

## Synthèse du projet MOSQUITO-ENV, ANR SEST 2007

### Titre du projet:

Interactions gènes-environnement et résistance aux insecticides chez les moustiques

### Partenaires du projet :

#### Partenaire 1 :

##### Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, UMR 5553 CNRS - Université de Grenoble).

Jean-Philippe DAVID, CR1 CNRS, porteur du projet ([jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr](mailto:jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr))

Stéphane REYNAUD, MCF Université de Grenoble

Laurence DESPRES, Prof Université de Grenoble

Alexia CHANDOR-PROUST Post-doctorante sur le projet

Rodolphe POUPARDIN, Doctorant

Muhammad Asam RIAZ, Doctorant, HEC Pakistan

Sylvie VEYRENC, Technicienne

Thierry GAUDE, Technicien

#### Partenaire 2 :

##### Laboratoire Protéines: Biochimie structurale et fonctionnelle (FRE 2852, UPMC)

Chantal DAUPHIN-VILLEMANT, CR1 CNRS ([chantal.dauphin-villemant@upmc.fr](mailto:chantal.dauphin-villemant@upmc.fr))

Emilie Guitard, Technicienne

### Principaux collaborateurs du projet :

Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC, UMR Université de Montpellier, IRD, CNRS). Dr. Vincent Corbel, Dr. Fabrice Chandre, Dr. Sebastien Marcombe.

Liverpool School of Tropical Medicine (Liverpool, Royaume Uni). Prof. Hilary Ranson, Dr. Clare Strode, Dr. Mark Paine.

Laboratoire Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés UMR INSA/ CNRS 5504 ; UMR INSA/INRA 792 Toulouse. Dr. Denis Pompon, Dr. Philippe Urban.

Pôle Rhône-Alpin de Bioinformatique (PRABI)

### Informations relatives au projet

Budget total du projet : 200 K€

Durée total du projet : 36 mois (janvier 2008- à janvier 2010)

Recrutement sur le projet : 1 post doctorant (18 mois)

Thèses en relation avec le projet : 2 thèses soutenues

Autres formations liés au projet : 5 mémoires de Master et 4 autres stages

Publications scientifiques en relation avec le projet : 10 articles publiés, 2 soumis.

## Contexte Scientifique et Objectifs du projet

Le contrôle des populations de moustiques représente aujourd'hui un problème sanitaire majeur, notamment dans les régions à forte prévalence de maladies vectorielles dangereuses telles que le paludisme, la dengue, la fièvre jaune, le chikungunya, le virus du Nil occidental ou bien encore la filariose.

Aujourd'hui, malgré l'essor des insecticides bactériologiques dans les pays riches, l'utilisation d'insecticides chimiques reste le principal moyen de lutte contre les vecteurs dans les pays où l'impact des moustiques sur la santé humaine est important et où l'efficacité du contrôle des moustiques conditionne le développement des populations humaines.

Or l'utilisation massive d'insecticides chimiques depuis les années 50 a favorisé l'apparition de phénomènes de résistance au sein des populations naturelles de moustiques, conduisant parfois à l'échec des programmes de contrôle des maladies qu'ils transmettent. Aujourd'hui le développement de nouvelles molécules insecticides utilisables en lutte vectorielle est largement insuffisant pour pallier les problèmes de résistance actuels. Ainsi, la gestion de la résistance aux insecticides utilisés pour le contrôle des moustiques devient un enjeu crucial dans certaines régions, notamment en Afrique et dans certains territoires Français d'outre-mer.

La résistance des insectes aux insecticides chimiques est un phénomène biologique d'adaptation étudié depuis de nombreuses années, aussi bien vis-à-vis des ravageurs de cultures que des insectes vecteurs de maladies. Bien que certains mécanismes de résistance soient aujourd'hui bien connus (par exemple des mutations de protéines cibles des insecticides), d'autres sont encore mal compris comme la résistance liée à la biodégradation des insecticides par l'intermédiaire d'enzymes de détoxification (résistance métabolique). De même, l'influence des facteurs environnementaux tels que la présence de polluants dans l'apparition de résistance aux insecticides a déjà été suspectée mais aucune étude n'avait encore abordé ce sujet de façon significative. Ainsi, l'hypothèse initiale du projet reposait sur le fait que certains polluants sont susceptibles d'interagir avec les mécanismes métaboliques conférant une résistance aux insecticides.

Dans ce contexte, le projet ANR « Mosquito-Env » du programme SEST 2007 visait à étudier les relations entre la capacité des moustiques à tolérer/résister aux insecticides chimiques et la présence de polluants dans leur milieu.

Bien que très fondamental, ce projet de recherche visait à apporter de nouveaux éléments sur le l'impact de l'environnement chimique où se développent les moustiques dans les phénomènes de résistance aux insecticides.

Les objectifs du projet étaient définis comme suit :

- 1) Etudier l'effet à court terme (une génération) des polluants sur la capacité des moustiques à tolérer les insecticides et identifier les mécanismes moléculaires associés.
- 2) Etudier l'effet à long terme (plusieurs générations) des polluants sur la capacité des moustiques à résister aux insecticides et identifier les mécanismes moléculaires associés.
- 3) Développer de nouveaux outils permettant d'étudier les mécanismes de résistance métabolique des moustiques aux insecticides et leurs interactions avec l'environnement.

## Approches et méthodes utilisées

Devant la complexité et l'originalité de la thématique abordée par le projet, ces questions biologiques ont d'abord été abordées au laboratoire où les conditions environnementales peuvent être strictement contrôlées. Les résultats obtenus ont ensuite été suivies par d'autres études menées sur le terrain, notamment en Martinique en collaboration avec l'unité MIVEGEC de Montpellier. En effet, les quelques études sur ce sujet réalisées uniquement sur le terrain ont souvent montré la difficulté d'appréhender ces phénomènes biologiques *in natura* du fait des nombreux facteurs confondants à prendre en compte et des variations biologiques inhérentes aux études de terrain.

Le moustique *Aedes aegypti*, vecteur de la dengue et de la fièvre jaune, présent en zones tropicales urbaines a été majoritairement utilisé comme modèle biologique. Cette espèce est facile à maintenir au Laboratoire et son génome a été séquencé en 2007, permettant l'utilisation d'approches moléculaires de pointe telles que les puces à ADN ou bien le séquençage à très haut débit. Nous avons également choisi de focaliser notre étude sur les stades aquatiques (larves), les plus propices à une exposition aux polluants d'origine anthropique.

Concernant les polluants étudiés, nous avons focalisé notre étude sur le rôle des xénobiotiques d'origine agricole (pesticides, métaux, etc...) ou urbaine (HAPs) avec des doses sub-létales et susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement. Ce choix a été motivé par la fréquente localisation des gîtes à moustique en bordures de zones agricoles (où l'usage de composés agrochimiques est intensif) et urbaines polluées.

Concernant les mécanismes de résistance aux insecticides, nous avons focalisé notre étude sur les mécanismes métaboliques (biotransformation des insecticides) car les enzymes impliquées dans ces processus sont connues pour réagir à la présence de polluants présents dans l'environnement (induction/répression de leur expression) et sont donc particulièrement susceptibles d'être affectées par l'environnement chimique dans lequel se développent les moustiques.

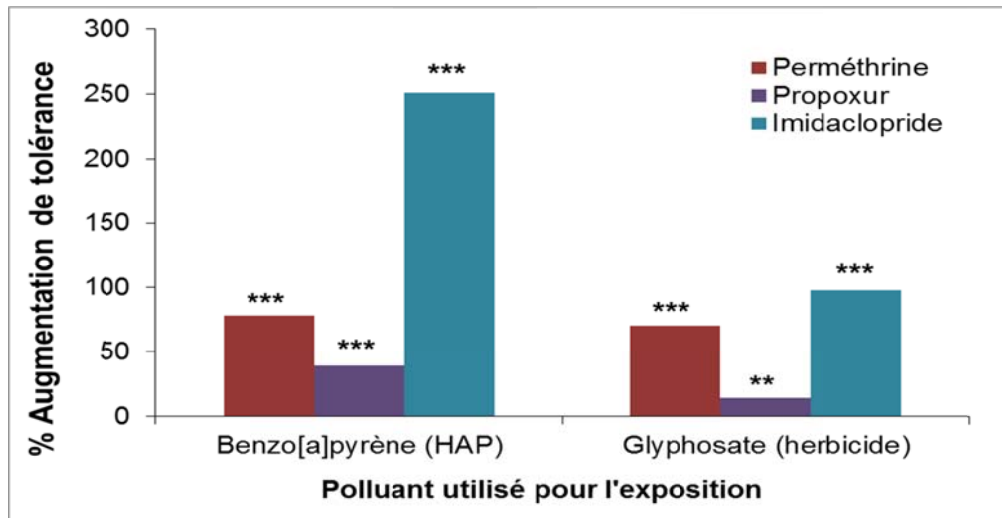
Les expérimentations réalisées au laboratoire sur les moustiques avec les polluants peuvent être regroupées en deux grands types :

- 1) des expositions à court terme (sur une seule génération) de quelques jours à des doses sub-létales de polluants.
- 2) des expositions à plus long terme (sur plusieurs générations) à des doses sub-létales de polluants, couplées ou non avec des traitements insecticides induisant une sélection de la résistance héritée aux insecticides.

A la suite de ces différentes expositions des moustiques aux polluants et insecticides, leur tolérance vis-à-vis des principaux types d'insecticides chimiques a été évaluée par des bio-essais. Les mécanismes de réponses aux polluants et de résistance aux insecticides ont ensuite été étudiés au niveau moléculaire par l'intermédiaire de techniques de transcriptomique (puces à ADN, séquençage très haut débit, RT-qPCR, ...) et de biologie moléculaire fonctionnelle (ARN interférent, expression d'enzymes de détoxification en système hétérologue, métabolisme des insecticides *in vitro*, ...).

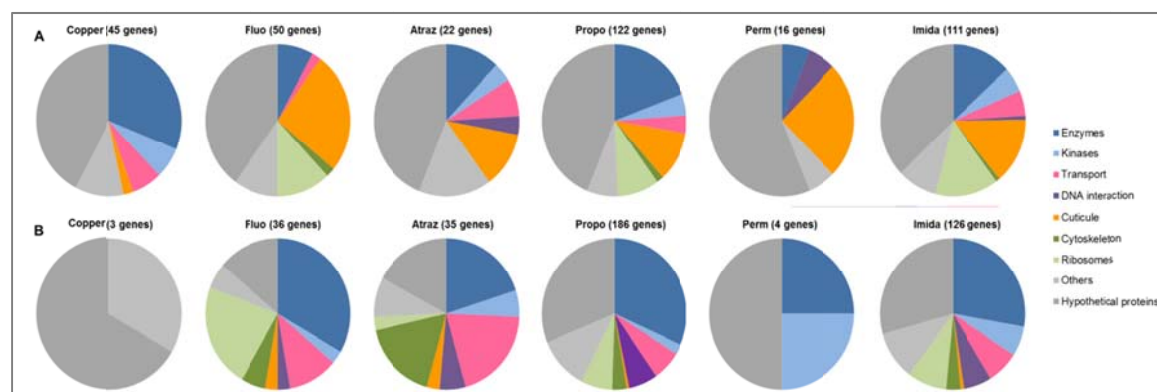
## Principaux résultats obtenus

Les résultats obtenus au cours de ce projet montrent qu'une exposition de larves de moustiques pendant 24 à 72h à de faibles doses de certains polluants (herbicides, métaux lourds, HAPs...) peut induire une augmentation significative (parfois plus de 100%) de leur tolérance aux insecticides chimiques (figure 1).



**Figure 1.** Exemple d'augmentation de tolérance aux insecticides obtenu après exposition de larves de moustiques à des doses sub-létales de deux polluants pendant 72h. Selon Riaz et al. 2009.

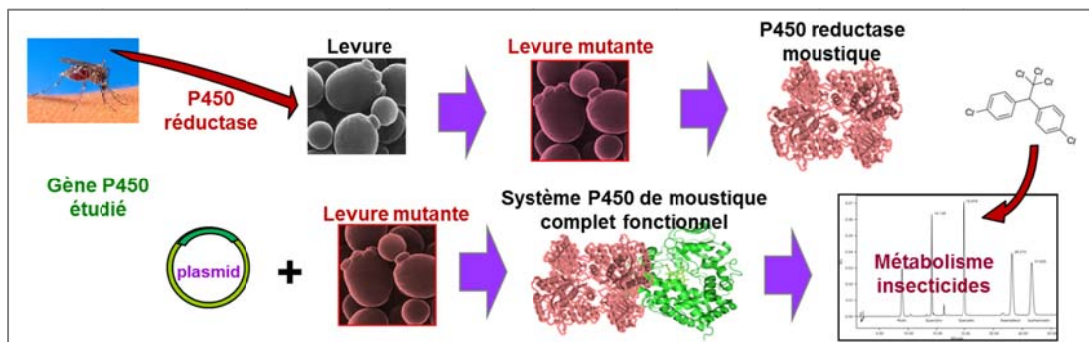
L'utilisation de puces à ADN et du séquençage à très haut débit pour étudier l'expression des gènes nous a permis de montrer que les mécanismes moléculaires impliqués reposent sur des changements du métabolisme des moustiques en réponse à l'exposition aux polluants avec notamment un rôle probable des enzymes impliquées dans la biodégradation des insecticides (monoxygénases à cytochrome P450, glutathion S-transférases, ...). En effet, certains gènes codant pour ces enzymes montrent des réponses croisées aux polluants et aux insecticides chimiques. De manière plus globale, d'autres gènes impliqués dans le métabolisme (transporteurs, enzymes de la chaîne respiratoire) ou bien dans la formation de tissus impliqués dans les interactions avec le milieu (protéines cuticulaires, mécanismes d'excrétion) sont aussi affectés.



**Figure 2.** Représentation des catégories fonctionnelles représentées par les gènes dont l'expression est affectée par une exposition aux polluants ou aux insecticides. A : gènes sur-exprimés, B : gènes sous-exprimés. Le type de composé utilisé pour l'exposition et le nombre de gènes affectés sont indiqués. Selon David et al. 2010.

Les expérimentations effectuées sur plusieurs générations montrent qu'une exposition répétée de populations de moustiques à des polluants influence la sélection des gènes de résistance par les insecticides. Ainsi, selon leur exposition ou non à certains polluants, des moustiques traités pendant plusieurs générations avec un insecticide chimique ne montrent pas les mêmes profils de résistance et d'expression génique. Des variations marquées sont observées pour certaines enzymes de détoxification et certaines voies métaboliques. Ces résultats confirment l'effet à long terme des polluants sur les mécanismes d'adaptation des moustiques aux insecticides chimiques. Au niveau fondamental, ces résultats montrent que les facteurs environnementaux capables d'induire des variations phénotypiques (tels que présence de polluants) peuvent affecter les mécanismes de la sélection « naturelle » liés à l'usage des insecticides.

La validation fonctionnelle du rôle des gènes candidats identifiés dans la résistance aux insecticides et les interactions avec les polluants a été entreprise dans la dernière phase du projet. Elle s'effectue grâce à différentes approches telles que l'interférence par ARN double brin (RNAi) ou bien l'expression d'enzymes de détoxification de moustique en système hétérologue suivi par l'étude *in vitro* de leur capacité à métaboliser les insecticides. Ce dernier point nous a permis de développer un système original d'expression hétérologue en levure permettant d'exprimer les cytochromes P450 de moustiques (enzymes membranaires microsomales) conjointement avec leur co-facteur obligatoire, la cytochrome P450 reductase. Ce nouveau système d'expression permet aujourd'hui une validation fonctionnelle rapide des cytochromes P450 potentiellement impliqués dans la biodégradation des insecticides et les interactions avec les polluants chez les moustiques.



**Figure 3.** Représentation schématique du système d'expression hétérologue développé au cours du projet, permettant l'analyse rapide de la capacité de certains P450s de moustiques à dégrader les insecticides chimiques.

Les études menées au laboratoire ont été complétées par des études en conditions naturelles avec notamment le développement d'un partenariat avec l'unité MIVEGEC de Montpellier afin d'étudier la résistance des moustiques à la Martinique et d'identifier l'impact des polluants locaux (e.g. chloredécone, lindane...) sur la résistance. Un partenariat de recherche a aussi été initié avec l'université de Monastir pour étudier ces phénomènes chez les moustiques du genre *Culex* en Tunisie.

De manière globale, le projet MOSQUITO-ENV a permis de révéler l'impact de la pollution des écosystèmes sur la capacité des moustiques à s'adapter aux insecticides. Bien que de nombreux travaux restent à effectuer pour caractériser les mécanismes associés à ce phénomène, ce projet ouvre de nouvelles perspectives de recherche dans le domaine de la lutte contre les vecteurs et de la résistance aux insecticides.

## Retombées scientifiques et appliquées du projet

Le projet MOSQUITO-ENV s'est intéressé à des phénomènes biologiques encore peu étudiés car ils sont la conséquence de variations environnementales subtiles, mais indéniablement impliquées dans la capacité d'adaptation des insectes aux insecticides.

La thématique abordée et les approches utilisées au cours de ce projet se situent à la pointe de l'écotoxicologie actuelle et cadrent parfaitement avec les orientations suggérées par l'INEE au sein de cette discipline. L'originalité des questions posées et des expérimentations effectuées a permis une très bonne valorisation du projet en termes de publications scientifiques (voir liste ci-dessous) et de collaborations. Les résultats obtenus au cours du projet ont suscité un intérêt marqué de la communauté scientifique et ouvrent aujourd'hui de nouvelles voies de recherche.

Les développements méthodologiques effectués au cours du projet (puces à aDN, transcriptomique par séquençage à très haut débit..) ont engendré des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes de résistance aux insecticides chez les moustiques. Ce projet a aussi engendré des développements techniques ayant des retombées industrielles possibles. En effet, notre nouveau système de production *in vitro* d'enzyme de détoxification de moustiques en levure représente un outil d'intérêt pour le développement de nouvelles molécules insecticides ou bien d'inhibiteurs spécifiques des enzymes impliquées dans la résistance (« résistance blockers »). La poursuite de ce projet permettra d'étudier plus en détail l'adaptation des moustiques aux polluants et aux insecticides chimiques ainsi que d'optimiser les méthodes de lutte contre les moustiques vecteurs de maladies.

Enfin, le projet MOSQUITO-ENV a permis au LECA Grenoble et à ses partenaires de s'insérer de façon durable dans le réseau Européen des laboratoires de recherche travaillant sur les insectes vecteurs de maladies et la résistance aux insecticides tout en apportant une originalité concernant les interactions biologiques entre insecticides et environnement.

## Publications scientifiques générées par le projet

Marcombe S, Blanc Mathieu R, Pocquet N, Riaz MA, Poupardin R, Sélior S, Darriet F, Reynaud S, Yébakima A, Corbel V, David JP, Chandre F (2011) Insecticide Resistance in the Dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique (French West Indies): Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. ***Plos One*** (sous presse)

JP David, E Coissac, C Melodelima, MA Riaz, R Poupardin, A Chandor-Proust, S Reynaud (2010) Transcriptome-wide analysis of response to insecticides and pollutants in the dengue mosquito using next-generation sequencing technology. ***BMC Genomics* 11**: 216.

R Poupardin, M A Riaz, J Vontas, JP David, S Reynaud (2010) Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. ***Insect Molecular Biology* 2**: 185-93.

- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Strode C, Yebakima A, Ranson H, Corbel V and 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.
- Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H and 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. ***Aquatic toxicology* 93**: 61-69.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J and David JP (2008) Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. ***Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38**: 540-551.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Strode C, Yebakima A, Ranson H, David JP and Corbel V (2008) Identification of metabolic insecticide resistance genes in *Aedes aegypti* from Martinique (French West Indies): from genotypes to phenotypes. ***American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79**: 232.
- McLaughlin LA, Niazi U, Bibby J, David JP, Vontas J, Hemingway J, Ranson H, Sutcliffe MJ and Paine MJ (2008) Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. ***Insect Molecular Biology* 17**: 125-135.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne S, Hemingway J, Black WC and Ranson H (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. ***Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38**: 113-123.
- Després L, David JP and Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. ***Trends in Ecology and Evolution* 22**: 298-307.
- Riaz MA, Chandor-Proust A, Poupardin R, Jones CM., Ranson H, David JP, Reynaud S (2011) Identification of molecular mechanisms associated with resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. (*soumis*)
- Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandor-Proust A, Reynaud S, David JP (2011) Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. (*en révision*).