

**RESISTANCE CHEZ *APHIS GOSSYPHII* PAR MODIFICATION DE
L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE**

F. VILLATTE¹*, D. AUGE*, P. TOUTON*, P. MENOZZI^a, D. FOURNIER^a
ET R. DELORME*

* Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA Versailles, Route de St
Cyr, 78026 Versailles cedex, France, et ^a Laboratoire d'Entomologie Appliquée,
Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

¹ pour toute correspondance

RESUME:

Une population (R) de puceron du melon *Aphis gossypii* en provenance du sud de la France présente des résistances à certains produits insecticides anti-cholinestérasiques comme le pyrimicarbe, par rapport à une population de référence (S). Le principal mécanisme de résistance est la modification de l'acétylcholinestérase (AChE). Deux allèles ont été détectés: un allèle codant pour une enzyme sensible dans la population S et un allèle codant pour une enzyme résistante dans la population R. L'enzyme se comporte de façon non michaelienne. L'existence d'une sensibilité plus forte de l'enzyme R à deux carbamates semble donner une piste pour la modélisation de composés anti-résistants, plus actifs contre les souches résistantes.

Mots-clés: *Aphis gossypii*, insecticide, résistance, acétylcholinestérase, allèle

SUMMARY: INSECTICIDE RESISTANCE IN *APHIS GOSSYPHII* BY
MODIFICATION OF ACETYLCHOLINESTERASE

A population (R) of *Aphis gossypii* is highly resistant to several anti-cholinesterase compounds, compared to a susceptible one (S). The main mechanism was a change in the acetylcholinesterase (AChE). Two alleles were found: an allele coding for a sensitive enzyme and an allele coding for a resistant enzyme. No heterozygote was found. The pattern of degradation of ASCh by the enzyme is not michaelian and the AChE from the R strain is slightly more sensitive to two bicyclic carbamates.

Key words: *Aphis gossypii*, insecticide, resistance, acetylcholinesterase, allele

INTRODUCTION

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme hautement spécialisée dans la métabolisation rapide de l'acétylcholine (ACh) dans la fente intersynaptique. La destruction de ce neurotransmetteur en excès permet ainsi le développement de nouveaux potentiels d'action au sein de la chaîne nerveuse. L'AChE est la cible de deux principales familles d'insecticides, les organophosphorés et les carbamates, qui l'inhibent et la rendent incapable d'hydrolyser l'ACh. Il s'en suit des perturbations graves au sein du système nerveux qui aboutissent à la mort de l'animal.

De nombreuses espèces d'arthropodes ont développé des résistances aux organophosphorés et aux carbamates par modification de cette enzyme (FOURNIER ET MUTERO, 1993). Parmi ces espèces résistantes, se trouve *Aphis gossypii*, qui est un puceron très polyphage et très répandu. Il cause des dégâts sur coton, cucurbitacées (courgettes, melon, concombre), solanacées (aubergine, poivron), citrus (citron), et plantes ornementales (chrysanthèmes) (LECLANT ET DEGUINE, 1995). Une population (R) provenant du sud de la France présente des résistances au pyrimicarbe (carbamate), diméthoate (organophosphoré) et au triazamate (carbamyltriazole), par rapport à une population sensible de référence (S). Cette étude montre que le principal mécanisme de résistance est la modification de l'AChE, devenue moins sensible aux inhibiteurs chez la souche résistante, et vise à caractériser l'enzyme R dans une optique appliquée.

MATERIEL ET METHODES

Insectes

La souche R a été collectée à Pernes les Fontaines (Provence) en 1992 sur culture de poivrons. La souche S de référence nous a été aimablement fournie par le Dr G. Labonne (INRA-ENSA Montpellier) et a été récoltée en 1985 à Navacelles (Provence) sur une parcelle non traitée. Les deux souches sont élevées sur de jeunes plants de concombre (*Cucumis sativus* L., CV Marketer), en chambres climatiques à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $70\% \pm 10\%$ d'humidité relative et sous une photopériode de 16L:8D. Aucune pression de sélection n'a été opérée depuis 1992 et les niveaux de sensibilité sont vérifiés par des tests biologiques deux fois par an. Des clones ont été effectués pour chaque population à partir d'un adulte aptère.

Tests biologiques

La toxicité par contact des insecticides a été déterminée sur les deux souches. Les produits utilisés, choisis pour leur application pratique ou leur structure chimique, sont des formulations commerciales fournies par les firmes. De petites boîtes en plastique (2,7 cm de diamètre) sont remplies d'agar-agar semi solide sur lequel sont placées de petites rondelles de feuilles de concombre, découpées au diamètre de la boîte. Quinze adultes aptères sont disposés sur chaque rondelle deux ou trois heures

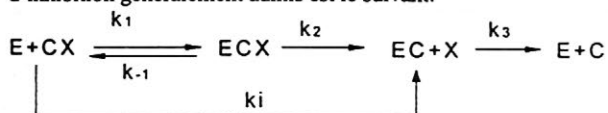
avant le traitement. Trois répétitions sont faites pour chaque dose et pour le contrôle. Pour chaque insecticide, cinq solutions aqueuses en concentrations logarithmiques sont pulvérisées à l'aide d'une tour (application de 4 mg de solution/cm²). Les témoins sont traités avec de l'eau distillée. Après 24 h, la mortalité est relevée sous loupe binoculaire. Le pourcentage de mortalité est corrigé par la formule d'Abbott et la CL₅₀ est calculée grâce au logiciel prévu à cet effet (GINER, 1993). Chaque test est répété trois fois et le coefficient de résistance (CR) est calculé par le rapport : CL₅₀ souche R/CL₅₀ souche S.

Détermination des constantes cinétiques

Les pucerons sont broyés dans du tampon phosphate (pH 7, 25 mM) froid. Les broyats sont centrifugés 7 min à 10000g, à 4°C. Le surnageant constitue la source d'enzyme. L'activité AChE est déterminée pour différentes concentrations en ASCh par la méthode d'Ellman (1961) : une quantité de 100 µl d'extrait est ajoutée à 900 µl de tampon phosphate contenant 10⁻⁵ M de DTNB et des concentrations croissantes d'ASCh. L'activité enzymatique est relevée après 5 min de réaction à 25°C, sur un spectrophotomètre Hitachi U1100 (412 nm), à 25°C. La linéarité de la réaction est suivie sur un micro-ordinateur équipé du logiciel correspondant (U1100 data manager). Les constantes cinétiques sont calculées par la représentation d'Edie-Hofstee.

Inhibition de l'AChE

Les insectes sont broyés dans du tampon phosphate (pH 7, 25 mM) froid contenant 0,1% de Triton X-100. Les broyats sont centrifugés 7 min. à 10000g, à 4°C. Le surnageant constitue la source d'enzyme. Les insecticides utilisés sont des produits techniques (pureté > 95%) et sont dilués dans l'acétone. Pour chaque souche et chaque produit, l'extrait enzymatique est incubé à 25 °C avec une concentration donnée d'insecticide et l'activité enzymatique restante est suivie au cours du temps: 100 µl sont prélevés et ajoutés à 900 µl de tampon phosphate contenant 1 mM d'ASCh et 10⁻⁵ M de DTNB. L'activité enzymatique est relevée après 5 min de réaction. L'activité maximale est l'activité AChE sans inhibiteur. Le blanc est déterminé par la DO donnée par l'AChE totalement inhibée par 10⁻³ M d'ésérine. Le k_i représente la capacité globale d'un insecticide à inhiber l'enzyme et le schéma d'inhibition généralement admis est le suivant:



Avec: CX= carbamate, X=groupe partant et C= groupe restant. Le schéma est aussi valable pour les organophosphorés. Si $\ln A/A_0 = k_i t$, alors, la régénération est négligeable (A =vitesse en présence de la concentration I en insecticide, A_0 = vitesse maximale, k_i = constante bimoléculaire, t =temps d'incubation de l'enzyme avec l'insecticide). Le k_i est calculé selon la méthode d'Aldridge et Reiner (1969).

RESULTATS ET DISCUSSION

Il existe une bonne corrélation entre les niveaux de résistance biologique et la sensibilité de l'AChE (Fig. 1), ce qui suggère que la modification de la cible est impliquée dans le mécanisme de résistance.

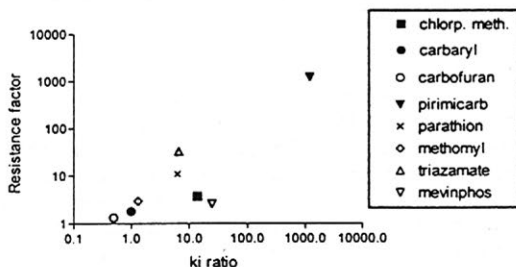


Fig. 1: Corrélation entre les coefficients de résistance *in vivo* ($CR = CL_{50} R / CL_{50} S$) et le rapport $ki \text{ AChE } S / ki \text{ AChE } R$

Correlation between resistance factor *in vivo* ($CR = CL_{50} R / CL_{50} S$) and the ratio $ki \text{ AChE } S / ki \text{ AChE } R$

L'absence de résistance croisée à des produits non anti-cholinestérasiques, ainsi que des expérimentations utilisant des synergistes et du pyrimicarbe radiomarqué (DELORME *et al.*) accréditent cette hypothèse. La constitution de clones à partir d'individus isolés et l'étude de la sensibilité de l'AChE au pyrimicarbe montre qu'il existe un seul allèle pour chaque population: un allèle codant pour une enzyme sensible et un allèle codant pour une enzyme résistante (Fig. 2). Aucun hétérozygote n'a été détecté. Ce résultat explique le fait que le niveau de sensibilité de chaque souche n'a pas évolué en quatre ans, en l'absence de toute pression de sélection.

La courbe de saturation montre une nette différence dans l'hydrolyse du substrat entre les deux souches: la représentation d'Eadie-Hofstee (Fig. 3) montre que le comportement des enzymes des deux souches n'est pas de type michaelien, puisqu'on peut voir deux droites pour chaque souche, tout comme l'AChE de drosophile (FOURNIER *et al.*, 1995). Il y a donc deux K_m apparents et deux V_m apparents pour chaque enzyme.

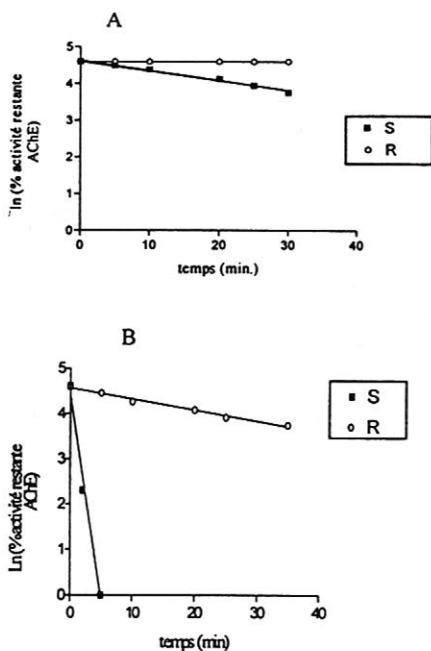


Fig. 2: évolution de l'activité AChE des clones S et R au cours d'une incubation avec (A) 10⁻⁷ M pyrimicarbe et (B) 10⁻⁴ M pyrimicarbe.
Evolution of the AChE activity of clones S and R during incubation with (A) 10⁻⁷ M pyrimicarbe and (B) 10⁻⁴ M pyrimicarbe.

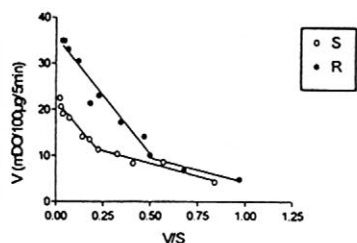


Fig. 3: Courbe Eadie-Hofstee de la dégradation du substrat (ASCh)
Eadie-Hofstee plots of the ASCh hydrolyse

Il semble que les deux K_m et la V_{m1} de la souche S soit les mêmes ($K_{m1}=11\mu M$, $K_{m2}=50\mu M$ et $V_{m1}=14mDO/100\mu g\text{ puc}/5\text{ min}$) que ceux de la souche R. Par contre, la V_{m2} est augmentée chez la souche R ($V_{m2S}=22mDO/100\mu g\text{ puc}/5\text{ min}$, et $V_{m2R}=35mDO/100\mu g\text{ puc}/5\text{ min}$). Si l'on considère que l'efficacité de l'enzyme est reflétée par le rapport V_m/K_m , alors on peut dire que l'enzyme de la souche R est plus efficace que celle de la souche S. Cette capacité d'hydrolyse du neurotransmetteur de l'enzyme R pourrait expliquer l'apparente absence de diminution de fitness de la souche R. Les modifications au sein de l'enzyme de la souche R qui engendrent une insensibilité aux insecticides entraîne donc un changement dans l'hydrolyse du substrat.

De plus, il apparaît que l'enzyme R est plus sensible que l'enzyme de référence à deux composés: le carbofuran et le bendiocarbe (Tableau I), qui sont des carbamates bicycliques non plans dans l'espace (Fig. 4).

Tableau I- k_i ($\pm$ erreur standard) correspondant à l'inhibition de l'AChE des deux souches par le carbofuran et le bendiocarbe

k_i ($\pm$ standard error) corresponding to inhibition of AChE from the two strains by carbofuran and bendiocarb.

Composé	k_i AChE S	k_i AChE R	ratio R/S
Carbofuran	$5,72 \times 10^5$ (1.17)	$1,21 \times 10^6$ (0.10)	2.11
Bendiocarbe	$7,22 \times 10^4$ (0.04)	$2,21 \times 10^5$ (0.05)	3.06

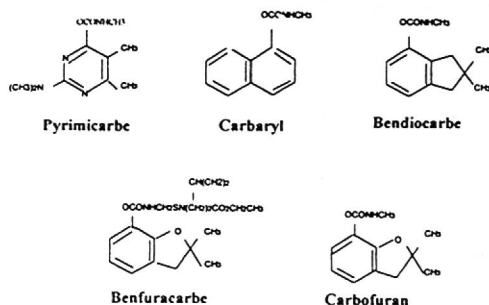


Fig. 4: formules chimiques de quelques carbamates comportant un cycle
Structures of carbamates with a cycle

On peut donc se demander si cette particularité est nécessaire et suffisante à une plus grande efficacité contre l'enzyme résistante. En effet, l'enzyme sensible présente une configuration de son site actif favorable à l'inhibition par les carbamates présentant un seul cycle, alors que celle de l'enzyme R, en raison des modifications présentes ne l'est pas. Par contre, il est possible que la structure spatiale des carbamates bicycliques non plans soit plus adaptée à la conformation tridimensionnelle du site de l'enzyme résistante. Il est à noter que le pyrimicarbe, composé pour lequel le CR est le plus grand, est une molécule aphicide sélective. Cette particularité en fait un insecticide utilisable en période de floraison, car non toxique sur les abeilles. Il apparaît que cette sélectivité est due, au moins en grande partie, à une plus grande efficacité sur l'AChE des pucerons. En effets, des tests au laboratoire sur *Drosophila melanogaster* et *Sitophilus granarius* montrent qu'il existe une différence de sensibilité de l'enzyme d'au moins 10 fois (Tableau II).

Tableau II- k_i ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$) correspondant à l'inhibition par le pyrimicarbe de quelques espèces d'insectes

k_i corresponding to pirimicarb for AChE from several insect species

Espèce	k_i pyrimicarbe ($\pm$ erreur standard)
<i>Dysaphis plantaginea</i>	2.00×10^5 (0.10)
<i>Aphis gossypii</i>	3.30×10^5 (0.20)
<i>Drosophila melanogaster</i>	3.06×10^4 (0.29)
<i>Sitophilus granarius</i>	8.10×10^3 (0.10)

Les perspectives de ce travail consistent à déterminer la séquence du gène de l'AChE, chez la souche S et la souche R de façon à pouvoir identifier les mutations responsables de la résistance. Cette dernière étant apparemment très limitée (trois produits principaux), on peut penser qu'il existe un nombre très restreint de mutations dans la séquence de la protéine (peut-être même une seule). La connaissance de la séquence en acides aminés de cette protéine pourra déboucher la modélisation du site actif à partir des connaissances issues de la cristallisation de l'enzyme de torpille (SUSSMAN *et al.*, 1991). Cette partie de la recherche pourra éventuellement amener à la modélisation de composés susceptibles de reverser la résistance. En effet, les résultats obtenus concernant la sensibilité supérieure de l'AChE R au carbofuran et au bendiocarbe sont encourageants et donnent une piste intéressante pour la modélisation de molécules plus actives contre les souches résistantes. La modélisation du site actif pourra également fournir des éléments d'explication sur la sélectivité moléculaire du pyrimicarbe et éventuellement contribuer à la conception de composés anti-résistants doublés d'une caractéristique sélective aphicide.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient G. Labonne pour leur avoir fourni les pucerons sensibles ainsi que les firmes pour avoir aimablement fourni les produits techniques et formulations commerciales.

BIBLIOGRAPHIE

ALDRIGE W.N. AND REINER E., 1969, Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorous compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate, *Biochem. J.* **115**, 147-162

DELORME R., AUGÉ D., BETHENOD M.T., AND VILLATTE F., 1996, Insecticide resistance in a strain of *Aphis gossypii*, *Pest. Sci.* *in press*

FOURNIER D., MATURANO M., GAGNOUX L., ZILIANI P., PERTUY C., PRALAVORIO M., BRIDE J.M., ELMARBOUH L., KLAEBE A. AND MASSON P., 1995, Insect acetylcholinesterase and resistance to insecticides, in « Enzymes of the Cholinesterase Family » (Quinn D.M. *et al.* Eds), Plenum Press, pp 149

FOURNIER D. AND MUTERO A., 1994, Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides, *Comp. Biochem. Physiol.* **108C**(1), 19-31

GINER M., Analyse de la dose létale 50, 1993, CIRAD-CA Atelier d'entomologie Appliquée, 149-155

LECLANT F. AND DEGUINE J.P., 1994, Aphids (Hemiptera : Aphididae), in *Insect Pests of Cotton II*. (Matthews and Tunstall Eds), pp 285

SUSSMAN J.L., HAREL M., FROLOW F., OEFNER C., GOLDMAN A., TOKER L. AND SILMAN I., 1991, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**, 872-878