

Caractérisation de la résistance au Sénégal d'*Helicoverpa armigera* Hübner (Lépidoptère, Noctuidae) par bioessai et méthodes moléculaires¹

C. MOREIRA², B. SCHIFFERS² & E. HAUBRUGE³
Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux

Résumé

Un vial-test de détection de la résistance à la cyperméthrine d'*Helicoverpa armigera* a été vulgarisé (Programme PR-PRAO) en Afrique de l'Ouest (flacon en verre imprégné). Cette étude montre qu'à des températures de 30°C et 54°C, 4 pyréthrinoides et 2 organophosphorés se dégradent rapidement dans les flacons en verre. Un "kit" est présenté sous forme d'un papier filtre traité enveloppé dans une feuille d'aluminium. Il possède une bien meilleure stabilité au stockage (sur 50 jours). Des tests moléculaires, réalisés sur une souche d'*H. armigera* issue du Sénégal, révèlent deux mutations (la sérine remplacée par l'acide glutamique et l'acide aspartique par la valine) au niveau du gène codant pour le canal sodium voltage dépendant, cible principale des pyréthrinoides.

Mots clés: *Helicoverpa armigera*, Sénégal, résistance, pyréthrinoides, mutation.

Introduction

Des études sur l'évolution de la sensibilité aux insecticides des ravageurs du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.), et en particulier d'*Helicoverpa armigera* Hübner, ont été menées en Australie, Thaïlande, Inde, Pakistan, Turquie, Chine, Espagne, Côte d'Ivoire, Bénin, Togo, Mali, Burkina Faso. VASSAL *et al.* (1997) et VODOUNNON (1997) ont observé une réduction des valeurs des pentes de régression et une augmentation sensible de la DL₅₀ de la cyperméthrine pour *H. armigera*. Dans le cadre du Programme PR-PRAO, les résultats des bioessais conduits dans la plupart des pays d'Afrique de l'Ouest au moyen de tubes imprégnés de cyperméthrine semblent indiquer la présence de souches résistantes à cette molécule, et des tests biochimiques réalisés sur *H. armigera* révèlent aussi une résistance à une dizaine de molécules de la famille des pyréthrinoides et à trois organophosphorés (BAGAYOGO *et al.*,

¹ Texte présenté à la journée d'étude de l'AERZAP "Bilan phytosanitaire de l'année culturale 2001-2002", 11 décembre 2002

² Unité de Chimie analytique et Phytopharmacie (Prof. A. Copin), Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgique

³ Unité de Zoologie générale et appliquée (Prof. Ch. Gaspar), Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgique

2001). Cependant, la littérature ne renseigne aucune validation du bioessai en vial-test par analyse chimique (mesure de la stabilité), et nous avons pu observer sur le terrain que les chercheurs conservaient les flacons tests durant de longues périodes dans des conditions de température élevée; on peut donc légitimement suspecter une dégradation de la cyperméthrine qui, si elle était confirmée, remettrait en question les résultats enregistrés dans ces conditions.

Une étude a donc été conduite pour mesurer la stabilité de 4 insecticides pyréthriinoïdes et 2 organophosphorés (les plus utilisés sur coton) à 2 températures (30°C et 54°C, température de référence du CIPAC pour la stabilité des composés) d'une part sur flacons en verre, d'autre part sur papiers filtres. Par ailleurs, il était intéressant de détecter chez *H. armigera* l'existence éventuelle de mutations au niveau du gène codant pour le canal sodium voltage dépendant, en comparant le matériel génétique extrait d'une souche sensible de référence (BK 77) à celui d'une souche collectée au Sénégal. L'objectif est de pouvoir proposer, sous la forme d'un "kit" fiable, simple et utilisable sur le terrain par les producteurs de coton et les firmes phytopharmaceutiques, une méthode d'estimation rapide de la résistance de *H. armigera* par bioessai, couplé en cas de réponse positive, à un test moléculaire permettant une détection plus précise de la résistance potentielle au champ.

Matériel et méthode

ANALYSES HPLC

Une analyse par HPLC des insecticides (deltaméthrine, cyperméthrine, lambda-cyhalothrine, cyfluthrine, triazophos, profénofos) a été effectuée afin de s'assurer du titre des matières actives techniques utilisées. Les méthodes de dépôt et de récupération des insecticides sur les flacons en verre et les papiers filtres ont été vérifiées. Toutes les analyses sont réalisées sur un appareil Beckman system Gold pourvu d'un détecteur UV, d'un injecteur automatique Beckman 507 et du logiciel d'acquisition Gold 8.01. La colonne utilisée est de type MN nucléosil 100-5 C18 (125 x 40 mm) avec une boucle d'injection de 20 µl. L'éluant (1 ml/min) est un mélange acétonitrile/acide phosphorique (CH₃CN/H₃PO₄) 70/30 v/v. Une quantité définie de matière active, mise en solution dans de l'acétone technique, est déposée (environ 30 µg pour les pyréthriinoïdes et 150 µg pour les organo-phosphorés) le long des parois des flacons en verre et sur des papiers filtres MN615 (6 cm); après évaporation du solvant, ils sont respectivement fermés ou enveloppés dans une feuille de papier aluminium et stockés en étuve contrôlée (à 30°C et à 54°C) pendant 50 jours. Une extraction par macération dans l'acétonitrile et un dosage par HPLC sont effectués au moment du dépôt (J0) et tous les 10

jours afin de mesurer l'évolution du dépôt de matière active suivant la nature du support et la température.

TESTS MOLÉCULAIRES ET BIOESSAIS

La souche sensible a été obtenue auprès du CIRAD de Montpellier (souche BK 77). La souche sénégalaise a été collectée dans la région de Saint-Louis. La méthode de caractérisation génétique comprend 5 étapes: (1) extraction des ARNs totaux des 2 souches par passages successifs du broyat dans différents solvants fournis dans le kit d'extraction "RNeasy Mini Kit" (Quiagen); (2) synthèse d'ADN complémentaire (ADN-c) grâce au protocole fourni avec le kit de synthèse de DNA "RT-for-PCR" (Clontech Laboratories); (3) amplification par PCR du fragment d'ADN (gène codant pour le canal sodium voltage dépendant) à l'aide d'amorces "para" (f et r) (nombre de cycles et leurs températures selon HEAD *et al.* (1998) et PARK & TAYLOR (1997)). Le premier type d'amorce, *para* (forward et reverse), est construit sur base de régions conservées entre d'une part, le gène du canal sodium chez *Heliothis* homologue du gène *para* de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et d'autre part, le gène *para* codant pour le canal sodium chez la drosophile (HEAD *et al.*, 1998). La PCR est réalisée à l'aide d'un kit "Ready-to-Go" (Amersham Pharmacia Biotech). Après migration des fragments d'ADN déposés sur le gel d'agarose sont visualisés sous UV, extraits du gel et clonés (cellules d'*E. coli*, vecteur pCR[®]4-TOPO[®]); (4) séquençage du fragment d'ADN; (5) comparaison des séquences de la souche sensible (BK77) et de la souche du Sénégal.

Résultats

ANALYSE DES MATIÈRES ACTIVES TECHNIQUES ET RÉCUPÉRATION DES DÉPÔTS

Le Tableau I reprend les équations droites de régression obtenues en HPLC (tous les $R^2 \geq 0,999$). Le titre minimal des matières actives techniques employées et les pourcentages de récupération des dépôts sur verre et sur papier filtre sont présentés au Tableau II.

TABLEAU I
Equations et coefficients de détermination des droites de régression
des différentes matières actives (avec Y = surfaces,
et x = concentration en $\mu\text{g/ml}$)
*Equations of regression curves and determination coefficients
for each active ingredient (where Y = surfaces,
and x = concentration in $\mu\text{g/ml}$)*

| Matières actives | Equation des droites de régression | Coefficients de détermination (R ²) |
|-------------------------|------------------------------------|---|
| Cyperméthrine | $Y = 1,4751 \cdot x - 0,0285$ | 0,9999 |
| Cyfluthrine | $Y = 1,3529 \cdot x - 0,0353$ | 0,9999 |
| λ -Cyhalothrine | $Y = 2,6676 \cdot x - 0,4477$ | 0,9998 |
| Deltaméthrine | $Y = 1264 \cdot x - 0,8999$ | 0,9989 |
| Triazophos | $Y = 0,8343 \cdot x - 0,0169$ | 0,9999 |
| Profénofos | $Y = 1,0788 \cdot x - 0,2681$ | 0,9998 |

TABLEAU II
Titre des 6 matières actives techniques et taux de récupération
sur les deux supports employés (verre et papier filtre)
*Concentration of the active ingredient in the 6 technical substances
and percentage of recovery (from glass vials and filter papers)*

| Matières actives techniques | Teneur minimale | Récupération sur verre | Récupération sur papier filtre |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------------|
| Cyperméthrine | 92,0% | 99,7% | 108,2% |
| Cyfluthrine | 92,0% | 90,5% | 92,9% |
| Deltaméthrine | 98,0% | 96,3% | 102,1% |
| λ -Cyhalothrine | 97,2% | 99,1% | 103,0% |
| Triazophos | 80,0% | 97,6% | 99,7% |
| Profénofos | 91,6% | 100,1% | 100,1% |

STABILITÉ AU STOCKAGE

Les tableaux III et IV reprennent les résultats de l'évolution du dépôt des différents insecticides en fonction du temps (de 0 à 50 jours), sur base des analyses des dépôts extraits quantitativement des flacons en verre et des papiers filtres déposés dans les étuves ventilées (à 30°C et à 54°C). Les travaux précédents s'intéressant particulièrement à la cyperméthrine (vials-tests distribués en Afrique de l'Ouest, dans le cadre du PR-PRAO), on présentera en graphiques l'évolution de cette molécule dans les flacons en verre scellés et sur les papiers filtres (Figures 1 et 2).

TABLEAU III

Evolution des dépôts d'insecticides (en $\mu\text{g/ml}$) dans les flacons en verre de 0
(dépôt initial mesuré) à 50 jours (moyenne, écart-type, 4 répétitions)
*Evolution of insecticides ($\mu\text{g/ml}$) on glass vial tests between day 0 (initial
deposit extracted) and day 50 (average, 4 repetitions)*

| Insecticides | Temp. | 0 j | 10 j | 20 j | 30 j | 40 j | 50 j |
|-------------------------|-------|--------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Cypermethrine | 30°C | 32,05 | 30,30 $\pm 1,40$ | 27,45 $\pm 2,93$ | 28,55 $\pm 0,52$ | 26,06 $\pm 1,73$ | 26,94 $\pm 0,95$ |
| | 54°C | 32,05 | 30,26 $\pm 1,38$ | 22,78 $\pm 3,35$ | 20,31 $\pm 2,75$ | 15,91 $\pm 5,48$ | 14,67 $\pm 1,84$ |
| Cyfluthrine | 30°C | 30,24 | 31,14 $\pm 1,52$ | 29,33 $\pm 1,37$ | 27,70 $\pm 1,95$ | 21,11 $\pm 1,63$ | 23,30 $\pm 12,24$ |
| | 54°C | 30,24 | 16,56 $\pm 1,09$ | 18,62 $\pm 4,42$ | 11,30 $\pm 2,32$ | 12,88 $\pm 1,48$ | 12,24 $\pm 1,60$ |
| Deltamethrine | 30°C | 28,81 | 29,20 $\pm 2,14$ | 27,55 $\pm 3,21$ | 27,48 $\pm 1,86$ | 29,43 $\pm 2,90$ | 28,15 $\pm 3,98$ |
| | 54°C | 28,81 | 14,99 $\pm 2,26$ | 26,51 $\pm 4,22$ | 24,97 $\pm 5,22$ | 21,11 $\pm 2,54$ | 18,69 $\pm 1,56$ |
| λ -Cyhalothrine | 30°C | 28,86 | 27,13 $\pm 2,32$ | 24,89 $\pm 2,43$ | 18,63 $\pm 1,94$ | 17,57 $\pm 4,35$ | 15,71 $\pm 3,00$ |
| | 54°C | 28,86 | 11,50 $\pm 3,21$ | 8,72 $\pm 5,56$ | 2,68 $\pm 0,89$ | 2,23 $\pm 1,13$ | 2,51 $\pm 0,95$ |
| Triazophos | 30°C | 144,50 | 132,34 $\pm 9,68$ | 136,33 $\pm 7,72$ | 128,00 $\pm 0,62$ | 124,61 $\pm 1,61$ | 124,10 $\pm 3,33$ |
| | 54°C | 150,19 | 95,45 $\pm 10,09$ | 42,98 $\pm 9,02$ | 11,10 $\pm 4,61$ | 12,77 $\pm 4,51$ | 6,83 $\pm 1,07$ |
| Profénofos | 30°C | 151,88 | 118,54 $\pm 13,34$ | 80,36 $\pm 17,61$ | 47,98 $\pm 13,76$ | 34,72 $\pm 10,55$ | 31,81 $\pm 2,88$ |
| | 54°C | 151,88 | 7,14 $\pm 4,02$ | 3,96 $\pm 1,12$ | 7,97 $\pm 1,57$ | 4,64 $\pm 1,06$ | 2,65 $\pm 1,80$ |

TABLEAU IV

Evolution des dépôts d'insecticides (en $\mu\text{g/ml}$) sur les papiers filtres de 0
(dépôt initial mesuré) à 50 jours (moyenne, 4 répétitions)
*Evolution of insecticides ($\mu\text{g/ml}$) on filter papers between day 0 (initial de-
posit extracted) and day 50 (average, 4 repetitions)*

| Insecticides | Temp. | 0 j | 10 j | 20 j | 30 j | 40 j | 50 j |
|-------------------------|-------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Cyperméthrine | 30°C | 27,82 | 28,26 $\pm 1,87$ | 24,95 $\pm 2,49$ | 27,70 $\pm 4,83$ | 29,01 $\pm 4,27$ | 28,11 $\pm 3,55$ |
| | 54°C | 27,82 | 20,93 $\pm 3,02$ | 20,35 $\pm 2,88$ | 26,24 $\pm 2,65$ | 23,94 $\pm 1,89$ | 24,74 $\pm 2,80$ |
| Cyfluthrine | 30°C | 29,75 | 32,27 $\pm 1,52$ | 27,84 $\pm 0,94$ | 31,03 $\pm 0,97$ | 29,95 $\pm 0,72$ | 30,28 $\pm 2,67$ |
| | 54°C | 29,75 | 27,47 $\pm 0,96$ | 27,84 $\pm 0,30$ | 26,20 $\pm 0,69$ | 26,68 $\pm 0,75$ | 23,98 $\pm 0,92$ |
| Deltaméthrine | 30°C | 29,63 | 27,01 $\pm 1,75$ | 29,25 $\pm 2,55$ | 27,95 $\pm 2,71$ | 27,65 $\pm 1,20$ | 29,50 $\pm 1,22$ |
| | 54°C | 29,63 | 25,61 $\pm 1,88$ | 27,16 $\pm 3,78$ | 26,45 $\pm 0,37$ | 26,59 $\pm 1,35$ | 27,93 $\pm 1,22$ |
| λ -Cyhalothrine | 30°C | 26,59 | 29,23 $\pm 0,51$ | 27,43 $\pm 1,07$ | 28,79 $\pm 0,62$ | 28,61 $\pm 1,45$ | 27,89 $\pm 0,66$ |
| | 54°C | 26,59 | 26,96 $\pm 1,66$ | 26,02 $\pm 1,30$ | 26,54 $\pm 1,23$ | 26,46 $\pm 0,57$ | 24,39 $\pm 2,04$ |
| Triazophos | 30°C | 150,19 | 145,68 $\pm 2,58$ | 140,09 $\pm 1,08$ | 137,47 $\pm 2,81$ | 133,81 $\pm 0,92$ | 134,86 |
| | 54°C | 150,19 | 117,17 $\pm 5,97$ | 97,75 $\pm 4,12$ | 80,14 $\pm 8,45$ | 65,92 $\pm 8,75$ | 57,55 $\pm 3,66$ |
| Profénofos | 30°C | 140,16 | 154,25 $\pm 1,73$ | 150,51 $\pm 3,62$ | 140,85 $\pm 1,24$ | 135,40 $\pm 2,97$ | 134,57 $\pm 3,77$ |
| | 54°C | 140,16 | 123,18 $\pm 3,51$ | 104,31 $\pm 2,26$ | 88,24 $\pm 3,17$ | 80,37 $\pm 3,58$ | 74,24 $\pm 1,36$ |

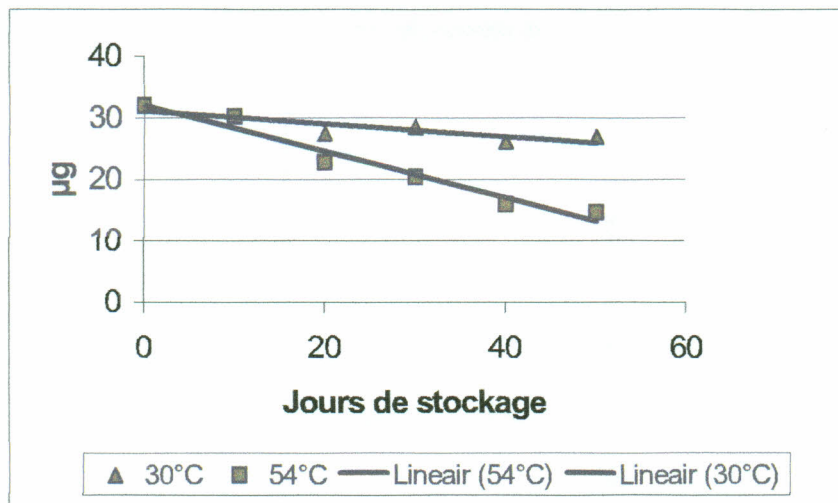


Figure 1: Evolution du dépôt de cyperméthrine sur flacons en verre à 30°C et à 54°C entre 0 et 50 jours.

Degradation of cypermethrin applied on glass vials stored at 30°C and 54°C for 50 days.

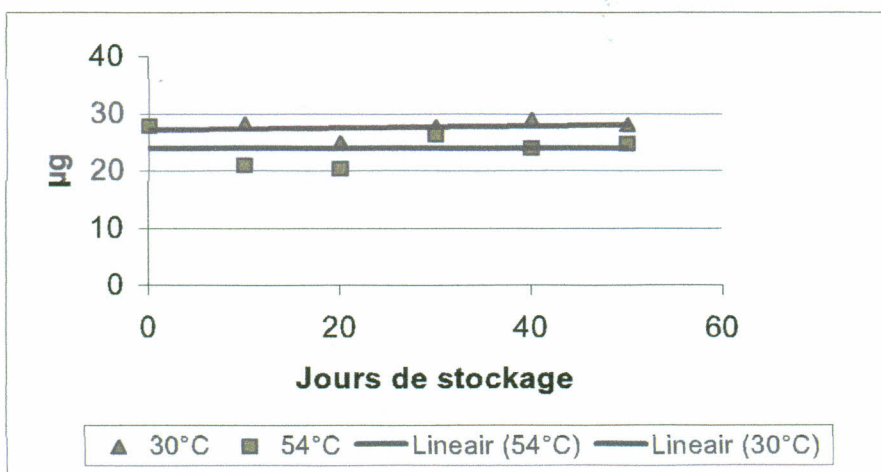


Figure 2: Evolution du dépôt de cyperméthrine sur papiers filtres à 30°C et à 54°C entre 0 et 50 jours.

Degradation of cypermethrin applied on filter papers stored at 30°C and 54°C for 50 days.

CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE D'*H. ARMIGERA* ISSUE DU SÉNÉGAL

Après extraction des ARNs totaux de la souche BK77 de Montpellier (sensible) et de la souche sénégalaise et la synthèse d'ADN complémentaire, l'amplification à l'aide d'amorce du gène codant pour le canal sodium voltage dépendant, principale cible des pyréthriinoïdes, permet d'obtenir un fragment d'environ 778 bp. Le clonage a permis d'obtenir une quantité suffisante de matériel qui a été séquencé. Le séquençage révèle un fragment de 778 bp ayant une homologie de 88 % avec le gène *para* codant pour une sous-unité du canal sodium homologue chez la drosophile *Drosophila melanogaster*. Deux mutations ont été détectées chez la souche sénégalaise: une sérine (S) est remplacée par un acide glutamique (E) et un acide aspartique (D) par une valine (V) (Figure 3).

| | | |
|-----------------|---|-----|
| m32078_aa_seq |YMYLYF | 6 |
| senegal_aa_seq |YMYLYF | 6 |
| sensible_aa_seq |YMYLYF | 40 |
| m32078_aa_seq | VFFIIFGSFFTLNLFIVGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMT | 46 |
| senegal_aa_seq | VFFIIFGSFFTLNLFIVGVIIDNFNEQKKKAGG E LEMFMT | 46 |
| sensible_aa_seq | VFFIIFGSFFTLNLFIVGVIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMT | 80 |
| m32078_aa_seq | DQKKYYSAMKKMGSKKPLKAI PRPRWRPQAI VFEIVTDGS | 86 |
| senegal_aa_seq | DQKKYYSAMKKMGSKK..... | 62 |
| sensible_aa_seq | DQKKYYSAMKKMGSKK..... | 96 |
| m32078_aa_seq | KKPLKAI PRPRWRPQAI VFEIVTDKKFDIIIMLFIGLNMF | 126 |
| senegal_aa_seq | ..PLKAI PRPRWRPQAI VFEIVTDKKFV I IIMLFIGLNMF | 100 |
| sensible_aa_seq | ..PLKAI PRPRWRPQAI VFEIVTDKKFDIIIMLFIGLNMF | 134 |

Figure 3: Alignement des séquences en acides aminés de la protéine canal sodium de *D. melanogaster* (m32078), de la souche d'*H. armigera* sensible et de la souche issue du Sénégal.

Alignment of the amino acid sequences for the sodium channel protein of D. melanogaster (m32078), of the sensitive strain of H. armigera and of the strain collected in Senegal.

Discussion

Les résultats indiquent clairement une décroissance généralement rapide et importante des dépôts d'insecticide sur les parois des flacons en verre en fonction du temps. Cette décroissance est d'autant plus rapide que la température est élevée. La dégradation est beaucoup plus remarquable pour les organophosphorés, connus de façon générale pour leur instabilité au stockage à température élevée, que pour les pyréthriinoïdes. Seule la deltaméthrine apparaît relativement stable à 30°C (2,3% de dégradation à 30°C, mais 35,1% à 54°C). Loin d'être inerte, le verre semble être un support non seu-

lement fragile, mais qui ne permet pas de maintenir une dose constante de produit dans les flacons (dose discriminante choisie). On peut donc penser qu'un bioessai (vial-tests) composé de flacons en verre imprégnés de matière active pour mesurer la mortalité de larves d'*H. armigera* et estimer un niveau de résistance au sein des populations n'est pas adéquat. Les températures élevées, que l'on note dans les pays de la zone cotonnière d'Afrique de l'Ouest favorisent une altération rapide des composés dans les flacons ce qui conduirait les chercheurs à des conclusions erronées. Cette brève étude de stabilité au stockage, nous montre l'importance de valider les bioessais par analyses chimiques avant vulgarisation. Les papiers filtres, enveloppés individuellement dans une feuille d'aluminium, offrent un support plus stable pour les deux familles chimiques à 30°C mais pas à 54°C, car à cette température plus de 50% du triazophos ou du profénofos sont perdus. Du point de vue moléculaire, le fragment d'ADN isolé et amplifié à l'aide d'amorces *para* choisies en fonction de la littérature est bien le gène codant pour le canal sodium voltage dépendant, site d'action des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes. Les deux mutations découvertes, dont une est inédite, chez la souche issue du Sénégal nous mettent sur la voie d'une étude de la résistance aux pyréthrinoïdes, mais nous ne pouvons pas affirmer à ce stade et à l'aide de ce seul test que la souche sénégalaise soit résistante aux pyréthrinoïdes, ou que les mutations détectées en seraient l'indice, ni qu'elles sont la cause de l'évolution de la sensibilité d'*H. armigera* (expliquant la baisse d'efficacité de la cyperméthrine sur ce ravageur).

Summary

CHARACTERIZATION OF RESISTANCE IN *HELICOVERPA ARMIGERA* HUBNER
(LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) IN SENEGAL BY BIOASSAY AND MOLECULAR METHODS

A vial-test is used in West Africa (PR-PRAO program) for resistance detection of *Helicoverpa armigera* to cypermethrin (coated vials). This study showed that at 30°C and 54°C, 4 pyrethroids and 2 organophosphorus insecticides are quickly degraded in vials. A "kit" containing a round filter paper impregnated with insecticide and wrapped in a sheet of aluminium shows a better stability when stored at high temperature. Two mutations have been identified (serine replaced by glutamic acid and aspartic acid by valine) in the strain of *H. armigera* from Senegal; they are located in the sodium voltage dependant channel gene, the main target of pyrethroids.

Keywords: *Helicoverpa armigera*, Senegal, resistance, pyrethroids, mutation.

Références bibliographiques

- BAGAYOGO B., MARTIN T. & GBAKENOU K., 2001. Bilan du projet PR-PRAO. Projet régional de prévention et de gestion de la résistance de *Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'ouest, Yamoussoukro (Côte d'Ivoire), 1-5.
- HEAD D.J., McCAFFERY A.R. & CALLAGHAN A., 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine Lepidoptera. *Insect Molecular Biology* 7:191-196.
- PARK Y. & TAYLOR M.J.F., 1997. A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:9-13.
- VASSAL J., MARTIN T. & VAYSSAIRE M., 1997. Suivi de la sensibilité aux pyréthrinoïdes chez les lépidoptères ravageurs du cotonnier. ANPP – 4^{ème} conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier 6-8 Janvier 1997, 673-678.
- VODOUNNON S., 1997. Synthèse des travaux réalisés par les entomologistes en Afrique de l'Ouest et du centre. Réunion phytosanitaire de l'Afrique de l'Ouest et du centre, Cotonou, Bénin, 17-28.