affected by differential SNPs: only 76 differentially expressed genes were affected by non-synonymous differential SNP (Additional file 3: Table S3). This was expected as RNAseq data are restricted to transcripts and did not cover regulatory regions often located outside transcript boundaries. While in genes differentially transcribed, three categories of genes were over-represented ('chitin/cuticle', 'detoxification' and 'immunity'), two other categories of genes ('intra/extra cellular trafficking' and 'enzymes') were over-represented in genes affected by differential SNPs between the resistant and susceptible strains (Figure 4). Thirty two candidates (25 putative toxin

	LiTOX-N		Litox-	S	Any strains	
	Transcripts	%	Transcripts	%	Transcripts	%
AC* test P value and FC>=2	564	4.4%	745	5.8%	923	7.1%
Over transcribed	274	2.1%	166	1.3%	356	2.8%
Known transcripts	248	1.9%	150	1.2%	323	2.5%
Novel transcription event	26	0.2%	16	0.1%	33	0.3%
Under transcribed	290	2.2%	579	4.5%	661	5.1%
Known transcripts	269	2.1%	528	4.1%	605	4.7%
Novel transcription event	21	0.2%	51	0.4%	56	0.4%

Table 1 Differential transcription analysis overview: Number (and proportion) of transcripts significantly over or under-transcribed in each LiTOX phenotype and altogether (LiTOX-N or LiTOX-S) as compared to the control parental strain

*Audic-Clavery test.



receptors and 7 trypsins) were affected by a total of 508 SNPs from which 133 (26.3%) were differential SNPs; although this is not significantly different from the proportion of differential SNPs in all other genes affected, non-synonymous mutations were significantly more abundant in candidates than in any other affected genes (Fisher exact test, $p = 10^{-14}$; Figure 5). Among the putative Cry receptors, one cadherin, 12 aminopeptidases and 8 \Box -amylases were affected by differential SNPs (Additional file 5: Table S5). This included 27 non-synonymous SNPs affecting the

protein sequence of 1 cadherin, 8 APNs and 4 — amylases (Table 2). There was little difference in sequence between the two resistant phenotypes, with only 330 differential SNPs (including 14 non-synonymous changes) affecting 130 genes, none of them being candidate genes (Additional file 6: Table S6).

Discussion

Two main mechanisms of resistance to Cry toxins have been described in insects so far: altered protoxin activation





56 AAEL004776			10 20					
AAEL004760 AAEL004766 AAEL004766 AAEL004766 AAEL004766 AAEL004772 AAEL004772 AAEL004782 AAEL004782 AAEL009783 AAEL009783 AAEL009783 AAEL009794 AAEL009794 AAEL009794 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL009793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793 AAEL007793	RR-2 chitin-binding proteins	AAEL009793 AAEL009791 AAEL009791 AAEL009794 AAEL009783 AAEL009783 AAEL009783 AAEL009783 AAEL009780 AAEL009780 AAEL009801 AAEL004710 AAEL004776 AAEL004776 AAEL004776 AAEL004776 AAEL004772 AAEL004772 AAEL004782 AAEL004782 AAEL008988 AAEL014978 AAEL009001 AAEL009739 AAEL009739 AAEL008764 AAEL004982	GSYSIVDADGYKRTVDYTADPIHGFNAAV GSYSIVDADGYKRTVDYTADPIHGFNAAV GSYSIVDADGYKRTVDYTADPIHGFNAAV GSYSIVDADGYKRTVDYTADPIHGFNAAV GSYSIVDADGYKRTVDYTADPIHGFNAAV GSYSIVDADGYKRTVDYTADPINGFNAV GSYSIVDADGKRTVDYTADPINGFNAV GSYSIVDADGFKRTVEYTADPVNGFNAVV GSYSIVDADGFKRTVEYTADPVNGFNAVV GSYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GSYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GSYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GSYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GYSIVDADGFKRTVEYTADPINGFNAVV GYSIVADGGKRTVDYTADKHSGFNAVV GYTLIDADGYRVVDYTADHNGFNAVV GYTLIDADGHRRIVDYHADHNSFNAVV GYSLIDADGHKRTVYHVDGKSGFIAQV GYYLIDADGHKRTVTHVDGKSGFIAQV GYYLIDADGTRVVEYTADDHNGFNAVV GYYLIDADGTRVVEYTADDHNGFNAVV GYYLIDADGTRVVEYTADDHNGFNAVV GYYLIDADGHKRTVTHVDGKSGFIAQV GYYLIDADGHKRTVTHVDGKSGFIAQV GYYLIDADGHKRTVTHVDGKSGFIAQV GYYLIDADGHKRTVTHVDGKSGFIAQV GYYLIDADGTRVEYTADDHNGFNAVV GYYLFDAGSTRIVEYTADDHNGFNAVV GYYLFDAGSTRIVEYTADDHNGFNAVV GYYLFDAGSTRIVEYTADDHNGFNAVV GYYLFDAGSTRIVEYTADDHNGFNAVV					
4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	RR-1 chitin-binding proteins	AAEL008983 AAEL008869 AAEL008872 AAEL008873 AAEL001733 AAEL001735 AAEL003226 AAEL003226 AAEL003221 AAEL011444 AAEL003272 AAEL01134 AAEL00134 AAEL008285 AAEL008285 AAEL008288 AAEL002441 AAEL008765 AAEL002440	CYTLEEA GGHRVWENESDAHG <u>HIOIOM</u> * * : ** : * * : * : * : * : * : *					
Figure 3 Phylogenetic analysis and sequence alignment of R&R consensus domain from the 44 differentially transcribed genes encoding chitin-binding proteins. Representatives from the two RR sub-groups from other insect species were added to support the tree (Anopheles gambiae: AnGOP2a-RR2, AAO05656; Bombyx mori: Bm-LCP17-RR1, FAA00504; BmLCP22-RR1, NP_001036828; BMEDC84A-RR2, BAA33195; BMWCP1A-RR2, BAB32475; Drosophila melanogaster: Dm-LCP1-RR1, NP_476619; Dm-EDG78-RR1, NP_524198; Dm-Gart-RR1, NP_476673; DMCp84Aa-RR2, AAD19803; DMEDC84-RR2, P27780; Manduca seta: MsLCP14-RR1, AAA29319; MsLCP14-RR1, Q94984; Tenebrio molitor: TM-LCP-A1A-RR2, P80681; TMACP20-RR2, P20967. Bootstrap values (2000 replicates) are shown on each branch of the tree. Symbols below the aligned amino acids indicate identity (*), or high conservation (:). Identical and highly conserved amino acids are highlighted in dark grey and light grey, respectively. The GFxAxV motif, diagnostic of the RR2 sub-group, is highlighted by a box.								

by gut proteases, and modification in transcription level and/or protein sequence of Cry receptors resulting in lower or failure in toxin binding [19-21]. The study of resistance to Cry toxins in insects has mostly been based on the study of a few candidate proteins first identified in lepidopterans, either toxin receptors or proteases, using proteomic approaches (2D-DIGE, ligand blotting, etc.). As compared to other Bacillus thuringiensis subspecies that typically produce a single Cry toxin, Bti produces a mixture of four different toxins,

Annexe 1



and resistance to Bti is likely to involve multiple distinct mechanisms, which may affect the physiology and metabolism of resistant insects. Altered metabolism in Bti resistant mosquitoes was revealed by fitness costs expressed at any mosquito life-stage (larval development time, fecundity, egg survival) [13]. These costs can result from pleiotropic effects of resistant alleles on life-history traits (direct cost) or more indirectly from resource reallocation between different metabolic pathways.



Annexe 1

Receptor	Gene ID			Bora		LITOX_N		LITOX_S					
		Reference	Variant	%	Coverage	%	Coverage	%	Coverage	Position cDNA	Amino acid position	Amino acid change	Toxin ¹
APN1	AAEL009108	С	A	4.1	145	55.1	98	51.9	106	2539	847	A->S	
APN2	AAEL.003227	С	Т	26.6	30	63.6	11	88.9	9	2240	747	T->I	
APN2	AAEL005808	С	А	30.4	46	73.3	45	91.4	70	2289	763	M->1	Cry4Ba [40]
	AAEL005808	С	Т	31.4	51	85.7	91	95.5	110	2725	909	V->I	Cry4Ba [40]
	AAEL005808	С	Т	15.5	103	77.7	130	75.7	107	1762	588	A- > T	Cry4Ba [40]
	AAEL005808	Т	G	14.5	117	84.7	111	89.4	132	1145	382	E->A	Cry4Ba [40]
APN2	AAEL005821	А	G	5.5	255	50.0	82	63.3	150	1660	554	T- > A	
	AAEL005821	Т	С	5.0	260	56.1	98	65.0	183	1646	549	M->T	
	AAEL.005821	G	А	10.1	179	71.6	88	78.5	158	1459	487	D- > N	
APN4	AAEL007204	С	Т	20.2	263	67.4	307	70.7	314	167	56	T-> M	
	AAEL007204	G	С	40.0	190	93.2	294	95.8	239	216	72	E-> D	
	AAEL007204	С	Т	33.8	142	93.9	197	92.7	220	283	95	H->Y	
APN4	AAEL.012774	С	т	43.4	459	88.3	677	86.9	540	311	99	G->R	Cry11Aa [46
APN5	AAEL.002696	А	G	23.1	65	56.3	48	64.6	65	472	158	K->E	
	AAEL.002696	G	А	57.7	71	100.0	66	100.0	59	2380	794	V->M	
	AAEL.002696	С	А	17.8	90	66.7	42	60.4	48	2432	811	A->E	
	AAEL.002696	G	А	12.3	57	70.5	44	70.0	50	746	249	R->K	
APN5	AAEL.003666	А	G	24.6	126	63.9	72	70.8	106	1814	605	V->A	
	AAEL.003666	С	А	16.9	83	64.9	74	73.0	89	595	199	A->S	
APN7	AAEL007201	А	G	25.2	163	76.1	46	96.4	28	2219	740	N- > S	
Cadherin	AAEL018140	Т	А	12.1	33	43.9	57	58.7	63	790	160	H->L	Cry11Aa [15
□-amylase	AAEL000642	А	Т	24.5	49	67.9	56	47.0	66	1424	468	T-> S	
□-amylase	AAEL007673	С	т	18.0	589	51.3	493	75.0	559	47	16	S-> N	
□-amylase	AAEL010537	AA	π	12.2	395	49.7	447	55.4	482	1706	564	⊦>F	
	AAEL010537	А	G	15.6	825	53.0	1078	58.7	1368	1324	437	K->R	
	AAEL010537	С	т	16.0	268	60.5	248	64.3	412	18	2	R>W	
	AAEL010537	С	т	21.7	1154	76.1	804	83.0	833	1552	513	A->V	
□-amvlase	AAEL.014710	G	А	9.9	81	60.0	35	56.5	23	992	331	A->V	

¹Toxin shown to bind this receptor in the literature.

Després et al. BMC Genomics 2014, 15:926 http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/926

Page 7 of 13

Després et al. BMC Genomics 2014, 15:926 http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/926

Global changes in gene expression and metabolic trade-offs

The two LiTOX phenotypes share common global transcriptional responses: an over-transcription of genes involved in proteolytic activity, cell cytokinesis and wound healing, and an under-transcription of enzymes classically involved in the detoxification of chemicals such as chemical insecticides, plants allelochemicals and pollutants (cytochrome P450 monooxygenases, esterases, glutathion S-transferases, UDP-glycosyltransferases, etc.). Conversely, Bti toxins are large proteins and their degradation requires a proteolytic processing rather than the activity of detoxification enzymes. Therefore, in the absence of chemical selection pressure, the undertranscription of these enzymes might represent a metabolic trade-off in the LiTOX strain to compensate the increased expression of enzymes involved in protein degradation [22]. The over-transcription of several proteases (endopeptidases, serine proteases) is in accordance with an observed increase in proteolytic activities of midgut enzymes of LiTOX larvae [23]. This increased proteolytic activity in Bti resistant larvae could reflect a higher ability to degrade toxins. Despite this global trend, particular proteases such as the metalloproteinases AAEL011547, AAEL011550 and AAEL014514, and the chymotrypsin AAEL015105 or the trypsin AAEL006376, which are putatively involved in Cry protoxin activation, were under-transcribed in both LiTOX phenotypes. The lack of metalloproteinase activity in the LiTOX strain was evidenced by the analysis of enzymatic activities in the midgut of larvae using various specific enzyme inhibitors [22]. Down-regulation of specific proteases might result in a lower and/or improper toxin activation which could also confer resistance. In lepidopterans, analysis of proteinase activities from gut extracts have shown the lack of trypsinlike and of chymotrypsin-like activity in Bt-resistant strains [20]. Furthermore, the role of proteases in resistance to Bt toxin Cry1Ca1 was demonstrated in the caterpillar Spodoptera frugiperda where a serine-protease gene under-transcribed in the midgut of intoxicated larvae was further shown by RNAi-mediated knockdown to be involved in both reduced protoxin activation in the midgut and reduced susceptibility of caterpillars to toxins in bioassays [24].

Lipid rafts and Bti-toxins trafficking through the gut membrane

Lipid rafts are membrane domains enriched in glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins that have been implicated in transmembrane protein trafficking and were shown to play a role as portals of entry for many pathogens including viruses, bacteria and their toxins [25,26]. Several studies suggested that lipid rafts might play a central role in Bt-toxins toxicity. For example, the presence of lipid rafts was shown to be essential for the toxicity of Cry1C on Sf9 Lepidoptera cells [27]. However, the specific proteins associated with this mechanism have not been identified yet. A flotillin, a protein found in lipid rafts and described as a toxin transporter [28], was undertranscribed in both LiTOX phenotypes. Flotillin was shown to co-localize with Cry4Ba toxin in Aedes aegypti larval gut brush border membranes [25], and further investigation of its Cry-binding ability will contribute to characterize its role in Bti toxin resistance. Four glycosidehydrolases were under-transcribed in both LiTOX phenotypes. Although never described as Cry toxin receptors, glycoside-hydrolases were shown to be associated with lipid rafts in the gut membrane of Aedes larvae [25]. Lipid rafts appear to play a central role in pore-forming toxins insertion in the gut membrane by functioning as platforms to recruit GPI-anchored proteins including APNs, ALPs, and glycoside-hydrolases. The role of some GPI-anchored proteins (flotillin and glycoside-hydrolases) largely present in lipid rafts of Aedes larvae guts has been so far underexplored in studies aiming at understanding Cry toxins toxicity in insects, and the present study pinpoints them as new potential candidates in Aedes.

Differences between the two LiTOX phenotypes Several gene families were differentially transcribed between the two developmental phenotypes: genes involved in cuticle/chitin metabolism, prophenoloxidases, and genes coding for enzymes involved in lipid metabolism.

In our dataset, the category of cuticle/chitin proteins contained the highest number of genes differentially transcribed (Figures 2 and 4b, Additional file 3: Table S3). Cuticle is an exoskeleton constituted of chitin that provides physical support and protects the insects from physical injuries, desiccation and infections. Cuticle is typically divided into hard cuticle, generally sclerotized and mechanically stiff, and soft cuticle, a more flexible region that allows locomotion and appendix movements [29]. Chitin is always associated with chitin-binding proteins; although their exact function is to be investigated, it has been hypothesized that they could play important roles in cuticle metabolism and structure preservation [30]. Nearly all the genes identified as differentially transcribed in this category contained the R&R chitin-binding motif and were associated with the soft cuticle (RR-1 cuticle proteins) or with the hard cuticle (RR-2) [17]. The global undertranscription of these genes in the LiTOX_S could partly explain the slow development of this cohort, considering that a low chitin metabolism is believed to slow-down the molting process and increase the development duration. Nevertheless, it is intriguing why only genes encoding R&R-containing proteins were found differentially transcribed while genes encoding other chitin-binding proteins with peritrophin-A chitin-binding domains (ChtBD2

domain) and chitin metabolism enzymes (such as chitinases) were not differentially expressed. Also, it is challenging to know if this pattern is a side-effect consequence of the resistance phenotype or if it is part of the mechanisms of resistance developed by the insects against Cry toxins. A better understanding of the role of such proteins in the cuticle metabolism is mandatory to help deciphering their potential involvement in resistance phenotypes in insects.

Prophenoloxidases are involved in the melanization process, and as such they have a dual role: they contribute to cuticle formation (and larval development), and they participate in the immune response against pathogens by their encapsulation [31]. In Ae. aegypti, both defensins and phenoloxidases were shown to participate to immune response against bacterial challenge [32]. In our dataset, prophenoloxidases were under-transcribed in both LiTOX phenotypes, while defensins were under-transcribed only in LiTOX N (Figure 2, Additional file 3: Table S3). Furthermore, a correlation was observed between age at pupation (development speed) and mosquito's ability to melanize Sephadex beads (immuno-capacity), suggesting that an increased immunity is costly and results in a slower development [33]. The two developmental phenotypes observed in the resistant mosquito strain LiTOX might be the result of a trade-off between immunity and development.

When focusing on candidate genes, only few differences in transcription level and no significant difference in polymorphism were observed between the two LiTOX phenotypes (e.g. between LiTOX N and LiTOX S). The serine protease AAEL010139 was not expressed in LiTOX N, the Cry4Aa-resistant cohort. Among the putative Cry-toxin receptors, four alkaline phosphatases (ALPs) were differentially transcribed between the two LITOX phenotypes: ALP AAEL003286 was specifically under-transcribed in LiTOX_N, which may be linked to the high Cry4Aa resistance of this phenotype. Three other ALP were specifically under- (AAEL003309 and AAEL009077) or over-transcribed (AAEL000931) in LiTOX_S. Cry4Aa mode of action and mechanisms of resistance are the least investigated and understood among the Bti toxins. Functionally validating the involvement of these few candidate genes could help lifting the veil on the specific mechanisms associated with Cry4Aa resistance and provide a better understanding of the patterns of cross-resistance between Bti Cry toxins.

Polymorphisms rather than expression changes are found in putative Bti-toxins receptors

Among the 80 putative Cry receptors detected in larvae, only 5 were differentially transcribed in the LiTOX strain as compared to the susceptible strain. Among these, the -amylase AAEL010540 was under-transcribed in both LiTOX phenotypes sharing resistance to Cry4Ba and Cry11Aa. In An. albimanus, an _-amylase (aamy1) has been described as a Bti toxin receptor, binding both Cry4Ba and Cry11Aa [9]. Although this requires functional validation, this suggests that the Ae. aegypti □amylase AAEL010540 (48% identity with aamy1) could bind Cry toxins. No cadherin or APN that were previously associated with Cry resistance in insects [34-37] or showed to bind Bti Cry toxins in mosquitoes [38-40] were differentially transcribed in the LiTOX strain, suggesting that if they are involved in Bti resistance in LiTOX, this is not related to an altered expression but rather to changes in protein sequence affecting their affinity for Cry toxins. Indeed, one cadherin, eight APNs and four □-amylases displayed differential SNPs leading to non-synonymous changes between the resistant and susceptible strains.

Cadherin

CAD-like proteins have been the most intensively studied putative Cry toxin receptor molecules in lepidopteran and coleopteran larvae [41-43]. It has been proposed that they act as the first receptors of Cry toxins, binding toxin monomers and facilitating further processing required for the pre-pore oligomer formation [44]. Although twelve CAD-like proteins were detected in our dataset, none was differentially transcribed, and only one (AAEL018140) contained several differential SNPs (Table 2). This cadherin was previously shown by proteomic approaches to act as a Cry11Aa toxin receptor [15]. It contains a Nterminal signal peptide, 11 cadherin repeats (CR1 to CR11), a membrane-proximal region (MPR) and a transmembrane domain. The only differential non-synonymous SNP distinguishing Bti-resistant and susceptible strains (H160L) is located in the N-terminal region preceding the first cadherin repeat (CR1), while overlay assays and immune-blotting localized Cry11Aa and Cry4Aa toxin-binding regions in CR8-CR11 [15]. More generally, Cry-toxin binding sites were usually described in the membrane-proximal region of insect cadherins, not in the N-terminal extracellular region [8]. However, amino-acid substitution at any location can dramatically change the secondary structure of a protein; for instance, the three cadherin alleles conferring resistance to Bt in the pink bollworm Ectinophora gossypiella are not located within the Cry1Aa binding site but upstream [45]. In this case, the deletion of several amino-acids upstream the toxin binding site was shown to alter the full-length cadherin and impede toxin binding. In the H160L mutation observed at relatively high frequency in the LiTOX strain (49-58%), a polar and positively charged amino acid (Histidine) is replaced by a non-charged hydrophobic amino acid (Leucine), which can result in a change in the spatial arrangement of the cadherin in the cell membrane. Further functional studies and in-silico protein modelling could allow investigating whether this change

affects cadherin conformation and Cry toxin binding affinity. Altogether, our results suggest that cadherin might not have a central role in resistance to Bti in mosquitoes.

APNs and □-amylases

APNs and □-amylases are digestive enzymes that play a key role in larval nutrition and development, being involved in protein and glucose metabolism, respectively. APNs have been extensively studied as putative Cry toxin receptors in many insects and were classified into 8 classes based on their sequence identity [8,14]. APNs from several classes were reported to bind with more or less affinity to the different Cry toxins in various insects, including AeAPN1 in Aedes and APN2 in Anopheles [14], but their precise role in Bti toxicity remains to be elucidated. Out of the 31 APNs detected in Ae. aegypti larvae, 12 contained differential SNPs, and non-synonymous differential changes affected the sequence of 8 of them (Table 2). In the APN2 AAEL005808 recently shown to be a functional receptor of Cry4Ba toxin [40], 4 non-synonymous changes were nearly fixed in the LiTOX strain (both phenotypes), suggesting ongoing selective sweep on this gene. One non-synonymous change affected the sequence of the APN1 AAEL012778 previously shown to bind Cry11Aa [46]. Although not usually cited as a Cry-toxin receptor, an D-amylase was recently shown to bind Cry4Ba and Cry11Aa in Anopheles [9]. Our dataset pinpoints five amylases potentially involved in Aedes resistance to Bti toxins: one D-amylase was under-transcribed only in LiTOX_N (resistant to all Cry toxins), and four other -amylases presented sequence changes in both cohorts of the resistant LiTOX strain as compared to the susceptible strain. Because of their key role in insect nutrition, altered expression of these digestive enzymes as a resistance mechanism is likely to be costly in terms of larval development, and this might explain why the observed changes in these enzymes are mostly amino-acid changes rather than changes in expression levels. Indeed, change in the protein sequence might dramatically alter toxin binding site while having small effects on digestive efficiency. Further studies on the differential abilities of these -amylases to bind Bti Cry toxins and to act as functional toxin receptors are required to determine their role in Bti toxicity. Also, molecular modelling of APN is necessary to identify the oligosaccharide that are involved in the binding of Cry toxins to verify if the SNPs described in this study can alter the Cry-APN interaction and partly explain the resistance phenotype observed [47].

Conclusions

The present study is the first to analyze the whole transcriptome of Bti-resistant larvae by deep sequencing, allowing studying change in gene expression level and sequence polymorphisms using the same dataset. It

reveals dramatic modifications in the transcriptional profiles selected in resistant larvae, with a global transcriptional increase of genes coding for proteases and chitin-binding proteins, and a decrease in transcription of genes involved in detoxification and immunity. Whether these modifications are directly involved in Btitoxin processing or more indirectly through complex metabolic compensations selected to limit the cost of resistance remains to be functionally investigated. Regarding candidate Bti-toxin receptors, our dataset relativizes the role of cadherin in resistance to Bti in mosquitoes, and highlights the importance of studying changes in the sequence rather than in transcription levels of APN and ALP, but also of other proteins involved in protein trafficking through the cell membrane such as flotillins and glucoside hydrolases.

Methods

Strains and Sample preparation

The Ae. accypti laboratory strain Bora-Bora susceptible to all insecticides was selected using field-collected leaf-litter containing Bti toxins (LiTOX strain) as described in [12]. At each generation, an average of 6,000 larvae was exposed to toxic leaf litter in order to obtain a mortality rate of 70%, so that about 1,800 adults constituted the next generation, limiting bottleneck effects in the LiTOX strain. Mosquito strains were reared in standard insectarium conditions (27°C, 14 h/10 h light/dark period, 80% relative humidity). The average generation turnover was 45 days and selection was carried out over 18 generations. Larvae were bred in the insectarium till they reached early 4th instar. LiTOX_S larvae were allowed to develop for 5 days more than other larvae. For each of the three phenotype (Bora-Bora, LiTOX N and LiTOX S) total mRNA was extracted from three pools of 60 4th-stage larvae (reared in different batches and originating from different egg-laying female pools) at the same time of the day, using the RNA gueous-4PCR kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA guantity and quality was checked using bioanalyzer, and RNA from the 3 biological replicates was pooled in equal proportion to obtain one representative total RNA sample per phenotype (each made from 180 individuals). For each of the three phenotypes, two distinct cDNA libraries were prepared from the same pool of total mRNA and sent at the National Genotyping Center (Genoscope, France) and sequenced individually on the Illumina Genome Analyser II system (GAII) to assess technical variations.

Short read mapping and assembly on the

reference genome

The Tophat algorithm (release 2.0.9, http://ccb.jhu.edu/ software/tophat) was applied with defaults parameters to align all the reads onto the Aedes aegypti reference genome AægL2.1 (http://ccb.jhu.edu/software/tophat) by taking into account, both already known (□_no-novel-juncs) and novel ab initio splice exon-exon junctions [48].

Estimation of transcripts' relative abundance and differential expression (DE) analysis

Bam files were then loaded into Genespring NGS Version 12 (Agilent) software. Reads were filtered on base quality (mean base quality >30 and <10 N per reads) and on mapping quality (alignment score>=97 and Mapping quality > = 250 and remove non-primary multiply mapped reads). Ae. aegypti genome was then re-annotated based on reads distribution and RPKM calculated for each known or new putative transcript using default parameters (min exon length percentile 10, min intro length percentile 10, max intron length percentile 90, min exon RPKM percentile 50, min gene RPKM percentile 50, min gene length percentile 10, min exon RPKM with respect to host gene percentage 75, minimum number of reads in exon 10). For each strain, RPKM correlation between technical replicates was calculated. As r² were >0.9 for all strains (acceptable technical variation, see Additional file 7: Figure S1), technical replicates were pooled for further analyses, in order to reach a high coverage per transcript and per SNP position. Transcripts with >0.5 RPKM in at least one strain were retained for differential transcription analysis. Differential transcription level was tested for each transcript between each resistant phenotype (LiTOX_N and LiTOX_S) and the parental strain Bora-Bora using an Audic Clavery test designed to compare two cDNA libraries [49]. This Bayesian method is based on the assumption that under the null hypothesis, read counts of the same gene in two libraries come from the same but unknown Poisson distribution. The posterior probability is obtained by Bayesian averaging (infinite mixture) of all possible Poisson distributions with mixing proportions equal to the posteriors under the flat prior. This probability is further adjusted for multiple testing (Benjamini and Hochberg correction). Despite this popular method has been validated by the statistician community [50], we recommend sequencing biological replicates rather than pooling them prior sequencing in future RNAseg analyses, as sequencing costs are now acceptable and the later approach allows a more robust identification of genes affected by variations across conditions. Transcripts showing an adjusted P- value <10¹⁵ and a fold change 2 fold in either direction were considered differentially transcribed.

GO term analysis

The annotation terms from the GO ontology were retrieved from the VectorBase-UniprotKB links. For each resistant phenotype and each differential expression state (i.e. up or down regulated as compared to the Bora-Bora strain), GO terms significantly over-represented were determined using a corrected P-value threshold of 0.05.

SNP detection and analysis

Detection of polymorphisms was performed based on the 129.32 million reads passing quality filters with the following parameters: confidence score threshold =100, coverage >20 reads, base quality cut off =5, ignore locations within or next to homopolymer stretches >10 nucleotides. Among all detected polymorphism variations, only SNP substitutions were considered for differential polymorphism analyses. SNP allele frequencies were then computed between each LiTOX phenotype and the susceptible strain. In a previous study on the LiTOX strain, we have validated the reliability of mRNA sequencing pooled data for inferring population allelic frequencies on 269 SNP: the correlation between allelic frequencies obtained from pooled mRNA sequencing (180 pooled larvae) and individual genotypes (N = 28 individuals) obtained using a DNA Illumina GoldenGate array was highly significant (P < 0.001, r = 0.85) [51]. Allele frequencies were considered as differential between a LiTOX phenotype and the susceptible strain (hereafter named as differential SNPs) if the following conditions were fulfilled: total read coverage at SNP position 30 and allelic frequency difference between both strains 240% in either direction. Genic effects of SNPs were computed by comparing SNP locations with reference genome annotation, and were defined as 5'UTR, synonymous, nonsynonymous, 3'UTR and other (intronic or intergenic- i.e. close but not within gene boundaries).

Phylogenetic analysis and sequence alignment of R&R consensus domain from the differentially transcribed genes encoding chitin-binding proteins Phylogenetic analysis (neighbor joining) was performed using MEGA 6.06 software on the chitin-binding domains identified using the CDS search software (https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). Representatives from the two RR sub-groups from other insect species were added to support the tree (Anopheles gambiae: AnGCP2a-RR2, AAC05656; Bombyx mori: Bm-LCP17-RR1, FAA00504; BmLCP22-RR1, NP 001036828; BMEDG84A-RR2, BAA33195; BMWCP1A-RR2, BAB32 475; Drosophila melanogaster: Dm-LCP1-RR1, NP 4766 19; Dm-EDG78-RR1, NP_524198; Dm-Gart-RR1, NP_4 76673; DM Ccp84Aa-RR2, AAD 19803; DM EDG84-RR2, P27780; Manduca sexta: MsLCP14-RR1, AAA29319; MsLCP14.6-RR1, Q94984; Tenebrio molitor: TM-LCP-A1A-RR2, P80681; TMACP20-RR2, P26967). Alignments were performed using the ClustalW software from PBIL Expasy tool (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa automat.pl?page=/NPSA/npsa clustalw.html).

Després et al. BMC Genomics 2014, 15:926 http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/926

Ethics

Mosquito rearing was performed according to protocol CEEA-LR-13002 agreed by the French National Committee of ethics for animal experimentation.

Data access

RNAseq data are available at EBI/SRA/ArrayExpress (accession number E-MTAB-1635).

Additional files

Additional file 1: Table S1. Sequencing and mapping statistics.

Additional file 2: Table S2. Blast2GO analysis of all predicted peptides annotated as 'conserved hypothetical protein' or 'hypothetical protein' in Vectorbase against the protein database Swissprot (Blastp, E-value < 10-3, annotation cut-off = 55, GO weight = 5).

Additional file 3: Table S3. List of genes differently expressed between resistant and susceptible Bora-Bora strains classified according to their category.

Additional file 4: Table S4. GO terms enrichment analysis. Analysis was performed on transcripts significantly differentially expressed in each LITOX phenotype as compared to the susceptible strain. GO terms associated with each transcript were extracted from Vectorbase. GO terms

showing adjusted P values <0.05 were considered significantly enriched.

Additional file 5: Table S5. List of supercontigs and genes affected by differential SNPs and their effects. The total number of SNPs affecting these genes is also shown.

Additional file 6: Table S6. List of genes with differential SNPs between LiTOX_N and LiTOX_S non-synonymous changes are indicated. Additional file 7: Figure S1. RFKM correlations between cDNA library replicates. Each dot represents one transcript. Only transcripts showing more than 0.5 RFKM are shown.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LD conceived the study, analyzed the data, performed the statistical analysis and wrote the manuscript. RS and MP participated in the data analysis. GT carried out the analysis of cuticle/chitin genes and helped to draft the manuscript. Wh carried out the mapping of reads on the genome. AB, JPD and SR performed the RNA extraction. JPD conceived the study, and participated in its design and analysis and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by the Région Rhône-Alpes (CIBLE program) and the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-CES-006-01 DIBBECO). We thank T. Gaude and S. Veyrenc for their technical assistance in mosquito rearing.

Author details

¹Université Grenoble Alpes, Laboratoire d'Ecologie Alpine UMF6553, Grenoble, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNFS), Laboratoire d'Ecologie Alpine UMF6553, Grenoble, France. ³Pôle Rhône Alpes de Bioinformatique, Université Lyon 1, Lyon, France. ⁴Laboratoire d'Ecologie Alpine, 2233 rue de la piscine, Université J. Fourier, BP53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Received: 27 June 2014 Accepted: 16 October 2014 Published: 23 October 2014

References

1. Lacey LA: Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc 2007, 23(2):133–163.

- Wirth MC, Park HW, Walton WE, Federici BA: Cyt1A of Bacillus thuringiensis delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito Culex guinguefasciatus. Appl Environ Microbiol 2005, 71(1):185–189.
- Perez C, Fernandez LE, Sun JG, Folch JL, Gill SS, Soberon M, Bravo A: Bacillus thuringiensis subsp israelensis Cyt1Aa synergizes Cyt1Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. Proc Natl Acad Sti U SA 2005, 102(51):18303–18308.
- Ferré J, Escriche 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.
- Griffitts JS, Haslam SM, Yang TL, Garczynski SF, Mulloy B, Morris H, Oremer PS, Dell A, Adang MJ, Aroian RV. Glycollipids as receptors for Bacillus thuringiensis crystal toxin. Science 2005, 307(5711):922–925.
- Soberon M, Gill SS, Bravo A: Signaling versus punching hole: How do Bacillus thuringiensis toxins kill insect midgut cells? Cell Mol Life Sci 2009, 66(8):1337–1349.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz J.: Ourrent models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: a critical review. J Invertebr Pathol 2012, 111(1):1–12.
- Pgott CR, Ellar DJ: Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity. Microbiol Mol Biol Rev 2007, 71(2):255–281.
- Fernandez-Luna MT, Lanz-Mendoza H, GII SS, Bravo A, Soberon M, Miranda-Ros J: An alpha-amylase is a novel receptor for Bacillus thuringiensis ssp israelensis Ory4Ba and Ory11Aa toxins in the malaria vector mosquito Anopheles albimanus (Diptera: Oulicidae). Environ Microbiol 2010, 12(3):746–757.
- Tetreau G, Stalinski R, Kersusan D, Veyrenc S, David JP, Reynaud S, Despres L: Decreased Toxicity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis to Mosquito Larvae after Contact with Leaf Litter. Appl Environ Microbiol 2012, 78(15):5189–5195.
- Tetreau G, Alessi M, Veyrenc S, Périgon S, David JP, Reynaud S, Despres L: Fate of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. Appl Environ Microbiol 2012, 78(23):8362–8367.
- Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J.P. Persistence of Bacillus thuringiensis israelensis (Bi) in the environment induces resistance to multiple Bit toxins in mosquitoes. Pest Manag Sti 2011, 67:122–128.
- Paris M, David JP, Despres L: Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector Aedes aegypti. Ecotoxicology 2011, 20:1184–1194.
- 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.
- Chen JW, Aimanova KG, Fernandez LE, Bravo A, Soberon M, GII SS Aedes aegypti cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from Bacillus thuringiensis subsp israelensis. Blochem J 2009, 424:191–200.
- Rebers JE, Rddiford LM: Structure and expression of a Manduca sexta larval cuticle gene homologous to Drosophila cuticle genes. J Mol Biol 1988, 203(2):411–423.
- Andersen SO: Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, Schistocerca gregaria. Insect Biochem Mol Biol 1998, 28(5–6):421–434.
- Willis JH, Iconomidou V, Smith RF, Hamodrakas SJ: Cuticular proteins. In Comprehensive Molecular Insect Science, Volume 4. Edited by Gilbert L, latrou K, Gill S Oxford: Esevier; 2005;79–110.
- Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning OM, Liu CX, Wu KM, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, Perera O, Adang M: Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from Bacillus thuringiensis. PLoS One 2011, 6(3):e17606.
- Karumbaiah L, Oppert B, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ: Analysis of midgut proteinases from Bacillus thuringiensis-susceptible and -resistant Heliothis virescens (Lepidoptera : Noctuidae). Comp Bochem Physiol B-Bochem Mol Biol 2007, 146(1):139–146.
- Rajagopal R, Svakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK Silencing of midgut aminopeptidase N of Spodoptera litura by double-stranded RNA establishes its role as Bacillus thuringiensis toxin receptor. J Bol Chem 2002, 277(49):46849–46851.
- Tetreau G, Bayyareddy K, Jones OM, Stalinski R, Raz MA, Paris M, David JP, Adang MJ, Despres L: Larval Midgut Modifications Associated with Bti Resistance in the Yellow Fever Mosquito using Proteomic and Transcriptomic Approaches. BMC Genomics 2012, 13:248.

Després et al. BMC Genomics 2014, 15:926 http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/926

- Tetreau G, Stalinski R David JP, Despres L: Increase in larval gut proteolytic activities and Bti resistance in the dengue fever mosquito. Arch Insect Biochem Physiol 2013, 82(2):71–83.
- Rodriguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Borras-Hidalgo O, Wright DJ, Ayra-Pardo C: RNAi-mediated knockdown of a Spodoptera frugiperda trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a Bacillus thuringiensis Cry1Ca1 protoxin. Environ Microbiol 2010, 12(11)2894–2903.
- Bayyareddy K, Zhu X, Orlando R Adang MJ Proteome Analysis of Cry4Ba Toxin-interacting Aedes aegypti Lipid Rafts using geLC-MS/MS J Proteome Res 2012, 11(12)5843–5855.
- Retveld A, Neutz S, Smons K, Eaton S Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. J Biol Chem 1999, 274(17):12049–12054.
- Avisar D, Segal M, Sheh B, Zilberstein A: Cell-cycle-dependent resistance to Bacillus thuringiensis Cry1C toxin in St9 cells. J Cell Si 2005, 118(14)3163–3171.
- Pust S, Dyve AB, Torgersen ML, van Deurs B, Sandvig K Interplay between Toxin Transport and Rotillin Localization. Ros One 2010, 5(1):e8844.
- Iconomidou VA, Willis JH, Hamodrakas St Unique features of the structural model of 'hard' cuticle proteins implications for chitin-protein interactions and cross-linking in cuticle. Insect Bochem Mol Bol 2005, 35(6):553–560.
- Jasrapuria S, Arakane Y, Osman G, Kramer KJ, Beeman RW, Muthukrishnan S Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in Tribolium castaneum are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function. Insect Biochem Mol Biol 2010, 40(3):214–227.
- Christensen BM, Li JY, Chen OC, Nappi AJ: Melanization immune responses in mosquito vectors. Trends Parasitol 2005, 21(4):192–199.
- Hillyer JF, Christensen BM: Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. J Histochem Oytochem 2005, 53(6):689–698.
- Koella JC, Boete C. A genetic correlation between age at pupation and melanization immune response of the yellow fever mosquito Aedes aegypti. Evolution 2002, 56(5):1074–1079.
- Xie RY, Zhuang MB, Ross LS, Comez I, Ottean DI, Bravo A, Soberon M, Gill SS Single amino acid mutations in the cadherin receptor from Heliothis virescens affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. J Bol Chem 2005, 280(9):8416–8425.
- Squeira HAA, Conzalez-Cabrera J, Ferré J, Hannagan R, Segfried ED: Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, Ostrinia nubilalis (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). Appl Environ Microbiol 2006, 72(8):5318–5324.
- Sayed A, Nekl ER Squeira HAA, Wang HC, Ffrench-Constant RH, Bagley M, Segfried BD: A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue. Insect Mol Biol 2007, 16:591–600.
- Peng DH, Xu XH, Ye WX, Yu ZN, Sun M: Helicoverpa armigera cadherin fragment enhances Ory1Ac insecticidal activity by facilitating toxin-oligomer formation. Appl Microbiol Biotechnol 2010, 85(4):1033–1040.
- Likitvivatanavong S, Chen JW, Bravo A, Soberon M, Gll SS Cadherin, Alkaline Phosphatase, and Aminopeptidase N as Receptors of Cry11Ba Toxin from Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan in Aedes aegypti. Appl Environ Microbiol 2011, 77(1)24–31.
- Hua G, Zhang R, Abdullah MAF, Adang MJ. Anopheles gambiae cadherin AgCad1 binds the Ory4Ba toxin of Bacillus thuringiensis israelensis and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. Bochemistry 2008, 47(18):5101–5110.
- Saengwiman S, Aroonkesom 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. Bochem Bophys Res Commun 2011, 407(4):708–713.
- Hannagan RD, Yu CG, Mathis JP, Meyer TE, Shi XM, Squeira HAA, Segfried BD: Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, Ostrinia nubilalis (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). Insect Biochem Mol Biol 2005, 35(1):33–40.
- Fabrick JA, Tabashnik BE Binding of Bacillus thuringiensis toxin Ory1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. Insect Biochem Mol Bol 2007, 37(2):97–106.
- Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes J.: A Novel Tenebrio molitor Cadherin Is a Functional Receptor for Bacillus thuringiensis Cry3Aa Toxin. J Biol Chem 2009, 284(27):18401–18410.

- 44. Bravo A, Gomez I, Conde J, Munoz-Garay C, Sanchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberon M: Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochimica B Biophysica Acta-Biomembranes 2004, 1667(1):38–46.
- Morin S, Bggs RW, Ssterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE Three cadherin alleles associated with resistance to Bacillus thuringiensis in pink bollworm. Proc Natl Acad Sci U SA 2003, 100(9):5004–5009.
- 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.
- Sngh A, Svaprasad C Functional interpretation of APN receptor from M. sexta using a molecular model. Bioinformation 2009, 3(8):321–325.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL: TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics 2009, 25(9):1105–1111.
- Audic S Oaverie JM: The significance of digital gene expression profiles. Genome Res 1997, 7:986–995.
- Tiňo P. Basic properties and information theory of Audic-Claverie statistic for analyzing cDNA arrays. BVC Bioinformatics 2009, 10:310.
- Paris M, Marcombe S, Coissac E, Corbel V, David JP, Despres L: Investigating the genetics of Bti resistance using mRNA tag sequencing: application on laboratory strains and natural populations of the dengue vector Aedes aegypti. Evol Appl 2013, 6(7):1012–1027.

doi:10.1186/1471-2164-15-926

Cite this article as: Després et al.: Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to Bacillus thuringiensis israelensis toxins. BMC Genomics 2014 15:926.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit



II. Annexe 2

Guillaume Tetreau, <u>Renaud Stalinski</u>, Jean-Philippe David et Laurence Després

Increase in larval gut proteolytic activities and *Bti* resistance in the dengue fever mosquito.

Archives of insect Biochemistry and Physiology Vol. 82, No. 2, 71–83 (2013)

Contribution : J'ai réalisé les expérimentations et partcipé à leur conception. J'ai analysé les résultats et participé à la rédaction de l'article.



INCREASE IN LARVAL GUT PROTEOLYTIC ACTIVITIES AND Bti RESISTANCE IN THE DENGUE FEVER MOSQUITO

Guillaume Tetreau, Renaud Stalinski, Jean-Philippe David, and Laurence Després Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grendele 1, Grendelecedex, France

The bioinsectioi de Badillus thuringiens is var. is radens is (Bti) is increasingly used worldwide for mosquito control. Although no established resistance to Bti has been described in the field so far, a resistant Aedes aegypti strain (LiTOX strain) was selected in the laboratory using field-collected leaf litter containing Bti toxins. This selected strain exhibits a moderate resistance level to Bti, but a high resistance level to individual Cry toxins. As Bti contains four different toxins, generalist resistance mechanisms affecting mosquito tolerance to different toxins were expected in the resistant strain. In the present work, we show that the resistant strain exhibits an increase of various gut proteolytic activities induding trypsins, leucinearminopeptidases, and carboxypeptidase A activities. These devated proteolytic activities resulted in a faster activation of Cry4Aa protoxins while Cry4Ba or Cry11Aa were not affected. These results suggest that changes in proteolytic activities may contribute to Bti resistance in mosquitoes together with other mechanisms. C 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: *B. thuringiensis israelensis*; mosquito; gut extracts; proteolytic activities; resistance

Supporting Information is available in the online issue at wileyonlinelibrary.com.

Grant sponsor: French National Research Agency and French Rhône-Alpes region.

The authors declare that no conflict of interest exists.

Guillaume Tetreau and Renaud Stalinski contributed equally to this work.

Correspondence to: Guillaume Tetreau, Laboratoire d'Ecologie Alpine—Université de Grenoble 1, 2233 rue de la Piscine, 8400 Saint-Martin d'Hères, France. E-mail: guillaume.tetreau@gmail.com

ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, Vol. 82, No. 2, 71-83 (2013)

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

C 2012 Wiley Periodicals, Inc. DOI: 10.1002/arch.21076

72 Archives of Insect Biochemistry and Physiology, February 2013

INTRODUCTION

Mosquitoes are vectors of severe human diseases such as dengue, yellow fever, malaria, or chikungunya. Mosquito control is a key component for preventing and controlling these diseases (Tomori, 2004; Kyle and Harris, 2008). Used for decades because of their high efficiency and low cost, chemical insecticides are being less used because of their low specificity and resistance spreading at a high rate worldwide (Tantely et al., 2010; Marcombe et al., 2011). In this context, the bioinsecticide *Baaillus thuringiensis* var. *israe lensis* (*Bti*) represents an efficient and safe alternative to chemical insecticides because of its low persistence in the environment, its high specificity to dipterans and the absence of strong resistance levels reported in the field (Lacey, 2007; Bravo et al., 2011). During sporulation, the bacterium *Bti* produces a crystal highly toxic for mosquito larvae. This composite crystal is made 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 and insert into the gut membrane leading to the death of mosquito larvae (Vachon et al., 2012).

Recently, several studies showed that *Bti* used for mosquito control can persist and even proliferate in the environment under specific conditions (de Melo-Santoset al., 2009; Shaheen et al., 2010). In the French Rhône-Alpes region, decaying leaf litters were shown to exhibit a high mosquitocidal activity due to persistent *Bti* toxins several months after treatment (Tilquin et al., 2008; Tetreau et al., 2012a). The selection of an *Aedes aegypti* 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 individual Cry toxins (69-fold, 9-fold and 9-fold for Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa toxins, respectively) (Tetreau et al., 2012b).

Resistance mechanisms developed by lepidopteran and coleopteran larvae exposed to other *Badillus thuringiensis* (*Bt*) subspecies are well characterized (Jurat-Fuentes and Adang, 2006; Heckel et al., 2007). In these insects, larvae are usually exposed to only one Cry toxin and high resistance levels can be reached (over 1000-fold) by the selection of particular mutations in various membrane receptors such as cadherins, alkaline phosphatases, or *N*-aminopeptidases (Griffitts and Aroian, 2005; Zhao et al., 2010; Jurat-Fuentes et al., 2011). As these resistance mechanisms are often specific to one *Bt* toxin, multiple mutations in different genes would be necessary to reach similar levels of resistance to all *Bti* toxins in mosquitoes. Considering the moderate resistance level of the LiTOX strain to the whole *Bti* toxins mixture, generalist resistance mechanisms acting on multiple toxins such as changes in protoxins activation or toxin degradation could be expected.

Activation of protoxinsto active toxinsisa key step in the mode of action of Crytoxins (Bravo et al., 2007). Indeed, changes in proteolytic activities were involved in several cases of resistance (Oppert et al., 1997). Three main resistance mechanisms involving proteases were described so far: (1) lower protease expression levels and/ or activity slowing down protoxins activation (Oppert et al., 1994, 1996; Huang et al., 1999; Li et al., 2004; Karumbaiah et al., 2007); (2) incorrect activation of protoxins leading to a lower toxicity (Rajagopal et al., 2009), and (3) overproduction of particular proteases leading to a higher degradation of activated toxins (Forcada et al., 1996). To investigate the potential role of proteoses in the resistance of the LiTOX strain to *Bti* toxins, we measured the total gut proteolytic activity. Activities of trypsins and chymotrypsins were also compared between the susceptible and resistant strains as they were previously involved in several

Annexe 2

Proteolytic Activity and Bti Resistance in Mosquitoes ^r 73

cases of resistance to Cry toxins in Lepidoptera (Oppert et al., 1994, 1996, 1997; Candas et al., 2003; Karumbaiah et al., 2007). The activity of leucine aminopeptidases were also compared as a previous genomic approach associated one member of this enzyme family to the resistance in the LiTOX strain (Bonin et al., 2009). As previous work suggested the involvement of metallo-proteases in the resistance of the LiTOX strain (Tetreau et al., 2012b), activities of carboxypeptidases A and B were also investigated. Finally, total enzyme content of gut extracts were compared between the susceptible and LiTOX strainsby performing zymograms. Altogether, our results reveal that changes in proteolytic activities in the LiTOX strain have an impact on Cry4Aa processing while other toxins are not affected, suggesting that other mechanisms are contributing to the resistance phenotype in this strain.

MATERIAL AND METHODS

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% larval mortality 48 h after 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 in standardized conditions as described in (Paris et al., 2011).

Preparation of Gut Extracts

For each strain, three biological replicates of midgut soluble protein extracts were prepared. For each biological replicate, 20 early 4th-instar larvae were chilled in ice. Midguts were carefully dissected, submerged in 50- \Box L distilled water, homogenized using a vortex for 30 sec and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C (Tetreau et al., 2012b). Supernatants from larvae of the same biological replicate were pooled. Protein concentration was quantified by Bradford assay with BSA as standard (Bradford, 1976) and aliquots were conserved at \Box 20°C until use.

Total Protease Activity

Total protease activities of gut extracts were compared between the susceptible and resistant strains at various pH ranging from 4 to 13 using azocasein (Sigma Aldrich) as substrate as described in (Hosseininaveh et al., 2007). A universal buffer consisting in 40 mM acetic acid, 40 mM phosphoric acid, and 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 (N = 3). All statistical analyses were performed with R 2.8.1 software (R Development Core Team, 2007).

74 Archives of Insect Biochemistry and Physiology, February 2013

Specific Protease Activities

Trypsin, chymotrypsin, and leucine aminopeptidase activities were measured at pH ranging from 4 to 12 using, respectively, BApNA (N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide; Sigma Aldrich), SAAPFpNA (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 \Box of universal buffer at the desired pH, 30 \Box of gut extract (containing 10 \Box of total proteins) and 20 \Box of the substrate at a final concentration of 10 mM. Reaction mixtures were incubated at 30° C and absorbance was measured every 5 sec during 10 min at 400 nm (for BApNA, SAAPFpNA, and leucine p-nitroanilide) or 330 nm (for FAPP and FAAK). Proteolytic activities were expressed in nmol of product per minute per mg of total protein (nanokatal, nkat). For each substrate and each pH, statistical difference between the two strains was tested by a Wilcoxon test as described above.

Comparative Analysis of Cry Protoxins Processing by Gut Enzymes

Production of individual Bti Cry toxins Each Bti Cry toxin was produced separately using a crystal negative strain of Bacillus thuringiensis var. isradensis (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 \Box g.mL¹). After 7 days at 30°C, spores and crystals were recovered using cell scrapers (BD Falcon) and purified as previously described (Tetreau et al., 2012b). Crystals were solubilized using an alkaline buffer (pH 10.8) containing Na₂CO₃ (50 mM) and DTT (10 mM) and were incubated at 60°C for 1 h. 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 Bradford assay with BSA as standard (Bradford, 1976).

Comparative analysis of Cry protoxins processing without inhibitors To determine whether the differences in proteolytic activities observed between susceptible and resistant strains affect the activation kinetics of *Bti* Cry toxins, the proportions of activated toxins were measured at different digestion time. Reaction mixtures consisted in 14 \Box L of Cry protoxins with 2 \Box L of gut extracts (0.5 \Box g of total proteins) incubated at 37° C during 1, 3, 5, 10, 30, 60, and 180 min. Reactions were stopped by adding 2 \Box L 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 1 mg/ mL of bovine trypsin (Sigma Aldrich) at 37°C for 3 h. All assays were comigrated on SDS-PAGE and revealed by compassie 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.1.410 (Girish and Vijayalakshmi, 2004). For each digestion time, percentage of total activation was calculated by dividing the intensity of the activated band

Annexe 2

Proteolytic Activity and Bti Resistance in Mosquitoes ⁷75

(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 as described above.

Comparative analysis of Cry protoxins processing with inhibitors As Cry4Aa showed altered activation kinetics between the two strains, we further determined the role of different protease families by using specific inhibitors. Cry4Aa assays were performed as described in Comparative analysis of Cry protoxins processing with inhibitors with 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 g of total proteins) were treated 15 min at room temperature with inhibitors before assays. For processing with EDTA, analysis was performed as described in Section 2.5.2. For processing with PMSF, as this serine protease inhibitor induced a strong decreased activation of Cry4Aa protoxins to toxins, the 49 KDa activated band of Cry4Aa was detectable only after 180 min of digestion; so comparative analysis of Cry4Aa processing by gut enzymesin presence of PMSF was only performed at 180 min of digestion. Difference in the percentage of activated toxin between the two strains after 180 min of digestion with PMSF was tested by a Wilcoxon test as described above.

Comparative Zymograms

Zymograms were performed for comparing gut proteases between the two strains and characterizing 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 \Box g total proteins) were treated for 15 min at room temperature with inhibitors prior assays. All assays were co-run on native SDS-PAGE for 6 h 30 at 90 V at 4°C to preserve the 3D-structure of enzymes and their activity. 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 1 h 30, the gel was stained with coomassie blue and band intensities were estimated using Imagej software v.1.410 (Girish and Vijayalakshmi, 2004).

RESULTS

Protease Activities of Gut Extracts

Total gut azocaseinolytic activities were significantly increased by 16 to 43% for 6 of the 10 pH values tested in the LiTOX strain compared to the susceptible strain (Fig. 1). Gut extract trypsin activities were significantly increased (+23% across pH 7–12) for alkaline pH values (Fig. 2A). Chymotrypsin activities were moderately but significantly increased in the LiTOX strain (+12%) for pH values 6, 8, and 12 (Fig. 2B). Leucine aminopeptidase activities were significantly increased in the LiTOX strain (+34%) for pH values from 4 to 12 (Fig. 2C). The high increase observed at pH 4 is due to very low activities. Carboxypeptidases A activity was significantly increased (+28%) in the LiTOX strain at pH 8 (Fig. 2D) while carboxypeptidases B activity showed a global increase at alkaline pH values (mean + 42%) (Fig. 2E).

Annexe 2



76 ^f Archives of Insect Biochemistry and Physiology, February 2013

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 (gray square) strains are indicated. Values are indicated as mean OD ± standard error from three biological replicates per pH., NS: nonsignificant 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 (gray 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, nonsignificant differences; *, *P* value < 0.05 (Wilcoxon test).

Proteolytic Activity and Bti Resistance in Mosquitoes 77

Kinetics of Cry Toxins Activation by Gut Extracts

Cry4Ba and Cry11Aa protoxins were not differentially activated by gut extracts from the LiTOX or from the susceptible strain (Fig. 3A and 3B), while the proportion of activated Cry4Aa toxins was significantly higher in the LiTOX strain after 5, 30, and 60 min of digestion, with a maximum of 15% increased activation after 60 min (Fig. 3C). When EDTA was added, the proportion of activated Cry4Aa toxins was still significantly higher in the LiTOX strain but with a maximum of 8% increase after 60 min (Fig. 3D). After 180 min of digestion with PMSF, Cry4Aa was better activated (+ 17%) by gut enzymes from the LiTOX strain compared to the susceptible strain (Fig. 3E).

Comparative Zymograms of Gut Extracts

Electrophoretic zymograms allowed the separation of six different protein bands with caseinolytic activities in the gut extracts of both LiTOX and susceptible strains (E1–E6, Fig. 4). E1 and E2 bandswere partially inhibited by PMSF (about 50 and 80%, respectively) indicating that these bands are composed of at least two enzymes families and only partly of serine proteases (Fig. 4). E3 was inhibited by both PMSF and TPCK, indicating that this band is composed of trypsin-like serine proteases (Fig. 4). None of the inhibitors tested affected E4 band, indicating that this band is neither composed of serine proteases (Fig. 4). E5 band was fully inhibited by PMSF indicating that it is composed of serine proteases (Fig. 4). Inhibition rates obtained with other inhibitors were too variable to conclude on the nature of enzymes (Supporting Information, Fig. S1 and Fig. S2). E6 band was always represented in the susceptible strain, whatever the inhibitor used, but when EDTA was added, activity was decreased by about 20% (Fig. 4). By contrast, E6 was fully inhibited by EDTA in the LiTOX strain, suggesting that E6 is exclusively constituted of EDTA-inhibited metallo-proteases in the LiTOX strain but may include other enzymes in the susceptible strain.

DISCUSSION

Because Bti is a combination of several toxins acting in synergy, resistance of mosquito larvae is likely to result from generalist mechanisms such as those affecting protoxins activation. Protoxins activation can be slowed down by decreased protease activity (Li et al., 2004, Karumbaiah et al., 2007). Indeed, one of the four Bt-resistant strains of Ostrinia nubilalis tested showed 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 (CXC and YHD2-B) 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 carboxypeptidaes B (42%). This increased proteolytic activity had a specific effect on the processing of Cry4Aa protoxins. Cry4Aa protoxins were faster activated by gut extracts from the LiTOX than by extracts from the susceptible strain, even in the presence of inhibitors. Such difference between the two strains was reduced by EDTA and PMSF. These results suggest that proteases noninhibited by EDTA (i.e. mainly serine proteases) are only partly responsible for the better processing of Cry4Aa and that proteases noninhibited by

Annexe 2



78 ^f Archives of Insect Biochemistry and Physiology, February 2013



Proteolytic Activity and Bti Resistance in Mosquitoes 79



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 zymogram of this gut extract without inhibitor (1) or with PMSF (11), TLCK (III), TPCK (IV), or EDTA (V) is shown. 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 (Fig. S1 and S2). 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.

PMSF (i.e. notably metallo-proteases) are mainly involved. Increased serine-proteases and metallo-proteases activities seem to have a direct impact on Cry4Aa processing but not on Cry4Ba and Cry11Aa. This indicates that protease activity modifications in the LiTOX strain specifically affect the processing of Cry4Aa, the toxin for which the LiTOX strain exhibits the highest level of resistance (69-fold, (Tetreau et al., 2012b)).

It has already been demonstrated that the precision of the protoxin cleavage is essential for the insecticidal activity of Cry toxins, as the noncleavage 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). The faster processing of Cry4Aa observed in the LiTOX strain may be the consequence of a faster degradation rather than a faster activation, given that gel resolution did not allow detecting slight modifications of Cry4Aa toxin size between the two strains. It has also been demonstrated that trypsin-activated toxins can differ from toxins activated with midgut juices because of structural modifications leading to altered toxicity for the larvae (Haider et al., 1986; Knowles et al., 1986; Lightwood et al., 2000).

Zymograms showed that gut extracts contained at least six different protease families. Only the E6 band differed between the two strains. Our results suggest that at least two different protease types constitute this band in the susceptible strain while only one major protease type was present in the LiTOX strain. Further characterization of these proteases is needed to know if the loss of one particular protease enzyme/ isoform in the LiTOX strain is partly responsible for resistance to Cry4Aa.

In a previous study, four genes encoding metallo-proteases were found undertranscribed in midguts of LiTOX larvae compared with susceptible larvae (Tetreau et al., 2012b). In the present article, a global increase of all proteolytic activities, including metallo-proteases, was observed in the LiTOX strain. These discrepancies can be due to the inability of EDTA to inhibit some metallo-proteases families, such as

80 ^r Archives of Insect Biochemistry and Physiology, February 2013

leucine-aminopeptidases (Matsui et al., 2006; Song et al., 2008) and carboxypeptidases (Igic et al., 2003; Alonso-del-Rivero et al., 2009). Moreover, activities of other metalloproteases, such as 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., 2012b).

In this work, we focused on the role of proteases in the constitutive resistance of the LiTOX strain. However, resistance to *Bti* toxins may also be inducible (LiTOX larvae may differentially express gut enzymes only when exposed to *Bti*). Such mechanism was evidenced in various *Bt*-resistant insects. For example, in *Spodoptera frugiperda* larvae, 24 h 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). Same experiments have to be performed on larvae exposed to sublethal doses of *Bti* and of individual Cry toxins to highlight such inducible mechanism of resistance.

The LiTOX strain was selected using field-persistent *Bti* in mixture with leaf litter. The presence of dietary plant particles is known to strongly modulate proteases activities, notably due to the presence of plant protease inhibitors (Erlandson et al., 2010; Hivrale et al., 2011). Indeed, LiTOX larvae were probably exposed to various plant compounds such as tannins, which are known to inhibit protease activities (Xu and Qin, 1994). To conserve their digestive capabilities, it can be hypothesized that an increase of protease activities was selected in resistant larvae (Brioschi et al., 2007).

Cry4Aa was the only *Bti* protoxin affected by increased proteases activities. Therefore, this work provides evidence that resistance by proteases modifications could be a toxin-specific mechanism contrary to the commonly admitted hypothesis of a generalist mechanism acting on a large panel of toxins. AsCry4Ba and Cry11Aa protoxinsprocessing are not affected by these protease changes, the LiTOX strain appears to have developed various complementary resistance mechanisms to deal with multiple *Bti* toxins (Bonin et al., 2009; Paris and Despres, 2012; Tetreau et al., 2012b).

CONCLUSION

The LiTOX strain shows a moderate resistance to whole *Bti* mixture but a high resistance to Cry4Aa. Only the activation of Cry4Aa protoxins was affected by increased proteolytic activities. One metallo-protease noninhibited by EDTA appears to be lacking in the LiTOX strain. Further characterization of this metallo-protease is needed to confirm its role in resistance. Our results suggest that multiple distinct resistance mechanisms are acting together in this resistant strain and that protease may not play a major role in the resistance phenotype. Altogether, these findings open the way for deciphering resistance mechanisms that could be developed by mosquito larvae in the field.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank B. Federici for providing recombinant *Bt* strains and V. Hosseininaveh for his constructive advice and comments. 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. Renaud Stalinski was supported by the French Rhône-Alpes region.

LITERATURE CITED

- Alonso-del-Rivero M, Trejo SA, Rodriguez de la Vega M, Gonzalez Y, Bronsoms S, Canals F, Delfin J, Diaz J, Aviles FX, Chavez MA. 2009. A novel metallocarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabelastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases. Febs J 276:4875–4890.
- Bonin A, Paris M, Tetreau G, David JP, 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.
- 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, Gill SS, Soberon M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49:423–435.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberon M. 2011. Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem Mol Biol 41:423–431.
- Brioschi D, Nadalini LD, Bengtson MH, Sogayar MC, Moura DS, Silva-Filho MC. 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. Insect Biochem Mol Biol 37:1283–1290.
- Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LA. 2003. Insect resistance to *Badillusthuringiensis* alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. Mol Cell Proteomics 2:19–28.
- de Melo-Santos MAV, de Araujo AP, Rios EMM, Regis L. 2009. Long lasting persistence of *Badillus thuringiensis* serovar. *isradensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. Biol Control 49:186–191.
- Elpidina EN, Vinokurov KS, Gromenko VA, Rudenskaya YA, Dunaevsky YE, Zhuzhikov DP. 2001. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. Arch Insect Biochem Physiol 48:206–216.
- Erlandson MA, Hegedus DD, 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. Arch Insect Biochem Physiol 75:70–91.
- Forcada C, Alcacer E, Garcera MD, Martinez R. 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heiothisvirecenss*trains, one susceptible and one resistant to *Badllusthuringiens* stoxins. Arch Insect Biochem Physiol 31:257–272.
- Forcada C, Alcacer E, Garcera MD, Tato A, Martinez R. 1999. Resistance to *Badillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens* proteolytic and SEM study of the larval midgut. Arch Insect Biochem Physiol 42:51–63.
- Girish V, Vijayalakshmi A. 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. Indian J Cancer 41:47.
- Griffitts JS, Aroian RV. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. Bioessays 27:614–624.
- Haider MZ, Knowles BH, Ellar DJ. 1986. Specificity of *Badilus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. Eur J Biochem 156:531–540.
- Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, Gould F, Tabashnik BE. 2007. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. J Invertebr Pathol 95:192– 197.

82 Archives of Insect Biochemistry and Physiology, February 2013

- Hivrale VK, Lomate PR, Kalve ND, Kachole MS. 2011. Periplaneta americana midgut proteases differentially expressed against dietary components from different plant seeds. Physiol Entomol 36:180–186.
- Hosseininaveh V, Bandani A, Azmayeshfard P, Hosseinkhani S, Kazzazi M. 2007. Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae:Coleoptera). J Stored Products Res 43:515–522.
- Huang FN, Zhu KY, Buschman LL, Higgins RA, Oppert B. 1999. Comparison of midgut proteinases in *Badilus thuringiensis* susceptible and -resistant European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). Pesticide Biochem Physiol 65:132–139.
- Igic R, Garber S, Sekosan M, Urbanska RA, Behnia R. 2003. Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney. Peptides 24:1237–1240.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heiothis virescens* larvae. JInvertebr Pathol 92:166–171.
- Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning CM, Liu CX, Wu KM, 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 crytoxins from *Badillusthuringiens* is PLoSONE 6:e17606.
- Karumbaiah L, Oppert B, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2007. Analysis of midgut proteinases from *Badillusthuringiensis*susceptible and -resistant *Heidthisvirescens*(Lepidoptera:Noctuidae). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 146:139–146.
- Knowles BH, Francis PH, Ellar DJ. 1986. Structurally related *Bacillusthuringiensis* delta-endotoxins display major differences in insecticidal activity in vivo and in vitro. J Cell Sci 84:221–236.
- Kyle JL, Harris E. 2008. Global spread and persistence of dengue. Ann Rev Microbiol 62:71–92.
- Lacey LA. 2007. Badillus thuringiensis serovariety isradensis and Badillus sphaericus for mosquito control. JAm Mosq Control Assoc 23:133–163.
- Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Zhu KY, Buschman LL. 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Badillus thuringiensis* resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepi-doptera:Crambidae). Insect Biochem Mol Biol 34:753–762.
- Lightwood DJ, Ellar DJ, Jarrett P. 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Badillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. Appl Environ Microbiol 66:5174–5181.
- Marcombe S, Darriet F, Tolosa M, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, Yebakima A, Chandre F, Corbel V. 2011. Resistance of *Aedes aegypti* to insecticides in Martinique and implications for dengue vector control. Trop Med Int Health 16:284–284.
- Matsui M, Fowler JH, Walling LL. 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. Biol Chem 387:1535–1544.
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Badillus thuringiens* stoxins. J Biol Chem 272:23473–23476.
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson D, Upton SJ, McGaughey WH. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctela* and the hydrolysis of *Bacillusthuringiensis* CrylA(c) protoxin. Insect Biochem Mol Biol 26:571–583.
- Oppert B, Kramer KJ, Johnson DE, Macintosh SC, McGaughey WH. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillusthuringiensis* resistant strain of *Plcdia-interpunctela*. Biochem Biophys Res Commun 198:940–947.
- Paris M, Despres L. 2012. Identifying insecticide resistance genes in mosquito by combining AFLP genome scans and 454 pyrosequencing. Mol Ecol 21:1672–1686.
- ParisM, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, DespresL, David J.P. 2011. Persistence of *Badillusthuringiensis isradensis*(*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. Pest Manag Sci 67:122–128.

- R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing. http://www.R-project.org.
- Rajagopal R, Arora N, Sivakumar S, Rao NGV, Nimbalkar SA, Bhatnagar RK. 2009. Resistance of *Heicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillusthuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. Biochem J419:309–316.
- Rodriguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Borras-Hidalgo O, Wright DJ, Ayra-Pardo C. 2010. RNAimediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiens* s Cry1Ca1 protoxin. Environ Microbiol 12:2894–2903.
- Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M. 2010. Persistence strategies of *Badilus œreus* spores isolated from dairy silo tanks. Food Microbiol 27:347–355.
- Song SM, Park JH, Kim J, Kim SI, Hong YC, Kong HH, Chung DI. 2008. Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. Parasitol Int 57:334–341.
- Tantely ML, Tortosa P, Abut H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, Dehecq JS, Makoundou P, Labbe P, Pasteur N, Weill M. 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. Insect Biochem Mol Biol 40:317–324.
- Tetreau G, Alessi M, Veyrenc S, Périgon S, David JP, Reynaud S, Després L. 2012a. Fate of *Badillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. Appl Environ Microbiol 78:8362–8367.
- Tetreau G, Bayyareddy K, Jones CM, Stalinski R, Riaz MA, Paris M, David JP, Adang MJ, Despres L. 2012b. Larval Midgut Modifications Associated with *Bti* Resistance in the Yellow Fever Mosquito using Proteomic and Transcriptomic Approaches. BMC Genomics 13:248.
- Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P, Geremia RA, Gury J. 2008. Long lasting persistence of *Badilus thuringiensis* subsp. *isradensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. PLoS ONE 3:e3432.
- Tomori O. 2004. Yellow fever: the recurring plague. Crit Rev Clin Lab Sci 41:391-427.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz JL. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillusthuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. JInvertebr Pathol 111:1–12.
- Xu G, Qin JD. 1994. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heiothisarmigera* and *H-assulta* (lepidoptera, noctuidae) and their inhibition bytannic-acid. JEconomic Entomol 87:334–338.
- Zhao J, Jin L, Yang YH, Wu YD. 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Badillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Heicoverpa armigera*. Insect Biochem Mol Biol 40:113–118.

III. Annexe 3

Guillaume Tetreau, <u>Renaud Stalinski</u>, Dylann Kersusan, Sylvie Veyrenc, Jean-Philippe David, Stéphane Reynaud et Laurence Després

Decreased Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquito Larvae after Contact with Leaf Litter

Applied and Environmental Microbiology Volume 78 Number 15 p. 5189–5195 (2012)

Contribution : J'ai participé à la conception du plan expérimental et à la rédaction de l'article.



Decreased Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquito Larvae after Contact with Leaf Litter

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* 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.

"he 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 "receptor" 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 (10, 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 mosquitos' 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 18 May 2012 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

Tetreau et al.

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 (9, 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.1.410 (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 Na₂CO₃ (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 tresuspended 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 $[ITU] \cdot mg^{-1}$) 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 (H₂SO₄) 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.1.410 (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 Cvt1Aa (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 Crv11Aa were chosen in order to obtain about 70% larval mortality after 24 h (5.20, 3.13, and 0.97 g/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-powderformulated VectoBac WG strain (319 ng of formulated product per ml) and the liquid-formulated VectoBac 12AS strain (6.4 10 4 1/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

Annexe 3



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 (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° 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 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).

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^a

	Proportion (%) of each toxin:									
B. thuringiensis subsp. israelensis	Among all toxins		Among Cry toxins							
state and test	Cry4Aa and Cry4Ba	Cry11Aa	Cyt1 Aa	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					

^a 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.



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 laboratoryproduced 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.

5192 aem.asm.org

Applied and Environmental Microbiology

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. S2 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 degradation (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, al-though 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 Cvt 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)

aem.asm.org 5193

Tetreau et al.

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 mosquitocidal 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 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.

REFERENCES

- 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 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, Likitvivatanavong 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.
- 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.
- 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.
- Federici BA. 2010. Recombinant bacterial larvicides for control of important mosquito vectors of disease, p 163–176. *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.
- 16. 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 mattermicroorganism 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.
- Hajaij 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.
- 22. 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). Jpn. 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.
- 25. Loke SR, Andy-Tan WA, Benjamin S, Lee HL, Sofian-Azirun M. 2010.

5194 aem.asm.org

Applied and Environmental Microbiology

451

Lower toxicity of B. thuringiensis subsp. israelensis

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 Crv1Ab 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
- Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-36 Salonen M. 2010. Persistence strategies of Bacillus cereus spores isolated from dairy silo tanks. Food Microbiol. 27:347-355.
- Stotzky G. 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecti-37 cidal 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*

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-

subsp. israelensis (Bti) in mosquito natural habitats. PLoS One 3:e3432.

- 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.
- WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito lar-41. vicides. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Wirth MC, Delecluse A, Walton WE. 2004. Laboratory selection for 42 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
- Wirth MC, Georghiou GP. 1997. Cross-resistance among CryIV toxins of 44 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
- 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

aem.asm.org 5195

IV. Annexe 4

Guillaume Tetreau, Alexia Chandor-Proust, Frédéric Faucon, <u>Renaud Stalinski</u>, Idir Akhouayri, Sophie M. Prud'homme, Muriel Raveton et Stéphane Reynaud

Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A

Aquatic Toxicology 140– 141 (2013) 389– 397

Contribution : Ce travail est le résultat d'un projet d'équipe, j'ai participé à la conception et la réalisation des expérimentations ainsi qu'à la rédaction de l'article.
Aquatic Toxicology 140-141 (2013) 389-397



Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A



Guillaume Tetreau^{[],1}, Alexia Chandor-Proust¹, Frédéric Faucon¹, Renaud Stalinski¹, Idir Akhouayri¹, Sophie M. Prud'homme¹, Muriel Raveton, Stéphane Reynaud

Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grenoble 1, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

article info

abstract

Article history: Received 7 May 2013 Received in revised form 27 June 2013 Accepted 8 July 2013

Keywords: Ultraviolet Aedes aegypti Bioassays Enzymatic activities Candidate gene expression RT-qPCR Mosquitoes are vectors of major human diseases, such as malaria, dengue or yellow fever. Because no efficient treatments or vaccines are available for most of these diseases, control measures rely mainly on reducing mosquito populations by the use of insecticides. Numerous biotic and abiotic factors are known to modulate the efficacy of insecticides used in mosquito control. Mosquito breeding sites vary from opened to high vegetation covered areas leading to a large ultraviolet gradient exposure. This ecological feature may affect the general physiology of the insect, including the resistance status against insecticides. In the context of their contrasted breeding sites, we assessed the impact of low-energetic ultraviolet exposure on mosquito sensitivity to biological and chemical insecticides.

We show that several mosquito detoxification enzyme activities (cytochrome P450, glutathione Stransferases, esterases) were increased upon low-energy UV-A exposure. Additionally, five specific genes encoding detoxification enzymes (CYP6B2, CYP6Z7, CYP6Z8, GSTD4, and GSTE2) previously shown to be involved in resistance to chemical insecticides were found over-transcribed in UV-A exposed mosquitoes, revealed by RT-qPCR experiments. More importantly, toxicological bioassays revealed that UV-exposed mosquitoes were more tolerant to four main chemical insecticide classes (DDT, imidacloprid, permethrin, temephos), whereas the bioinsecticide Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) appeared more toxic. The present article provides the first experimental evidence of the capacity of low-energy UV-A

increase mosquito tolerance to major chemical insecticides. This is also the first time that a metabolic resistance to chemical insecticides is linked to a higher susceptibility to a bioinsecticide. These results support the use of Bti as an efficient alternative to chemical insecticides when a metabolic resistance to chemicals has been developed by mosquitoes.

2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mosquitoes are considered as the most dangerous animals worldwide due to their capacity to transmit major human diseases, such as malaria, dengue or yellow fever (Gubler, 1998; Ross, 1901; Tomori, 2004). They represent a heavy sanitary and economic burden, especially in highly-impacted developing countries. Because of the lack of cost-effective and long-lasting drug treatments or

vaccines for most mosquito-borne diseases, control measures historically and currently target vector populations through the use of highly efficient chemical insecticides (Hemingway et al., 2006; Killeen et al., 2002). Nevertheless, chemical usage has detrimental side effects, such as high environmental persistence and low mosquito specificity by their toxicity to non-target insect species (Diabate et al., 2002). Moreover, mosquito populations show full resistance to all chemical insecticide classes used in vector control. threatening the long-term efficacy of chemical-based control interventions (Enayati and Hemingway, 2010; Hemingway and Ranson, 2000). The increasing awareness for the need of a more integrated strategy to control mosquito populations has led to the development of alternative strategies, including the use of genetically engineered mosquitoes (de Valdez et al., 2011; Scott et al., 2002) or entomopathogenic microorganisms, such as the insect reproductive parasite Wolbachia (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011), toxic fungal species (Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2005), resident mosquito microbial symbionts (Cirimotich et al., 2011) or the bioinsecticide Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) (Goldberg

[□] Corresponding author. Present address: Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA. Tel.: +1 315 787 2476; fax: +1 315 787 2326.

E-mail addresses: guillaume.tetreau@gmail.com (G. Tetreau), alexia.chandor@gmail.com (A. Chandor-Proust), frederic.faucon4@orange.fr (F. Faucon), renaud.stalinski@gmail.com (R. Stalinski), ig.akhouayri@yahoo.com (I. Akhouayri), prudhomme.sophie@gmail.com (S.M. Prud'homme),

muriel.raveton@ujf-grenoble.fr (M. Raveton), stephane.reynaud@ujf-grenoble.fr (S. Reynaud).

¹ Equal contributions

 $⁰¹⁶⁶⁻⁴⁴⁵X/\$-see \ front\ matter\ \square\ 2013\ Elsevier\ B.V.\ All\ rights\ reserved.$ http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.004

G. TGt fleatr ea un e t/aA q'uAtijeraTiex Tooskiegyl d g40+44+1(4D (3) B3)93893897397

and Margalit, 1977). Technical drawbacks and high costs combined with lower efficacy compared to chemicals have strongly delayed the widespread use of bioinsecticides as a long-term alternative to chemicals. Biological insecticides intrinsically target distinct aspects of the mosquito physiology when compared to chemical insecticides; for instance, chemicals used in current control programs are neurotropic agents blocking synaptic transmission in the insect central nervous system (Soderlund, 2008), whereas Bti, the major bioinsecticide used worldwide, directly disrupts the intestinal gut (Vachon et al., 2012). Therefore, Bti may represent a promising alternative to chemicals by sustaining its toxicity toward mosquito populations highly resistant to chemicals. Although this hypothesis has been largely accepted and relayed by the scientific community (Bravo et al., 2011: Lacev et al., 2001: Roh et al., 2007; Schnepf et al., 1998), to our knowledge it has never been experimentally validated.

Numerous biotic and abiotic factors were shown to affect the efficacy of insecticides on mosquito populations, such as temperature (Christiansen et al., 2004; Sibanda et al., 2011), water pH (Mittal et al., 1995), altered nycthemeral rhythm (Yang et al., 2010), presence of organic matter (Tetreau et al., 2012b) or water pollution (Poupardin et al., 2008; Riaz et al., 2009). A large part of the mosquito life cycle consists of four aquatic larval stages, which live in highly contrasted natural or man-made breeding sites, such as agricultural fields or highly urbanized sites. Suitable mosquito breeding sites could vary widely in term of light exposure from large opened areas with maximal exposure to shaded water pools with high vegetation coverage in forestry settings. Major disease vectors, such as the malaria vector Anopheles gambiae, the dengue vector tiger mosquito Aedes albopictus, the yellow fever mosquito Aedes aegypti or Culex quinquefasciatus transmitting West Nile virus and filarial worms, show distinct preferences in their breeding sites; An. gambiae breeding sites are often described as clean shallow water pounds, whereas Aedes and Culex mosquitoes are more opportunistic, underlying the invasive features of the tiger mosquito for instance through European mainland (Benedict et al., 2007). With such contrasted breeding sites, mosquito larvae can be exposed to an important UV gradient, from woodland ponds and sewers, to large open areas of stagnant water or uncovered containers. To date, there is no report on the effect of UV light on the insecticide susceptibility of mosquitoes, despite a huge literature on the impact of UV on insect oxidative stress responses, general physiology and populations (Ballare et al., 2001; Ingram, 1992; Mazza et al., 2002; Wang et al., 2001). Using the yellow fever mosquito vector Ae aegypti as a versatile model species for breeding site type, the present article reports an opposite effect of low-energy UV-A light on the mosquito susceptibility to five major chemical insecticide classes (namely the organochlorine DDT, the organophosphate temephos, the pyrethroid permethrin, the carbamate propoxur and the neonicotinoid imidacloprid) and to the bioinsecticide Bti. This contrasting pattern of tolerance was linked to an increase of all detoxification enzyme activities and a mRNA over-expression of several candidate genes previously associated with insecticide resistance. All the results are discussed with regard to mosquito control strategies and resistance management.

2. Methods

2.1. Mosquito strain and experimental design

A laboratory Ae aegypti strain Bora-Bora susceptible to all insecticides has been used. After egg hatching, larvae were reared in tap water and fed with standardized amount of larval food (hay pellets) at a temperature of 27 °C with 80% of relative humidity and a 15/9 h light/dark period. Three different conditions of UV exposure were performed; larvae were not exposed to UV ("UV 0") or exposed 2 h ("UV 2") or 15 h ("UV 15") every day during 4 days (from egg hatching to 3rd instar larval stage) to UV-A (= 365 nm) at 70 W/m² (Vilbert-Lourmat 115.L 15 W lamp), which represents a very low UV-index of 1.14 (calculated according to the standardized ISO/CIE procedure; correction factor for 365 nm: 0.000407). In our settings, a 2 h daily exposure may represent a daily noon maximal exposure in an otherwise shaded breeding site, whereas 15 h daily exposure represents open areas with long-lasting exposure with no coverage on the mosquito breeding site.

2.2. Effect of UV on cell and tissue mortality.

To monitor the effect of UV on mosquito cell mortality, living larvae from the three conditions were incubated for 3 h in a solution of 40 g ml^{\Box 1} of propidium iodure (PI). Thereafter larvae were put in water for 1 h. A positive control of cell mortality test was performed by incubating larvae with 70% ethanol for 5 min. Larvae were then observed using a stereo zoom microscope (SZX16, Olympus) under normal light ("Visible") and epifluorescence (excitation: 450–490 nm and emission \Box 520 nm ("PI") or both ("Merge").

2.3. Enzyme activities and ROS measurement

800 fresh larvae per condition (2 h-, 15 h-exposure and control) were homogenized by a glass-teflon homogenizer on ice (10 strokes) in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.5 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.8 mM PMSF. The homogenate was then centrifuged at $10,000 \square$ g for 20 min at 4 °C and the resulting supernatant was ultracentrifuged at $100,000 \square$ g for 1 h at 4 °C. The pellet (microsomal fraction) was resuspended into 500 L 0.05 M phosphate buffer and used for cytochrome P450 monooxygenases activities measurement. The supernatant (cytosolic fraction) was used for all other enzyme activity measurements. Three replicates were performed for each condition.

P450 activities were measured by using 7-ethoxyresorufin (EROD, Sigma) as substrate as described in Reynaud et al. (2002) with modifications for micro-plate measurements. The activity was assayed at 30 °C in a medium containing 20 g microsomal proteins, Glucose-6-Phosphate (G6P) (5 mM), NADPH (0.1 mM), G6P dehydrogenase (1 UmL $^{-1}$), 7-ethoxyresorufin (5 M), and phosphate buffer (50 mM Na₂ PO₄; pH 7.4) in a final volume of 200 L. Fluorescence (excitation 537 nm; emission 583 nm) was recorded every 30 s during 40 min in a Varioskan Flash Multimode Reader (multiplate reader; Thermo Scientific). Glutathione-Stransferase (GST) activities were measured by using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma) as substrate as described in Riaz et al. (2009) with slight modifications. The reaction mixture contained 20 g protein from the cytosolic fraction, 1.3 mM reduced glutathione (Sigma) and 1 mM CDNB in 0.1 M phosphate buffer; pH 6.9. The absorbance of the reaction solution at 340 nm was measured after 1 min. Esterase activities were measured by using -naphthyl acetate and -naphthyl acetate as substrates (Sigma) (Van Asperen, 1962) as described in (Poupardin et al., 2008). Catalases activities were measured spectrophotometrically at 240 nm during 60 s, using 200 L proteins from the cytosolic fraction in 1.6 mL buffer and 10 mM H2O2, as described in (Dubovskii et al., 2010). The activity of catalase (H_2O_2 decomposition) was expressed in mol min¹ using the extinction coefficient of 0.0394 m $M^{\Box 1}$ cm $^{\Box 1}$ for hydrogen peroxide.

The amount of reactive oxygen species (ROS) was measured by reduction of the redox dye nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma, France) as described in Reynaud et al. (2001) with modifications. Twenty larvae were added to 1 mL of a 1 mg $L^{\Box 1}$ NBT solution for 2 h in the dark at room temperature. Larvae were washed twice in ethanol, air dried and the formazan produced was then dissolved in 50 \Box L KOH (2 M) and 75 \Box L DM SO. The turquoise-blue colored solution was read at 630 nm.

The effect of UV-exposure on each enzyme activity was tested by a Wilcoxon test (N=3) performed on R 2.15.2 software (R Development Core Team, 2007).

2.4. mRNA expression of candidate genes by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

mRNA was extracted from 50 larvae from each condition in triplicate using RNAgueous²-4PCR kit (Ambion), treated with DNAse (Ambion) following manufacturer's instructions, and reverse transcribed using a SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase and oligo-dT20 primers (Invitrogen) as described in (Tetreau et al., 2012a). RT-qPCR was performed on an iQ5 system (Bio-Rad) using an iQ SYBR Green supermix (BioRad) following manufacturer's instructions. Twelve candidate genes, already implicated in resistance to chemical insecticides or in oxidative stress, were tested. Specific primers were designed for each gene using Beacon Designer v.5.10 software (Premier Biosoft International). The primer pair for HSP90 was designed in the highly conserved region between all the HSP90 genes described in the Ae. aegypti genome (AAEL011704, AAEL011708, AAEL014843 and AAEL014845). Specificity of each primer pair was first assessed by BLAST analysis against Ae. aegypti genome and then verified by performing a melt curve analysis. All the information relative to the primer used and the efficiency of the qPCR experiment are indicated in the Table 1, according to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). Genes encoding ribosomal proteins RPL8 and RPS7 (housekeeping genes) were used for normalization of mRNA expression of the studied genes taking into account PCR efficiency using CT method, calculated using the iQ5 software (Bio-Rad) (Pfaffl, 2001). Only genes showing more than 1.5-fold over-transcription were considered induced.

2.5. Bioassay

Bioassay experiment was performed under normal light on 4-days old larvae (third instar). Diagnostic concentrations were chosen in order to obtain about 50% of larval mortality in the control ("UV 0").78 $\$ g mL¹,500 $\$ gL¹,300 $\$ gL¹,2.5 $\$ gL¹,500 $\$ gL¹ and 6 $\$ gL¹ were used for Bti, DDT, imidacloprid, permethrin, propoxur and temephos, respectively. Larval mortality was monitored after 24 h of exposure to the insecticide. Ten replicates were performed for each insecticide and each condition. The effect of UV-exposure on larval mortality was tested by a one-way analysis of variance (ANOVA) performed on R2.15.2 software (RDevelopment Core Team, 2007).

3. Results

3.1. Impact of UV-exposure on cell and tissue mortality

The exposure of Ae. aegypti larvae to low-energy UV-A for 2 or 15 h daily [from egg hatching to 3rd instar stage (4days)] did not trigger any noticeable cell mortality, regardless of the duration of the exposure (Fig. 1).

3.2. Larval enzyme activities are enhanced upon UV exposure

We studied the impact of UV exposure on well-known detoxification enzymes involved in insecticide metabolization, such as cytochrome P450, the glutathione-S-transferase (GST) and esterase activities. A significant increase (1.6–2.3-fold) of all detoxification enzyme activities was observed when larvae were exposed to UV, even after a daily 2 h UV-exposure ($p=2.7 \Box 10^{-2}$, $4.4 \Box 10^{-2}$, $8.5 \Box 10^{-3}$ and $7.3 \Box 10^{-3}$ for alpha-esterases, beta-esterases, GST and cytochrom e P450 activities, respectively (Fig. 2A–D). Oxidative stress response activities were also investigated; catalase activities were significantly increased (2.1-fold) in daily 15 h UV-exposed larvae ($p = 4.95 \Box 10^{\Box 2}$), but not after 2 h exposure (p = 0.20) (Fig. 2E). No change in the reactive oxygen species (ROS) production was observed regardless of the exposure condition (p = 0.67) (Fig. 2F).

3.3. UV exposure up-regulates mRNA expression of genes putatively involved in insecticide resistance

Enhanced detoxification activities through UV exposure prompted us to examine the transcription of genes previously found up-regulated in mosquito strains resistant to chemicals as well as several other genes involved in cellular stress response. The transcription of a subset of 12 genes was assessed by RT-qPCR in 2 and 15h UV-exposed larvae compared to nonexposed samples. Fifteen hours of daily UV-exposure induced 1.9, 1.9 and 1.6-fold over-expression of the cytochrome P450 encoding genes CYP6BB2 (AAEL014893), CYP6Z7 (AAEL009130) and CYP6Z8 (AAEL009131), respectively, and a 1.9 and 1.6-fold over-expression of the glutathione-S-transferase encoding genes, GSTD4 (AAEL001054) and GSTE2 (AAEL007951) respectively, relative to non-exposed controls (Fig. 3). UV-exposure did not alter the expression of CYP6N9 (AAEL009121), of genes encoding two esterases Est_15578 (AAEL015578) and CCEae3o (AAEL011944) and of the stress responsive genes encoding heat shock proteins HSP70 (AAEL004148, AAEL006531, AAEL010948) and HSP90 (AAEL011704, AAEL011708, AAEL014843, AAEL014845).

3.4. UV-induced contrasting patterns of tolerance to chemical vs biological insecticides

The susceptibility to six different insecticides was assessed betw een UV-A exposed larvae and non-exposed ones. Whereas larval susceptibility to the carbamate propoxur was not affected by UV exposure at any time period, a significant positive effect on larval tolerance to DDT ($p = 6.6 \ 10^{-3}$) and permethrin ($p = 2.0 \ 10^{-2}$) was observed in 2 h daily UV-exposed larvae (Fig. 4). The tolerance phenotype was further emphasized in 15 h daily-exposed larvae with 18% 22% 23.5% and 28.5% tolerance increase to imidacloprid ($p = 5.0 \ 10^{-3}$), DDT ($p = 2.5 \ 10^{-4}$), temephos ($p = 6.0 \ 10^{-3}$) and permethrin ($p = 5.0 \ 10^{-5}$) respectively. By contrast, a significant 13.5% increased susceptibility to Bti in 15 h UV-exposed larvae was noticed ($p = 4.8 \ 10^{-2}$).

4. Discussion

In the present article, we describe strong detoxification responses associated with increased tolerance to chemical insecticides in mosquito larvae exposed to low energy UV-A light. These results were very surprising taking into account the available literature demonstrating the strong negative synergistic effect of UV and pesticides on organisms, higher than the simple summation of the independent effects of these stressors (Beketov et al., 2011). The admitted explanation for this synergistic effect is that UV radiation could increase the organisms' sensitivity to pesticides (Beketov et al., 2011; Liess et al., 2001). Generally, nonchemical stressors reducing individual fitness and causing mortality also do increase sensitivity to toxicants (Heugens et al., 2001). In our study, the biological responses observed may be global non-specific physiological responses to UV stress, amongst which insecticide metabolic processes may be involved. The factor, which may explain the difference between our study and previous literature, is the fact that UV stress was applied prior the insecticide exposure limiting the synergistic effect and allowing the induction of metabolic detoxification processes before insecticide penetration. Indeed, the main

Table 1

Primer pairs used for RT-qPCR analyses. For each primer pair, sequence, corresponding gene name and accession number, product length, Tm and optimal annealing temperature used in PCR program are indicated. PCR efficiency and different parameters of the calibration curves (R², slope and y-intercept) are also indicated according to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). A high specificity is indicated as "YES" when the primer pair matched to a PCR product Tm unique position in the Aedes aegypti genome and when was correct.

Jene name	Description	V ectorbase access num ber	Sequence forward primer (5 –3)	Sequence reverse primer (5 –3)	Annealing temperature (°C)	Calibration curves			Specificity (meltcurve& BLAST)	
						PCR Efficiency	R ²	Slope	y-intercept	-
CYP6BB2	Cytochrome P450	AAEL014893	GTTGTCAGTGAAACCCTACGGAAG	CGGAGTGTACGGCGAGTTGG	59.0	106.50%	0.987	3.175	16.466	Yes
CYP6N9	Cytochrome P450	AAEL009121	GCAGGATAAGGCACGGAAAG	CTGGAACGGTGTAGTCTTGG	58.0	96.30%	0.990	3.415	14.225	Yes
CYP6Z7	Cytochrome P450	AAEL009130	CGATTTGTTCAGTCACGATTC	TGTAGAGTCTTGCGGGAAG	53.0	88.30%	0.989	3.640	17.235	Yes
CYP6Z8	Cytochrome P450	AAEL009131	ACCATTACGCCCATTCTG	AGGTTGTGATCCCATTGC	53.0	93.40%	0.990	3.492	15.758	Yes
st 15578	Alpha esterase	AAEL015578	TGCGTGCTCTGTTCAATATCATC	TTGCCACTTCCGTTCCATCC	58.0	99.80%	0.997	□3.326	15.001	Yes
CCEae3o	Carboxy/choline alpha esterase	AAEL011944	CGAGTTGTGGGGCGAAGTATC	TCCGAACGACATTATGGCTTTG	59.0	104.00%	0.961	□3.229	25.751	Yes
STD4	Glutathion-S- transferase	AAEL001054	ATGGGCACGGAGGAAAATCG	AAAGTAGCACAAATCCAGCAAGC	59.0	105.40%	0.984	□3.200	11.603	Yes
STE2	Glutathion-S- transferase	AAEL007951	GCGGATTTCAGTTGCGTTTCG	ACCTGCTCGGCTCCACTTC	59.0	103.00%	0.998	□3.251	11.230	Yes
ISP 4148	Heatshockprotein (HSP70)	AAEL004148	CGGAAGAGGAGAAGGAGAAGG	GCAAGCCGCTCGATTACTG	55.0	90.00%	0.998	□3.587	14.030	Yes
ISP 6531	Heatshockprotein (HSP70)	AAEL006531	ACTCTTCAGGCGTGTTGG	CTGTCATTGGATCGGAATTGG	53.0	102.60%	0.993	□3.261	10.101	Yes
SP 10948	Heatshockprotein (HSP70)	AAEL010948	GGCACAGACGACGAACAAGG	CTTCAGCACCCGCAGATTCAC	55.0	94.90%	0.997	□3.452	15.404	Yes
(SP90	H eatshockproteins (HSP90)	AAEL011704 AAEL011708 AAEL014843 AAEL014845	CGGTATCGGAATGACCAAGG	CCAGATAGGACGAGTAGAAACC	53.0	99.10%	0.999	□3.345	15.115	Yes
PL8	Ribosom al protein	AAEL000987	CTGAAGGGAACCGTCAAGCAA	TCGGCGGCAATGAACAACT	55.5	101.40%	0.997	3.288	8.561	Yes
.PS7	Ribosomal protein	AAEL009496	GTTGGAGATGAACTCGGACCTG	GCCTTCTTGCTGTTGAACTCG	55.5	99.80%	0.986	3.327	13.998	Yes

Control Visible IP Merge Control Image: Control of the set of the

Fig. 1. Effect of UV on cell and tissue mortality. The effect of UV on mosquito cell mortality in living larvae from the three conditions (not exposed ("UV 0") or exposed 2 h ("UV 2 h") or 15 h ("UV 15 h") to UV). A positive control of gut cell mortality was performed by incubating larvae with 70% ethanol for 5 min. Larvae observed using a stereo zoom microscope (SZX16, Olympus) under normal light ("Visible"), epifluorescence (excitation: 450–490 nm and emission 🗆 520 nm ("IP") or both ("Merge") are shown. Intense red spots indicate staining of nuclei in dead cells by IP.

effect of UV on living cells is the generation of strong oxidative stress, ultimately leading to cell apoptosis in exposed organisms (Dahms and Lee, 2010; Mohan et al., 2003). More specifically, UV light is also known to induce the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion and hydrogen peroxide; these ROS are chemically reactive molecules able to interfere with DNA, lipids or proteins (Dahms and Lee, 2010; Mohan et al., 2003). Superoxide anion is rapidly converted by superoxide dismutase into hydrogen peroxide, itself transformed into water by catalase or glutathione-peroxidase activities (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). High dose and/or inadequate removal of ROS, especially superoxide anion, results in oxidative stress involved in many cellular toxic processes, including cell death (Dahms and Lee, 2010; Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Mohan et al., 2003). Nevertheless, we did not detect cellular mortality in any larval tissues examined, regardless of the duration of UV exposure. Furthermore, consistent with the low impact of UV-A exposure, ROS production in UV-exposed larvae was not induced, while catalases, which mediate the catabolization of hydrogen peroxide, were significantly more active in 15 h daily exposure of UV light.

In addition to a lack of increased ROS production, heat shock proteins (HSP) were not induced by UV-exposure. HSP are key proteins

involved in the maintenance of protein folding when organisms are exposed to heat or other stresses, such as UV (Roberts et al., 2010; Sang et al., 2012; Zhao and Jones, 2012). Numerous studies showed that HSP can be induced by UV exposure (Kim et al., 2011; Yamashita et al., 2012), even in insects exposed to low-energetic UV-A (Sang et al., 2012). However, we did not detect transcriptional up-regulation of HSP genes in exposed samples. Altogether, our results demonstrate that UV-A used for larval irradiation had a very low impact on mosquitoes, inducing a null/low oxidative stress promptly scavenged by oxidative stress enzymes preventing cell toxicity and potential mortality.

Nevertheless, UV exposure of mosquito larvae induced an increase in cytochrome P450, glutathione-S-transferase and esterase activities, which might be linked to the increased larval tolerance to all the chemical insecticides tested, except propoxur. The unaffected larval susceptibility to the carbamate propoxur is consistent with the apparent lack of cross-metabolic resistance reported so far between propoxur and other insecticides (Chouaibou et al., 2008; Hidayati et al., 2011; Kamgang et al., 2011; Perera et al., 2008). Indeed, insect resistance to carbamates is mainly due to an alteration of the target site or of specific enzymes, such as malathion carboxylesterase (Bisset et al., 2006;

G. TGt fleatr ea use t/aA quAtijci afiax Tooxlogyldg/p14041(4D (3) BB)93897397



Fig. 2. Effect of UV on enzyme activities. Enzyme activities of non UV-exposed larvae ("UV 0") or exposed 2 h to UV light ("UV 2") or 15 h to UV light ("UV 15") every day. Cytochrome P450 monooxygenase activities (A), Glutathione-S-transferase (B), -esterase (C), -esterase (D) and catalase (E) activities are indicated. The quantity of reactive oxygen species (ROS) (F) is also shown. Values are indicated as mean percentage \pm standard error. For each enzyme activity measured, significant differences (p < 0.05, Wilcoxon test) between treatments are indicated by different letters above the bars.

Wilcoxon test) between treatments are indicated by different letters above the bars. Perera et al., 2008). Regarding UV-induced tolerance to the other insecticides, our results are consistent with the extensive literature correlating increased detoxification enzyme activities with resistance to DDT (Lumjuan et al., 2005), imidacloprid (Riaz et al., 2013), temephos (Marcombe et al., 2012; Melo-Santos et al., 2010) and pyrethroids (Marcombe et al., 2012, 2009) in field-collected populations and laboratory strains of Ae. aegypti. Indeed, cytochrome P450 are key enzymes involved in the first step of insecticide degradation through their oxidative activities, metabolizing insecticides into more polar molecules subsequently processed by phase 2 enzymes (Chiu et al., 2011). GSTs usually participate in the dechlorination or in the conjugation of reduced glutathione to the

insecticide molecules (Enayati et al., 2005; Ranson and Hemingway, 2005), and can also limit oxidative damage caused by insecticides through their peroxidase activity (Vontas et al., 2002). Both esterases and GSTs can also contribute to insecticide sequestration to reduce toxicity to mosquito larvae (Hemingway, 2000; Kostaropoulos et al., 2001). To our knowledge, this is the first evidence that induction of detoxification enzymes associated with increased tolerance to chemical insecticides can be observed following mosquito larvae exposure to low-energy ultraviolet.

Numerous studies demonstrated the ability of members of the P450 subfamily CYP6 to metabolize various chemical insecticides responsible for metabolic resistance in mosquitoes (Chiu et al., 2008; David et al., 2013; Mitchell et al., 2012; Muller



Fig. 3. Effect of UV on the expression of candidate genes. Real-time quantitative PCR analysis of the differential mRNA expression of twelve candidate genes in Aedes aegypti larvae exposed to 2 h ("UV 2") or 15 h ("UV 15") of ultraviolet relative to larvae non-exposed to UV ("UV 0"). mRNA expression values of the genes are indicated as the mean of three biological replicates for each condition of UV-exposure. Error: standard error. The threshold of 1.5-fold over-expression is indicated by a horizontal dotted line.

394



Fig. 4. Effect of UV on insecticide tolerance. Tolerance to Bti, propoxur, imidacloprid, temephos, DDT and permethrin of larvae exposed daily to 2 h UV light ("UV 2"; gray) or 15 h UV light ("UV 15"; black) relative to non UV-exposed larvae ("UV 0"). Relative tolerances were calculated by subtracting the percentage of mortality obtained with non UV-exposed larvae. Error: standard error. Statistical differences from UV 0 (one-way ANOVA): *p < 0.05; *p < 0.01; **p < 0.01.

et al., 2008; Stevenson et al., 2011). More specifically, an overtranscription of three CYP6 genes (CYP6BB2, CYP6Z8 and CYP6Z7) was observed following UV exposure. CYP6BB2 has been previously shown to be over-transcribed in mosquito strains resistant to imidacloprid and permethrin (Poupardin et al., 2012; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2012), while CYP6Z7 was over-transcribed in an imidacloprid-resistant Ae. aegypti laboratory strain (Riaz et al., 2013). CYP6Z8 has been associated with mosquito resistance to several chemical insecticides, including imidacloprid, temephos and the two pyrethroids permethrin and deltamethrin (Marcombe et al., 2012, 2009; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2012). The fluctuations of cytochrome P450 and other related enzyme activities upon UV exposure may be related to the generation of photoproducts. As described in mammals and fish, cytochromes P450 are strongly induced by agonists of aryl hydrocarbon receptors produced by the photoconversion of light sensitive amino acids, such as tryptophan (Behrendt et al., 2010). Two GST-coding genes (GSTD4 and GSTE2) were also transcriptionally up-regulated upon UV exposure; GSTD4 was previously found over-expressed in mosquito strains resistant to imidacloprid and permethrin (Poupardin et al., 2012; Riaz et al., 2013) while the over-expression of GSTE2 was observed in temephospyrethroid- and DDT-resistant mosquitoes (Lumjuan et al., 2005, 2011; Marcombe et al., 2012). Moreover, the implication of GSTE2 in DDT resistance has been functionally validated by RNA interference experiments (Lumjuan et al., 2011). Altogether, these results suggest that the increased transcription of specific insecticide resistance genes upon UV exposure may lead to an increased tolerance to chemical insecticides.

The lower efficacy of chemical insecticides in UV-exposed compared to non-exposed mosquito breeding sites is generally attributed to the high degradation of chemicals when exposed to sunlight (Burrows et al., 2002; Laskowski, 2002). Of great significance, our results suggest that this low efficacy may also be partly due to the UV-induced higher metabolic tolerance of mosquito larvae to chemicals. Interestingly, in contrast to chemicals, UV light had an opposite effect on the susceptibility of mosquitoses to the bioinsecticide Bti (our data) and on the bioinsecticide itself; indeed, sunlight is known to strongly decrease the persistence of Bti insecticidal activity (Lacey, 2007), while the present work demonstrates that UV-exposed mosquitoes are more susceptible to Bti. Therefore, Bti may be more efficient in open areas exposed to sunlight than in shaded breeding sites protected from UV, but for a shorter period of time. It may therefore be necessary to take into account such UV-dependent contrasting tolerance patterns for adapting chemical and biological insecticide treatments to sunlight exposure of mosquito breeding sites to be treated.

The UV-induced increase of detoxification enzyme activities and gene expression led to a contrasting pattern of tolerance between chemical and biological insecticides. These results are consistent with previous works reporting an over-transcription of CYP6Z7 and/or CYP6Z8 genes in mosquitoes resistant to chemical insecticides (David et al., 2013; Marcombe et al., 2012, 2009; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2012), whereas the same genes were found significantly under-transcribed in a Btiresistant Ae. aegypti laboratory strain (Tetreau et al., 2012a). Detoxification enzymes are often involved in the degradation of small chemicals, such as insecticides, but they unlikely process large proteins like Bti toxins. Considering that detoxification activities represent an important energetic cost for insects and that their expression can be rapidly modulated by internal or external factors (Poupardin et al., 2008, 2012; Reynaud et al., 2008), the under-expression of these enzymes in the Bti-resistant strain may reflect compensatory mechanisms (Tetreau et al., 2012a). It is likely that anti-oxidant and detoxification enzyme overproduction in response to oxidative stress or photoproduct production in exposed larvae might have led to a decrease in resource allocations toward Bti resistance mechanisms. To our knowledge, this is the first experimental evidence that a metabolic tolerance to chemical insecticides is concomitant to a higher susceptibility of mosquito larvae to a biological insecticide. It supports the use of Bti as an efficient alternative to chemical insecticides when mosquito populations have developed a metabolic resistance to chemicals in the field.

Acknowledgments

The authors want to thank Thierry Gaude for technical assistance. They also want to thank Patrick Meresse from the "Centre Universitaire de Biologie Expérimentale" (CUBE) for providing an unrestricted access to the microscopy platform. Guillaume Tetreau was supported by the University of Grenoble and Alexia

Chandor-Proust and Idir Akhouayri by the 'AvecNet' FP7 European project. Frédéric Faucon and Sophie Prud'homme were supported by the French Ministry of Research and Renaud Stalinski by the French Rhône-Alpes region.

References

- Ballare, C.L., Rousseaux, M.C., Searles, P.S., Zaller, J.G., Giordano, C.V., Robson, T.M., Caldwell, M.M., Sala, O.E., Scopel, A.L., 2001. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina) - an overview of recent progress. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 62, 67-77.
- Behrendt, L., Jonsson, M.E., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2010. Induction of cytochrome P450 1 genes and stress response genes in developing zebrafish exposed to ultraviolet radiation. Aquatic Toxicology 98, 74-82.
- Beketov, M.A., Speranza, A., Liess, M., 2011. Ultraviolet radiation increases sensitivity to pesticides: synergistic effects on population growth rate of Daphnia magna at low concentrations. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 87 231-237
- 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, 76–85.
- set, J., Rodriguez, M.M., Fernandez, D., 2006. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in Aedes aegypti (Diptera: Bisset, J., Rodriguez, Culicidae) from Santiago de Cuba. Journal of Medical Entomology 43, 1185-1189.
- Blanford, S., Chan, B.H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R.J., Read, A.F., Thomas, M.B., 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. Science 308, 1638-1641
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberon, M., 2011. Bacillus thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41 423-431
- Burrows, H.D., Canle, M., Santaballa, J.A., Steenken, S., 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 67, 71-108.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry 55, 611–622.
 Chiu, T.-L., Wen, Z., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., 2008. Comparative molecular
- odeling of Anopheles gambiae CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 8855-8860.
- Chouaibou, M., Etang, J., Brevault, T., Nwane, P., Hinzoumbe, C.K., Mimpfoundi, R., Simard, F., 2008. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. Tropical Medicine and International Health 13, 476–486.
- 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, 165-170.
- Cirimotich, C.M., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2011. Native microbiota shape insect vector competence for hum an pathogens. Cell Host and Microbe 10, 307-310. Dahms, H.-U., Lee, J.-S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects
- and responses. Aquatic Toxicology 97, 3-14. David, J.-P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A., Paine, M.J.I., 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. Philosophical Transactions of the Royal
- 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 de
- National Academy of Sciences of the United States of America 108, 4772-4775. Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Guiguemde, T.R., Darriet, F., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J., Small, G.J., Hougard, J.M., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in Anopheles gam biae SL in Burkina Faso. A merican Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67, 617 - 622
- Dubovskii, I.M., Grizanova, E.V., Chertkova, E.A., Slepneva, I.A., Komarov, D.A., Vorontsova, Y.L., Glupov, V.V., 2010. Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 46, 35–43.
- Enayati, A., Hemingway, J., 2010. Malaria management: past, present, and future. Annual Review of Entomology 55, 569-591.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect Molecular Biology 14, 3-8.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, v cular function, and diseases. Antioxidants and Redox Signaling 15, 1583-1606. Goldberg, LJ., Margalit, J., 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal
- activity against Anopheles-sergentii, Uranotaenia-unguiculata, Culex-univitattus, Aedes-aegypti and Culex-pipiens. Mosquito News 37, 355–361. Gubler, D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology
- Reviews 11, 480-496.

- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30, 1009-1015
- Hemingway, J., Beaty, B.J., Rowland, M., Scott, T.W., Sharp, B.L., 2006. The innovative vector control consortium: improved control of mosquito-borne diseases. Trends in Parasitology 22, 308-312
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology 45, 371-391
- Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. Critical Reviews in Toxicology 31, 247-284
- Hidayati, H., Nazni, W.A., Lee, H.L., Sofian-Azirun, M., 2011. Insecticide resistance development in Aedes aegyptiupon selection pressure with malathion. Tropical Biomedicine 28, 425-437.
- Ingram, A.J., 1992. Review of chemical and UV light-induced melanomas in experimental-animals in relation to human-melanoma incidence. Journal of Applied Toxicology 12, 39-43. Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., Neill, S.L.O., 2011. Wolbachia and the biological con-
- trol of mosquito-borne disease. Embo Reports 12, 508-518.
- 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 and Vectors 4. Article no.: 79
- Killeen, G.F., Fillinger, U., Knols, B.G.J., 2002. Advantages of larval control for African malaria vectors: low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage. Malaria Journal 1, Article no .:
- Kim, R.-O., Rhee, J.-S., Won, E.-J., Lee, K.-W., Kang, C.-M., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, Brachionus sp. Aquatic Toxicology 101, 529-539
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31, 313–319.
- Lacey, L.A., 2007. Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Association 23, 133-163.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biological Control 21, 230-248. Laskowski, D.A., 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. Reviews of
- Environmental Contamination and Toxicology 174, 49-170.
- Liess, M., Champeau, O., Riddle, M., Schulz, R., Duquesne, S., 2001. Combined effects of ultraviolet-B radiation and food shortage on the sensitivity of the Antarctic amphipod Paramoera walkeri to copper. Environmental Toxicology and Chemistry 20, 2088-2092.
- Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L.A., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, Aedes aegypti. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35 861-871
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L.a., Somboon, P., Lycett, G., Ranson, H., 2011. The role of the Aedes aegypti Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41, 203-209
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Selior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yebakima, A., Corbel, V., David, J.-P., Chandre, F., 2012. Insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti from M artinique: distribution mechanisms and relations with environmental factors. PLoS ONE 7, Article no .:
- 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, Articleno.: 494. Mazza, C.A., Izaguirre, M.M., Zavala, J., Scopel, A.L., Ballare, C.L., 2002. Insect percep-
- tion of ambient ultraviolet-B radiation. Ecology Letters 5, 722-726 Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araujo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regis, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Ayres, C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms,
- evolution and reversion in an Aedes aegypti laboratory strain from Brazil. Acta Tropica 113, 180–189.
- Mitchell, S.N., Stevenson, B.J., Muller, P., Wilding, C.S., Egyir-Yawson, A., Field, S.G., Hemingway, J., Paine, M.J.I., Ranson, H., Donnelly, M.J., 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in Anopheles gambiae from Ghana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 6147-6152.
- Mittal, P.K., Adak, T., Sharma, V.P., 1995. Effect of water pH on the larvicidal activity of Spherix (Bacillus sphaericus) and Bactoculicide (Bacillus thuringiensis H-14) against mosquitoes. National Academy Science Letters - India 18, 189-191
- Mohan, M., Taneja, T.K., Sahdev, S., Mohareer, K., Begum, R., Athar, M., Sah, N.K., Hasnain, S.E., 2003. Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in Spodoptera frugiperda (Sf9) cells. Cell Biology International 27, 483-490.
- Muller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A., Yawson, A.E., Mitchell, S.N., Ranson, H., Hemingway, J., Paine, M.J.I., Donnelly, M.J., 2008. Field-caught permethrin-resistant Anopheles gambiae Overexpress CYP6P3, P450 that metabolises pyrethroids. PLoS Genetics 4, Article no.: 11.

G. TGt fleatr ea use t/ aA q'uAtju aFiex flowslogy/dg/0+40+1(4D (30 BB)03897397

- Perera, M.D.B., Hemingway, J., Karunaratne, S.H.P.P., 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. Malaria Journal 7, Article no.: 168.
 Pfaffl. M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time
- RT-PCR. Nucleic Acids Research 29, e45.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Crossinduction 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, 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.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Vontas, J., David, J.P., Reynaud, S., 2010. Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito Aedes aegypti. Insect Molecular Biology 19, 185–193.
- R Development Core Team, 2007. R: a Language and Environment for Statistical Computing, http://www.R-project.org
- Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Mosquito glutathione transferases. In: Press, E.A. (Ed.), Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases, San Diego., p. 226.
- Reynaud, S., Duchiron, C., Deschaux, P., 2001. 3-methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (Cyprinus carpio L) macrophages. Toxicology and Applied Pharmacology 175, 1-9.
- Reynaud, S., Marionnet, D., Taysse, L., Duchiron, C., Deschaux, P., 2002. The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (Cyprinus carpio L.). Fishand Shellfish Immunology 12, 17–34.
- Reynaud, S., Raveton, M., Ravanel, P., 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. Aquatic Toxicology 87, 139–145.
- Riaz, M.A., Chandor-Proust, A., Dauphin-Villemant, C., Poupardin, R., Jones, C.M., Strode, C., Regent-Kloeckner, M., David, J.-P., Reynaud, S., 2013. Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector Aedes aegypti. A quatic toxicology (Amsterdam, Netherlands) 126, 326-337.
- 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. A quatic Toxicology 93, 61-69.
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. Journal of Fish Diseases 33, 789-801.
- 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, 547-559.
- Ross, R., 1901. Malaria and mosquitoes. Nature 63, 440.
- Saavedra-Rodriguez, K., Suarez, A.F., Salas, I.F., Strode, C., Ranson, H., Hemingway, J., Black, W.C., 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito Aedes aegypti. Insect Molecular Biology 21, 61-77.

- Sang, W., Ma, W.-H., Qiu, L., Zhu, Z-H., Lei, C.-L., 2012. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle Tribolium castaneum. Journal of Insect Physiology 58, 830-836.
- 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, 775-806.
- Scholte, E.J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G.F., Knols, B.G., 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult A frican malaria mosquitoes. Science 308, 1641–1642.
- malaria mosquitoes. Science 308, 1641–1642.
 Scott, T.W., Takken, W., Knols, B.G.J., Boete, C., 2002. The ecology of genetically modified mosquitoes. Science 298, 117–119.
- Sibanda, M.M., Focke, W.W., Labuschagne, FJ.W.J., Moyo, L., Nhlapo, N.S., Maity, A., Muiambo, H., Massinga Jr., P., Crowther, N.A.S., Coetzee, M., Brindley, G.W.A., 2011. Degradation of insecticides used for indoor spraying in malaria control and possible solutions. Malaria Journal 10, Article no.: 307.
- Soderlund, D.M., 2008. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest Management Science 64, 610–616.
- Stevenson, BJ., Bibby, J., Pignatelli, P., Muangnoicharoen, S., O'Neill, P.M., Lian, L.-Y., Mueller, P., Nikou, D., Steven, A., Hemingway, J., Sutcliffe, MJ., Paine, M.J.I., 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector Anopheles gambiae metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41, 492–502.
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C.M., Stalinski, R., Riaz, M.A., Paris, M., David, J.P., Adang, M.J., Despres, L., 2012a. Larvalmidgut modifications associated with Bti Resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. BMC Genomics 13, Article no.: 248.
 Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J.P., Reynaud, S., Despres, L.,
- Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J.P., Reynaud, S., Despres, L., 2012b. Decreased toxicity of Bacillusthuringiensis subsp. israelensis to mosquito larvae after contact with leaf litter. Applied and Environmental Microbiology 78, 5189-5195.
- Tomori, O., 2004. Yellow fever: the recurring plague. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 41, 391-427.
- 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 111, 1–12.
- Van Asperen, K., 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. Journal of Insect Physiology 8, 401-408.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., Hemingway, J., 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, Nilaparvata lugens. Biochemical Journal 362, 329-337.
- Wang, S.Q., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A.A., Kopf, A.W., Bart, R.S., 2001. Ultraviolet A and melanoma: a review. Journal of the American Academy of Dermatology 44, 837–846.
- Yamashita, Y., Ikeda, T., Matsuda, M., Maji, D., Hoshino, T., Mizushima, T., 2012. Purification and characterization of HSP-inducers from Eupatorium lindleyanum. Biochemical Pharmacology 83, 909–922.
- Yang, Y.-Y., Liu, Y., Teng, H.-J., Sauman, I., Schnal, F., Lee, H.-J., 2010. Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito Aedes aegypti. Journal of Insect Physiology 56, 1219-1223.
- Zhao, L., Jones, WA., 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. ISJ-Invertebrate Survival Journal 9, 93–101.

V. Annexe 5

Guillaume Tetreau, <u>Renaud Stalinski</u>, Jean-Philippe David, Laurence Després

Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 108(7):894-900 (**2013**)

Contribution : J'ai réalisé les expérimentations. J'ai analysé les résultats et participé à la rédaction de l'article.

Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately

Guillaume Tetreau/*, Renaud Stalinski, Jean-Philippe David, Laurence Després

Laboratoire d'Ecologie Alpine, Unité Mixte de Recherche 5553, Université de Grenoble 1, Grenoble, France

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) is increasingly used worldwide for mosquito control and is the only larvicide used in the French Rhône-Alpes region since decades. The artificial selection of mosquitoes with field-persistent Bti collected in breeding sites from this region led to a moderate level of resistance to Bti, but to relatively high levels of resistance to individual Bti Cry toxins. Based on this observation, we developed a bioassay procedure using each Bti Cry toxin separately to detect cryptic Bti-resistance evolving in field mosquito populations. Although no resistance to Bti was detected in none of the three mosquito species tested (Aedes rusticus, Aedes sticticus and Aedes vexans), an increased tolerance to Cry4Aa (3.5-fold) and Cry11Aa toxins (8-fold) was found in one Ae. sticticus population compared to other populations of the same species, suggesting that resistance to Bti may be arising in this population. This study confirms previous works showing a lack of Bti resistance in field mosquito populations treated for decades with this bioinsecticide. It also provides a first panorama of their susceptibility status to individual Bti Cry toxins. In combination with bioassays with Bti, bioassays with separate Cry toxins allow a more sensitive monitoring of Bti-resistance in the field.

Key words: Bacillus thuringiensis subsp. israelensis - bioassays - field resistance - Cry toxins - mosquito

Numerous insect species represent major economic and sanitary issues for human societies as they can strongly impact crop cultures or transmit severe human diseases such as malaria, leishmaniasis or trypanosomiasis (Medlock et al. 2012, Savary et al. 2012, van Griensven & Diro 2012). The control of pest populations is therefore of high importance and relies mainly on the use of chemical and biological insecticides (Meissle et al. 2011, van den Berg 2011). The main threat for an efficient pest control is the ability of insects to quickly develop resistance to nearly all the insecticides used, leading to a strong decrease of insecticides efficiency (Tabashnik et al. 2008, Rivero et al. 2010). To bypass these resistances and adapt the insecticide treatment strategies, detecting incipient resistance in treated populations as early as possible is required (Carriere et al. 2010).

The most obvious approach to detect resistance in the environment is to perform bioassays on field-sampled individuals, which consist in exposing insects to increasing amount of insecticide to calculate their relative tolerance to this insecticide (Sivasupramaniam et al. 2007). Such basic approach is often preliminary to

doi: 10.1590/0074-0276130155

Financial support: ANR (ANR-08-CES-006-01 DIBBECO) GT was supported by the French Ministry of Research and RS was supported by the French Rhône-Alpes region.

GT current address: Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY, USA + Corresponding author: guillaume.tetreau@gmail.com Received 14 January 2013

online | memorias.ioc.fiocruz.br

further studies exploring in-depth the molecular bases of the resistance (Tabashnik et al. 2006, Marcombe et al. 2009). Bioassays have been performed on numerous field populations of insects with different chemical insecticides (Ocampo et al. 2011, Shin et al. 2011, Silva et al. 2011, Springate & Colvin 2012), but also with biological insecticides such as Bacillus sphaericus (Su & Mulla 2004, Silva et al. 2008, Akiner et al. 2009) and Bacillus thuringiensis subspecies (Tabashnik et al. 1990, Gao et al. 2010, Tabashnik & Carriere 2010, Alcantara et al. 2011, Gassmann et al. 2011). B. thuringiensis subsp. israelensis (Bti) is increasingly used worldwide for mosquito control and investigating potential Bti-resistance in the environment is essential to ensure the long term use of this insecticide. Resistance to Bti has been extensively searched in natural populations of mosquitoes (Liu et al. 2004, Vasquez et al. 2009, Loke et al. 2010, Kamgang et al. 2011) and generally concluded in a lack of Bti resistance in field populations even after decades of Bti treatments, although a few studies described a decreased susceptibility in some populations (Zhang et al. 2004, Paul et al. 2005, Boyer et al. 2007, 2012). Nevertheless, these studies may suffer from technical biases, notably on the choice of the reference strain.

Usually, when bioassays are performed, a laboratory strain from the same species, susceptible to the insecticide tested, is used as a reference to calculate the resistance ratio of the strains/populations tested. Although this approach is widely used, it is adapted only if the reference strain has been sampled recently in populations geographically close to those tested. If this is not the case, results can reflect a basal difference of tolerance between the field populations and the reference strain, independent from *Bti*-treatments, rather than a selected resistance evolving in the populations treated with *Bti*

Accepted 10 April 2013

(Zhang et al. 2004, Paul et al. 2005). Moreover, this approach is only possible for a restricted number of species, as most mosquito species cannot be maintained in laboratory conditions. An alternative solution is to compare treated and untreated populations; but even in this case, the differences observed can be due to natural tolerance differences between populations and not to a selected resistance (Boyer et al. 2007, 2012). Therefore when mosquitoes cannot be maintained in laboratory, the only way of detecting incipient resistance is to apply a highly sensitive bioassay approach on field-populations and test for the evolution of their tolerance for several years (Janmaat & Myers 2003, Tabashnik & Carriere 2010). Strong evidence for an evolved resistance in the environment is given by an increasing tolerance to the insecticide in the same population over generations. Unfortunately, one of the main reasons why no firm resistance to Bti was detected in the field yet may be due to the low resolution of bioassays performed with Bti, a mixture of four main toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa).

Recent works on Bti-resistance showed that while levels of resistance to Bti can be low in a laboratory-selected strain (3.5-fold), resistance to each of the Cry toxins tested separately in bioassays can be much higher (up to 60-fold) (Paris et al. 2011, Tetreau et al. 2012b). Here we present an improved bioassay method consisting in performing distinct bioassays with each of the three Bti Cry toxins on field populations of mosquitoes. We applied this approach to various mosquito populations collected in the French Rhône-Alpes region, where Bti is the only larvicide used for mosquito control since 1990. Furthermore, the leaf litters containing field-persistent Bti able to select for resistance in mosquitoes in the laboratory were sampled in this region, raising concerns about possible Bti-resistance evolving in mosquitoes in these particular breeding sites (Tilquin et al. 2008, Paris et al. 2010, 2011). The variations in susceptibilities of field mosquito populations to Bti and Cry toxins are described and discussed. Perspectives of further improvement and wide application of this tool are also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito sampling and species identification - Mosquito larvae were sampled in 17 different breeding sites of the French Rhône-Alpes region in close collaboration with the Entente Interdépartementale pour la Démoustication (EID) (Fig. 1). Among them, 12 sites were regularly treated with *Bti* for decades and five had never been treated with *Bti*. Each sampling site is identified by the letter "P" followed by a number. Each site can be associated to different "P" numbers corresponding to different sampling dates. As mosquito breeding sites often contained more than one mosquito species, different species sampled at the same time in the same site were associated to the same "P" number.

As numerous different species can share the same breeding site, larvae were individually identified before bioassays using the identification key provided in Becker et al. (2010). Bioassays with different species were performed independently. *Production of individual Bti Cry toxins* - A crystal negative strain of *Bti* (4Q2-81) transformed with the plasmids pHT606, pHT618 or pWF53 was used for the production of Cry4Aa, Cry4Ba or Cry11Aa toxins respectively. These strains were obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) or from Prof. B Federici (University of California, Riverside, CA, USA). Each toxin was produced, purified and quantified as previously described (Tetreau et al. 2012b). Toxin suspensions were stored at -20°C until use.

Bioassays procedure and data analyses - To avoid any influence of the larval stage on bioassays, larvae were maintained in the water from the breeding site where they were sampled until the third instar. Considering that the species studied cannot reproduce in laboratory conditions, we could not perform bioassays on F1 larvae, but directly used field-collected larvae. In order to limit the impact of environmental parameters in the sampled sites (*e.g.* pH of the water, pollutants etc.) on bioassay results, field collected larvae were kept in fresh water for 24 h before performing the bioassays.

When more than 2,000 larvae of the same species were sampled, standard bioassays were conducted by exposing larvae to five-seven concentrations of Cry4Aa, Cry4Ba, Cry1IAa and commercial *Bti* (Vectobac WG, 3500 ITU/mg) for 48 h in order to obtain 5-95% mortality. When 1,000-2,000 larvae were sampled, high sensitive standard bioassays could be performed, but not for all the Cry toxins; bioassays with *Bti* and Cry4Aa were performed in priority since Cry4Aa is the main toxin persisting in the field after *Bti* treatment (Tetreau et al. 2012a) and with the highest resistance ratio in the *Bti*-



Fig. 1: localisation of the 32 mosquito breeding sites visited in the French Rhône-Alpes region. The 22 treated (triangles) and the 10 untreated (circles) sites visited are shown. Sampled sites used for bioassays (12 for treated and 5 for untreated sites) are indicated by a filled item and by the name of the population in italic (untreated site) or not (treated site).

resistant strain described in Tetreau et al. (2012b). Lethal concentrations for 50% individuals (LC_{50}) were calculated for each population and each toxin using a probit statistical model with the module "dose" of XLSTAT v.2009.4.06 (Addinsoft).

When only a limited number of larvae of the same species were sampled, standard bioassays could not be performed, as a reduced number of replicates and/or concentrations performed would lead to a high variability in

larval mortality and to a low reliability of the LC_{50} values. In this case, a "diagnostic dose" approach was used, consisting in using one concentration of Cry toxin or *Bti* chosen in order to obtain 60-80% mortality. These doses were designed for each species and each toxin from the bioassays data from the first population sampled. For each toxin and *Bti*, statistical differences in larval mortality between two populations from the same species were measured by a Wilcoxon test performed with R 2.8.1 software (R Development Core Team 2007).

For each toxin tested, four replicates per concentration was performed on 20 third-instar larvae in 50 mL of tap water containing the insecticide according to the standard bioassay procedure described by the World Health Organization (WHO 2005). For each population tested, five negative controls, consisting in 20 larvae exposed to tap water only, were performed. All bioassays were performed at 17°C. For each population, the mean larval size was calculated from more than 15 larvae.

Significance of larval size and mortality differences between the three species (*Aedes rusticus, Aedes sticticus* and *Aedes vexans*) were estimated by performing a Wilcoxon test using R 2.8.1 software (R Development Core Team 2007).

Considering that the species studied cannot be maintained in laboratory, we were unable to compare the tolerance levels of the sampled populations to a susceptible laboratory strain. Therefore, for each species we compared populations of mosquitoes with each other. Then, we calculated "tolerance ratios" which represent an increased or decreased susceptibility of a population relative to the others.

RESULTS AND DISCUSSION

Limits of performing bioassays on field populations - Among the 71 natural mosquito populations sampled, data from 59 populations (83%) were not analysable due to insufficient larvae to perform bioassays (69%), to mortality in controls (11%) or to high rate of pupation during bioassays (3%) (Table I). No bioassay data could be obtained for Aedes cantans, Aedes cataphylla, Aedes cinereus and Culex pipiens field populations in the present study, while sufficient data were obtained for Ae. rusticus, Ae. sticticus and Ae. vexans populations (Table I). Among the three Ae. rusticus populations tested in bioassays, two were sampled in treated sites (P3 and P5) and one in an untreated site (P14) while Ae. sticticus (P16, P20 and P52) and Ae. vexans (P18, P20, P30, P42 and P44) populations were all sampled in treated sites. Only one population of Culiseta annulata (P51) was sampled in sufficient amount to perform a diagnostic dose approach and showed comparable mortality rates as Ae. vexans populations at the same doses (data not shown).

The fact that only less than 17% of the populations sampled and only four out of the eight species sampled gave analysable results highlights the difficulty to find sites producing enough calibrated larvae of the same species to perform bioassays. This limit is mainly due to typical features of the Rhône-Alpes region, constituted of numerous sites of moderate size largely scattered in woodlands.

Interspecific comparisons - Ae. sticticus and Ae. vexans larvae exhibited the same patterns of tolerance (Wilcoxon test, p > 0.05) except for Cry4Aa for which

		Bio	bassays	Not analysable populations			
Species	Sampled	LC ₅₀	Diagnostic dose	Low sample size	High mortality in controls	Pupation	
Aedes cantans	11	0	0	9	2	0	
Aedes cataphylla	5	0	0	5	0	0	
Aedes cinereus	3	0	0	1	1	1	
Aedes rusticus	15	3	0	12	0	0	
Aedes sticticus	14	3	0	8	3	0	
Aedes vexans	12	3	2	6	0	1	
Culex pipiens	6	0	0	4	2	0	
Culiseta annulata	5	0	1	4	0	0	
Total	71	9	3	49	8	2	

TABLE I

Summary of mosquito breeding sites sampled where at least one of the eight studied species were found

for each species, the number of populations for which bioassays were performed is indicated. The main reason why bioassays were not performed for the other populations is also indicated. LC_{so} lethal concentrations for 50% individuals.

		LC _o						
Species	Size (mm)	Cry4Aa (ng/mL)	Cry4Ba (ng/mL)	Cry11Aa (ng/mL)	Bti ^a (µg/mL)			
Aedes rusticus	10.6 ± 0.8	262.7 ± 88.3	60.9 ± 15.2	106.9 ± 22.2	2.03 ± 1.05			
Aedes sticticus	6.3 ± 0.9	14.8 ± 6.8	8.9 ± 0.0	15.7 ± 11.0	0.11 ± 0.028			
Aedes vexans	6.2 ± 0.6	67.6 ± 6.4	13.5 ± 0.4	27.1 ± 11.7	0.11 ± 0.009			
		Tolerance ratios						
Ratio sp1/sp2	Size	Cry4Aa	Cry4Ba	Cry11Aa	Bti^a			
Ae. rusticus/Ae. sticticus	1.7x	17.8x	6.8x	6.8x	18.5x			
Ae. rusticus/Ae.vexans	1.7x	3.9x	4.5x	3.9x	18.5x			
Ae. vexans/Ae. sticticus	1.0x	4.6x	1.5x	1.7x	1.0x			

TABLE II

Mean lethal concentrations for 50% individuals (LC₅₀) calculated for all the populations of each species and tolerance ratios obtained for each species with individual Cry toxins and commercial *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*)

a: Vectobac WG. Larval size ratios between species are also indicated.

Ae. vexans larvae were 4.6-fold more tolerant than Ae. sticticus larvae (Wilcoxon test, p < 0.05) (Table II). Ae. rusticus was significantly 3.9-fold-18.5-fold more tolerant than Ae. sticticus and Ae. vexans species when tested with Cry toxins and commercial *Bti* (Wilcoxon test, p < p0.05) (Table II). Ae. sticticus and Ae. vexans had similar larval size (6.3 and 6.2 mm; Wilcoxon test, p > 0.05) while Ae. rusticus larvae were significantly 70% larger than larvae from other species (10.6 mm; Wilcoxon test, p < 0.05) (Table II). Correlating larval size with *Bti* toxins tolerance indicated that the higher tolerance of Ae. rusticus larvae compared to the two other species is due to the size differences (Supplementary data), linked to its particular life cycle containing a long winter larval period. This induces a slow larval development and metabolism that could lead to an alteration of feeding behaviour, therefore reducing the quantity of Bti ingested that could partly explain the lower susceptibility to Bti observed for this species. These results are congruent with observations made by the local mosquito control agency EID that Ae. rusticus requires a higher dose of Bti than other Aedes species for efficient control.

Intraspecific comparisons - Among the populations analysed, no increased tolerance to *Bti* was found in *Ae. rusticus, Ae. sticticus* and *Ae. vexans* (Figs 2-5). This result is congruent with the observations of the EID who reported no decreased efficacy of *Bti* treatments in the treated sites over time and also with previous works conducted in other *Bti*-treated areas (Liu et al. 2004, Vasquez et al. 2009, Loke et al. 2010, Kamgang et al. 2011).

The untreated P14 population of *Ae. rusticus* was significantly 1.77-fold more tolerant than treated P3 and P5 populations to Cry4Aa, but 1.72-fold less tolerant than P5 to Cry11Aa (Fig. 2). No significant differences be-

tween these populations were found when tested with Cry4Ba and *Bti* (Fig. 2).

The tolerance of *Ae. vexans* populations for which full bioassays were performed did not show significant variations for Cry4Aa, Cry4Ba and *Bti* while the P44 population was 2.5-fold more tolerant than the P20 population to Cry11Aa (Fig. 3). P30 and P42 populations, for which the diagnostic doses approach was used, did not show any significant differential tolerance to Cry4Ba, Cry11Aa and *Bti* (Fig. 4).

Bioassays with individual Cry toxins being more sensitive than bioassays with the whole *Bti* toxins mixture, slight changes in tolerance were observed to Cry4-Aa and Cry11Aa in the P14 population of *Ae. rusticus* and to Cry11Aa in the P44 population of *Ae. vexans.*



Fig. 2: lethal concentrations for 50% individuals (LC₅₀) of P03, P05 and P14 *Aedes rusticus* populations to Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa toxins and commercial *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis (Bti)*. Untreated populations are indicated in white and treated populations in black. Error: 95% confidence intervals calculated with the probit statistical analysis. 1160, 2320 and 2320 larvae were sampled from P03, P05 and P14 populations, respectively. Approximate distance between the sites: P03-P05, 70 km, P03-P14, 58 km and P05-P14, 85 km. Asterisks mean p < 0.05. NS: not significant.

could be detected with classical bioassays with *Bti*. This hypothesis has to be confirmed by monitoring the evolution of the tolerance of the populations tested in this study for several years. In combination with bioassays with *Bti*, bioassays with separate Cry toxins allow a more sensitive monitoring of the susceptibility of field-mosquito populations to *Bti*. Therefore, we believe that such approach should be used in further studies looking for *Bti*-resistance in other species from the Rhône-Alpes region (e.g. *Aec. cantans*), from the Mediterranean region (e.g. *Aedes detritus, Aedes caspius*) and should also be applied to human pathogens vector species such as *Ae. aegypti, Aedes albopictus* and *Cx. pipiens* exposed to regular *Bti* treatments.

Bti is widely used for mosquito control. Based on observations of the resistance phenotype of a *Bti*-resistant laboratory strain, we developed a new tool: bioassays with individual *Bti* Cry toxins. This highly sensitive tool could be used in combination with bioassays with *Bti* in order to improve the monitoring of the susceptibility of field-populations of mosquitoes regularly treated with *Bti*.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Brian Federici, for providing recombinant *Bt* strains, to the staff of the mosquito control agency EID, for precious help in mosquito sampling and species identification, to Thierno Mamadou Diallo and undergraduate students, for their help for bioassays, and to the anonymous reviewers, for constructive comments.

REFERENCES

- Akiner MM, Simsek FM, Caglar SS 2009. Insecticide resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Turkey. J Pestic Sci 34: 259-264.
- Alcantara E, Estrada A, Alpuerto V, Head G 2011. Monitoring Cryl-Ab susceptibility in Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on *Bt* corn in the Philippines. *Crop Prot 30*: 554-559.
- Becker N, Peric D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Madon M, Kaiser A 2010. *Mosquitoes and their control*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 518 pp.
- Boyer S, Paris M, Jego S, Lemperiere G, Ravanel P 2012. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol Control* 62: 75-81.
- 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.
- Carriere Y, Crowder DW, Tabashnik BE 2010. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. Evol Appl 3: 561-573.
- Gao YL, An JJ, Liu CX, Wu KM 2010. Monitoring of *Bt* resistance from field-collected *Helicoverpa armigera* populations in Northern China. *Southwest Entomol* 35: 399-402.
- Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, Dunbar MW 2011. Field-evolved resistance to *Bt* maize by Western corn rootworm. *PLoS ONE 6*: e22629.
- Janmaat AF, Myers J 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni. Proc R Soc Lond B Biol Sci 270*: 2263-2270.
- 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. Parasit Vectors 4: 79.

- Liu H, Cupp EW, Guo AG, Liu NN 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. J Med Entomol 41: 946-952.
- Loke SR, Andy-Tan WA, Benjamin S, Lee HL, Sofian-Azirun M 2010. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Trop Biomed* 27: 493-503.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yebakima A, Ranson H, Corbel V, David JP 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.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W 2012. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 435-447.
- Meissle M, Romeis J, Bigler F 2011. Bt maize and integrated pest management - a European perspective. Pest Manag Sci 67: 1049-1058.
- Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop 118*: 37-44.
- Paris M, Boyer S, Bonin A, Collado A, David JP, 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, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J-P 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci 67*: 122-128.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. J Am Mosq Control Assoc 21: 305-309.
- Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandor-Proust A, Reynaud S, David JP 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. Aquat Toxicol 114-115: 49-57.
- R Development Core Team 2007. R: a language and environment for statistical computing. Available from: R-project.org.
- Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David JP 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. *Aquat Toxicol 93*: 61-69.
- Rivero A, Vezilier J, Weill M, Read AF, Gandon S 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog 6*: e1001000.
- Savary S, Horgan F, Willocquet L, Heong KL 2012. A review of principles for sustainable pest management in rice. Crop Prot 32: 54-63.
- Shin EH, Park C, Kim HK, Lee DK, Kim SI, Kang H, Chang KS 2011. Insecticide susceptibility of *Ephemera orientalis* (Ephemeroptera: Ephemeridae) and two mosquito species, *Anopheles sinensis* and *Culex pipiens* in the Republic of Korea. J Asia Pac Entomol 14: 233-236.
- Silva M, de Melo Chalegre KD, Anastacio DB, de Oliveira CMF, da Silva SB, Acioli RV, Hibi S, de Oliveira DC, Parodi ESM, Marques CAM, Furtado AF, Regis L 2008. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol Control* 44: 227-234.
- Silva TBM, Siqueira HAA, Oliveira AC, Torres JB, Oliveira JV, Montarroyos PAV, Farias M 2011. Insecticide resistance in Brazilian

900 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(7), November 2013

populations of the cotton leaf worm, *Alabama argillacea. Crop Prot 30*: 1156-1161.

- Sivasupramaniam S, Head GP, English L, Li YJ, Vaughn TT 2007. A global approach to resistance monitoring. J Invertebr Pathol 95: 224-226.
- Springate S, Colvin J 2012. Pyrethroid insecticide resistance in British populations of the cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella*. *Pest Manag Sci 68*: 260-267.
- Su TY, Mulla MS 2004. Documentation of high-level Bacillus sphaericus 2362 resistance in field populations of Culex quinquefasciatus breeding in polluted water in Thailand. J Am Mosq Control Assoc 20: 405-411.
- Tabashnik BE, Biggs RW, Fabrick JA, Gassmann AJ, Dennehy TJ, Carriere Y, Morin S 2006. High-level resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CrylAc and cadherin genotype in pink bollworm. *J Econ Entomol 99*: 2125-2131.
- Tabashnik BE, Carriere Y 2010. Field-evolved resistance to *Bt* cotton bollworm in the US and pink bollworm in India. *Southwest Entomol* 35: 417-424.
- Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW 1990. Field development of resistance to *Bacillus-thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). J Econ Entomol 83: 1671-1676.
- Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carriere Y 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nat Biotechnol 26*: 199-202.
- Tetreau G, Alessi M, Veyrenc S, Périgon S, David JP, Reynaud S, Després L 2012a. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in

the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. *Appl Environ Microbiol* 78: 8362-8367.

- Tetreau G, Bayyareddy K, Jones CM, Stalinski R, Riaz MA, Paris M, David JP, Adang MJ, Despres L 2012b. Larval midgut modifications associated with *Bti* resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics 13*: 248.
- Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P, Geremia RA, Gury J 2008. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis (Bti)* in mosquito natural habitats. *PLoS ONE* 3: e3432.
- van den Berg H 2011. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Cien Saude Colet 16*: 575-590.
- van Griensven J, Diro E 2012. Visceral leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am 26: 309-322.
- Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC 2009. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and methoprene. *J Med Entomol* 46: 881-887.
- WHO World Health Organization 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, WHO, Geneva, 39 pp.
- Zhang HY, Yang CJ, Huang JY, Lu L 2004. Susceptibility of field populations of Anopheles sinensis (Diptera: Culicidae) to Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Biocontrol Sci Technol 14: 321-325.

Résumé

Le *Bti* est un bioinsecticide mondialement utilisé dans la lutte contre les moustiques. La toxicité du *Bti* est due à un cristal, constitué de quatre toxines principales, produit par la bactérie *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Le *Bti* représente une bonne alternative aux insecticides chimiques car il est peu persistant dans l'environnement et spécifique de l'insecte ciblé. La sélection d'une souche de moustique (*Aedes aegypti*) de laboratoire au *Bti* a entrainé une résistance modérée au *Bti* (3.5 fois) mais plus élevée aux toxines testées séparément (jusqu'à 60 fois). Ce résultat suggère que l'adaptation des moustiques au *Bti* en populations naturelles peut être corrélée à une résistance accrue à chacune des toxines. Pour pouvoir détecter une adaptation au *Bti*, il est donc nécessaire de mieux caractériser la résistance à chaque toxine qui compose le *Bti*.

Cette thèse se structure en trois axes. 1. L'analyse du transcriptome par RNA-seq des souches résistantes à chaque toxine et au *Bti* a permis de mettre en évidence plusieurs gènes candidatas potentiellement impliqués dans la résistance. La résistance développée au laboratoire est complexe, combinant des mécanismes de résistances spécifiques de chaque toxine et généralistes. 2. L'analyse du transcriptome d'une souche sensible exposée au *Bti* a permis d'identifier des gènes impliqués dans la réponse à l'intoxication, notamment les phosphatases alcalines. De plus, l'exposition à chaque toxine et au *Bti* induit une modification de l'expression de ces gènes bien plus importante chez les souches résistance et dans la réponse à une exposition au *Bti* est discutée. L'exposition au *Bti* accroit la compétence vectorielle d'*A. aegypti* pour deux maladies tropicales (Dengue et Chikungunya), différemment selon si la souche est sensible ou résistante au *Bti*. Cette thèse permet de mieux comprendre les mécanismes de résistances au *Bti* et à ses toxines, ces connaissances sont nécessaires pour mieux anticiper la résistance sur le terrain.

Mots-clés : Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, Aedes aegypti, résistance, immunité

Abstract

Bti is a bioinsecticide used worldwide for mosquito control. *Bti* toxicity is due to a toxin containing crystal, composed of four main toxins, produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Bti* represents a good alternative to chemical insecticide because it is known to have a low persistence in the environment and to be specific to the targeted insect. The selection of a laboratory mosquito (Aedes aegypti) strain with a persistent form of *Bti* lead to moderate resistance (3.5-fold) to *Bti* but to higher resistance (up to 60-fold) to *Bti* toxins tested separately. This result suggests that the adaptation of mosquitoes to *Bti* in the field may be correlated to a higher resistance to each toxin. To be able to detect an adaptation to *Bti* it is thus necessary to characterise better the resistance against each toxin which composes *Bti*.

This thesis is organised in three lines of inquiry. 1. The transcritpome analysis of strains resistant to each toxin and to *Bti* using RNA-seq technique enabled to highlight genes and mechanisms potentially involved in the resistance. The resistance developed in the laboratory is complex, combining generalist and specific mechanisms to resist to each toxin. 2. The transcriptome analysis of a susceptible strain exposed to *Bti* enabled identifying genes involved in the response to the intoxication, especially alkaline phosphatases. Furthermore, exposure to *Bti* and to each toxin results in gene expression modification being far higher in resistant strains than in susceptible strain. 3. Immunity's part in the resistance and in the response to *Bti* exposition is discussed. The *Bti* exposure increases the vector competence of *A. aegypti* for two tropical diseases (Dengue and Chikungunya) differently, depending on the strain being susceptible or resistant to *Bti*. This thesis enables better understanding of resistance.

Keywords: Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, Aedes aegypti, resistance, immunity